

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

PREMIO LEON CHERNY

001. (442) TRATAMIENTO ANTIPARASITARIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EXPERIMENTAL, COMBINANDO BENZNIDAZOL Y CLOMIPRAMINA

Strauss, M.; Lo Presti, S.; Baez, A.; Bazan, C.; Paglini-Oliva, P.; Rivarola, H.
Laboratorio de Chagas

Para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas existen las drogas Nifurtimox y Benznidazol (**Bz**) ambas con efectos adversos. Es necesario orientar la búsqueda de drogas tripanocidas identificando un blanco molecular esencial en el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y ausente en el huésped. La tripanotona reductasa es una enzima vital en el parásito, que participa en el sistema de reducción de peróxidos. El antidepresivo tricíclico Clomipramina (**Clo**) inhibe a la tripanotona, produciendo la muerte del parásito. Este trabajo plantea como hipótesis que la utilización simultánea de dos drogas con diferente mecanismo de acción optimiza el tratamiento. Como objetivo principal, se propone evaluar el efecto simultáneo de la administración de **Bz** (100, 50 mg/kg/día) y **Clo** (5mg/kg/día) en la etapa aguda, en ratones albino suizos (n=105), infectados con el aislamiento SGO Z12 de *T. cruzi*. Los grupos fueron: no infectados (**NI**), infectados no tratados (**INT**), tratados con **Bz**, **Bz/2**, **Clo**, **Bz+Clo** y **Bz/2+Clo**. Las drogas se administraron durante 30 días post infección. Todos los tratamientos produjeron una disminución significativa de la carga parasitaria, no observándose parásitos en los tratados con **Bz**, **Bz/2**, **Bz+Clo** y **Bz/2+Clo**. Por PCR se obtuvieron resultados positivos para **Clo**, **Bz/2** y **Bz/2+Clo** indicando que aunque en pequeñas cantidades, el parásito aún se encontraba presente. En vellosidades de intestino de tratados con **Bz** se observaron leves alteraciones e infiltrados inflamatorios, también se encontraron hepatocitos necróticos y células inflamatorias dispersas. En tratados con **Bz/2**, **Clo**, **Bz+Clo**, **Bz/2+Clo** no se encontraron alteraciones histológicas. A los 30 días se obtuvo una sobrevida del 100% con los tratamientos **Bz**, **Bz/2**, **Bz+Clo** y **Bz/2+Clo**, del 70% con **Clo** y un 20% en **INT**. Por lo tanto las combinaciones de **Bz** y **Clo** en sus distintas dosis han mejorado el tratamiento ya que a pesar de no eliminar completamente al parásito, no se observaron daños en los tejidos analizados.

002. (210) LAS CÉLULAS PERIVASCULARES DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO (HUCPVC) DEMUESTRAN UNA MEJOR REPROGRAMACIÓN HACIA CARDIOMIOCITO Y FUNCIÓN CARDIACA EN UN MODELO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Yannarelli, G.¹; Pacienza, N.¹; Keating, A.²; Cuniberti, L.¹
Universidad Favaloro, Buenos Aires, Argentina.¹ Ontario Cancer Institute, UHN, Toronto, Canadá.²

Las células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVC) son una fuente alternativa de células mesenquimales estromales (MSC) para terapia celular. Se evaluó la habilidad de las HUCPVC para reprogramarse a cardiomiocitos respecto de MSC de médula ósea (BM-MSC) en un sistema de co-cultivo con cardiomiocitos de rata. La sobre-expresión de genes específicos de cardiomiocitos fue significativamente mayor en HUCPVC ($p < 0,001$), asociada a un incremento de los factores de transcripción GATA4 y Mef2c. Si bien las HUCPVC presentaron mayor actividad del promotor de la cadena pesada alfa de miosina (52% vs 29%, $p < 0,001$) y aumento de su expresión proteica (12% vs

5%, $p < 0,001$) ambos estirpes celulares retuvieron los marcadores estromales. Ensayos utilizando transwells demostraron que la reprogramación estaría mediada por factores solubles y que el aporte del contacto célula-célula es limitado. También se evaluó la regeneración cardíaca por administración intramiocárdica en un modelo de infarto agudo de miocardio en ratones. La función cardíaca fue superior en los grupos que recibieron terapia celular respecto del control, pero las HUCPVC mostraron mayor beneficio que las BM-MSC (40% vs 18%, $p < 0,05$) dado por un incremento significativo de la angiogénesis ($p < 0,05$). El mejor rendimiento de las HUCPVC estaría mediado por una mayor frecuencia de progenitores multipotentes CD146+ (54% vs 25%, $p < 0,001$) y aumento del largo de telómeros (2,2 veces, $p < 0,001$), actividad telomerasa (2,4 veces, $p < 0,001$) y expresión de los factores de pluripotencialidad OCT4 y NANOG respecto de las BM-MSC. Si bien no se encontraron diferencias en la metilación del promotor OCT4 (51% vs 48%, $p = 0,59$), este mecanismo de regulación epigenética podría explicar la menor capacidad de diferenciación de las MSC respecto de las células madre embrionarias (<5%). En conclusión, las HUCPVC constituyen una mejor fuente de progenitores estromales con mayor potencial para terapia regenerativa del miocardio.

003. (55) TRANSDIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON DIABETES TIPO I HASTA ISLOTES TIPO-PANCREÁTICOS USANDO SOLO AGENTES QUÍMICOS

Pereyra-Bonnet, F.; Gimeno M Laura; Ielpi Marcelo; Carodozo Johana; Giménez Carla; Loresi Mónica; Litwak Leon; Argibay Pablo
ICBME, Hospital Italiano de Buenos Aires

La transdiferenciación celular implica la conversión de una célula desde un linaje a otro sin pasar por estadios de pluripotencialidad. Hoy la transdiferenciación celular se logra mediante estrategias de transgénesis. El objetivo de este trabajo fue transdiferenciar fibroblastos de pacientes con diabetes Tipo I hasta células tipo-pancreáticas usando solo agentes químicos. Para ello se tomaron biopsias de piel de dos pacientes, se expandieron *in vitro* y se cultivaron durante 30d con IGF1, FGFb, Nicotinamida, Exendin-4, ITS, B27 y glucosa. Las células adoptaron una morfología tipo-islole pancreático y expresaron *PDX1*, *NGN3*, *GLUC*, *STT* e *INS* por RT-PCR. Mediante microarrays detectamos sobreexpresión global de genes pancreáticos y genes remodeladores de la cromatina (ej: *INSIG1*, *NKX2.2*, *LOC651872*, *TGM2*, *TGF-b*, *Nestin*, *BMPs* y *SMADs*) y sub-expresión de genes relacionados con fibroblastos (ej: *CD34*, *Elastin*, *FilaminB*, *COL12A1* y *COL8A1*). Por qPCR observamos que en las células transdiferenciadas *GLUC* e *INS* están sobreexpresados y *ASPN* y *MEOX2* (genes típicos de fibroblastos) están sub-expresados más de 10-veces. Hallamos hipometilación en los promotores de *INS* y *PDX1* por secuenciación de ADN bisulfito (ver resumen 539) y la inmunocitoquímica para *GLUC* e *INS* fue positiva en las células transdiferenciadas. No hubo expresión del plásmido OCT4-GFP en las células transdiferenciadas y los promotores de *OCT-4* y *NANOG* están isometilados respecto al control, demostrando nototipotencialidad. Por medio de bandejo-G obtuvimos cariotipos normales descartando daños debido al tratamiento y hubo 100% de coincidencia en los microsatélites con los fibroblastos parentales descartando contaminación. En este trabajo demostramos por primera vez que es posible transdiferenciar fibroblastos de

pacientes con diabetes tipo I hasta islotes tipo-pancreáticos que expresan insulina, usando solo agentes químicos. La transdiferenciación química es una promisorio alternativa para el remplazo de células pancreáticas en pacientes diabéticos.

004. (773) CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CADHERINA EPITELIAL Y MOLÉCULAS RELACIONADAS EN EL CÁNCER DE VEJIGA. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MARCADORES DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

Lapyckyj, L.¹; Mencucci, M.¹; Rosso, M.¹; Besso, M.¹; Loddillinsky, C.²; Belgorovsky, D.²; Edelsztein, N.¹; González, M.³; Britze, L.³; Tejerizo, J.³; Eiján, A.²; Vazquez-Levin, M.¹
IBYME - CONICET¹ Instituto A. Roffo² Departamento Urología, Hospital Italiano³

Introducción: Cadherina epitelial (CadE) es una glicoproteína de adhesión intercelular. Se considera un supresor tumoral en carcinomas epiteliales, dado que alteraciones en su expresión/funciones se asocian a células con mayor invasividad y a un aumento en la agresividad del tumor. El cáncer de vejiga es el 5to en la sociedad occidental, con valores en constante aumento. Durante la progresión del cáncer de vejiga se observa pérdida de CadE acompañada por expresión de marcadores característicos de la transición epitelio-mesenquimal. Aún no se han caracterizado las bases moleculares de los tumores de vejiga y son necesarios marcadores pronósticos y de seguimiento. **Objetivo:** Caracterizar la expresión de CadE y moléculas relacionadas en el cáncer de vejiga a fin de identificar marcadores pronósticos/de seguimiento y/o blancos terapéuticos. **Metodología:** Se realizaron ensayos de Western Immunoblotting, RT-PCR, PCR en tiempo real, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica en las líneas celulares tumorales de vejiga murinas MB49 (no invasiva) y MB49-I (invasiva), sus tumores ortotópicos y en tumores de vejiga humanos superficiales e infiltrantes. **Resultados:** En MB49-I, con respecto a la línea control MB49 1) se detectó una baja expresión del ARNm y de la forma proteica completa de CadE que se localizó en el citoplasma celular 2) se observaron niveles aumentados de Snail (represor de CadE) junto con expresión de CadN y aumento de CadP ("cadherin switch") 3) localización aberrante de beta-catenina y alteraciones en su fosforilación y 4) expresión de miembros del sistema Eph-Ephrin. En los tumores ortotópicos de estas líneas y en tumores de vejiga humanos superficiales e invasivos se confirmaron estos resultados. **Conclusión:** El análisis de la expresión de CadE y moléculas relacionadas en un modelo murino de cáncer de vejiga y en tumores humanos permitió por primera vez detectar cambios en la localización y fosforilación de beta-catenina junto con la expresión de miembros del sistema Eph-Ephrin, que podrían constituirse en nuevos marcadores en estos tumores.

005. (1) MICRODELECCIONES EN LA REGIÓN AZF DEL CROMOSOMA Y ASOCIADAS A INFERTILIDAD MASCULINA
Alechine, E.¹; Repetto, H.²; Sardi-Segovia, M.²; Ariagno, J.²; Curi, S.²; Palaoro, L.²; Mendeluk, G.²; Corach, D.¹
Servicio de Huellas Digitales Genéticas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Laboratorio de Fertilidad Masculina, Depto. de Bioq. Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA²

La infertilidad afecta aprox. al 15% de las parejas y en el 50% de los casos la causa se le puede atribuir al factor masculino. Numerosos estudios asocian microdeleciones en la región AZF del cromosoma Y a cuadros de azoospermia u oligozoospermia severa. Otros describen dichas deleciones en hombres fértiles, generando así controversias en el diagnóstico genético de infertilidad. Con el objetivo de evaluar los posibles efectos de microdeleciones en la región AZF sobre la espermatogénesis, se estudiaron pacientes en tratamiento por infertilidad y hombres fértiles con paternidad confirmada. Para ello se analizaron 7 marcadores STSs distribuidos a lo largo de las regiones AZFb/c mediante PCR seguida de electroforesis capilar. En los pacientes se evaluó la espermatogénesis mediante el estudio seminal, mientras que la paternidad de los controles fértiles se confirmó

mediante análisis de ADN. De los 155 pacientes estudiados, 2 presentaron deleciones b2/b4 y b1/b3 asociadas a cuadros de cripto y oligoastenoteratozoospermia severa respectivamente. Otros 5 pacientes también presentaron deleciones, 2 del tipo b2/b3 y 3 del tipo gr/gr. La deleción b2/b3 se asoció a una marcada teratozoospermia (1% de formas normales), mientras que la deleción gr/gr evidenció fenotipos variables, superando uno de ellos los valores de referencia espermáticos. Cabe destacar que 2 de los individuos fértiles también presentaron deleciones gr/gr. De acuerdo a estos resultados, concluimos que las deleciones b1/b3 y b2/b4 producirían un claro efecto deletéreo sobre la espermatogénesis y que la deleción b2/b3 afectaría la morfología, mientras que la deleción gr/gr no permitiría predecir por sí sola un efecto sobre la espermatogénesis ya que también se encuentra en individuos fértiles. Si bien resulta necesario el estudio de un número mayor de pacientes, los resultados obtenidos destacan la necesidad de caracterizar las microdeleciones e identificar aquellas inequívocamente asociadas a infertilidad.

006. (820) REGULACION DE LA EXPRESIÓN DE LA MAP QUINASA FOSFATASA-2 (MKP-2) Y SU PARTICIPACION EN LA EXPRESIÓN DE GENES DEPENDIENTES DE ERK1/2

Gomez, N.¹; Gorostizaga, A.¹; González-Calvar, S.²; Mori Sequeiros García, M.¹; Paz, C.¹
inbiomed-facultad de medicina-uba¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)²

Las MAP quinasas fosfatasas (MKPs) son enzimas que *in vivo* desfosforilan específicamente a las MAP quinasas, como ERK1/2. Las isoformas MKP-2 y MKP-1 se inducen por diferentes estímulos, aunque MKP-2 exhibe una cinética de inducción más lenta. Por su localización nuclear, ambas son potenciales reguladores de la expresión de genes dependientes de MAP quinasas. En células de Leydig MA-10, la estimulación del receptor de LH con gonadotropina coriónica humana (hCG) promueve la inducción de MKP-1, evento que provoca la inactivación temprana de ERK1/2 y el cese de la acción hormonal aguda sobre la expresión génica dependiente de estas quinasas. Nuestro objetivo fue analizar la expresión de MKP-2 en células de Leydig MA-10 estimuladas con hCG y su impacto en el curso temporal de la actividad de ERK1/2 y en la expresión del gen CYP11A1, gen que se induce luego de varias horas de estimulación por LH vía ERK1/2. Se evaluaron los niveles del ARNm de MKP-2 por qPCR y se determinó que hCG activa la transcripción del gen. Mediante la expresión transitoria de la quimera flag-MKP-2, y análisis de los niveles de la misma por Western blot con un anticuerpo anti-flag, determinamos que hCG promueve la acumulación de la quimera y su traslocación al núcleo. El análisis por Western blot de los niveles de fosfo-ERK1/2 en células que expresan un ARN de interferencia para MKP-2 (shARN-MKP-2), mostró que esta fosfatasa completa la inactivación ERK1/2 iniciada por MKP-1. Además, la expresión del shARN-MKP-2 incrementó el efecto del 8Br-AMPC sobre la actividad del promotor y sobre los niveles del ARNm correspondiente a CYP11A1, evidenciando la participación de MKP-2 en la regulación por LH/hCG de la expresión génica tardía. Nuestros resultados son consistentes con un modelo en el que genes de diferente cinética de inducción requieren la actividad de ERK1/2 en diferente marco temporal, lo que implica una acción diferencial de MKP-1 y MKP-2 en la regulación de la expresión génica.

007. (748) LA DINÁMICA REDISTRIBUCIÓN MITOCONDRIANÚCLEO DE LA INMUNOFILINA FKBP51 ES REGULADA POR PKA PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE GENES REQUERIDOS DURANTE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN ADIPOCÍTICO

Toneatto, J. ; Charó, N. ; Susperreguy, S. ; Piwien-Pilipuk, G.
IByME CONICET

La obesidad constituye un serio problema para la salud de la población mundial, siendo consecuencia de la hipertrofia e hiperplasia de tejido adiposo disfuncional que contribuye al desarrollo de diferentes enfermedades, tal como diabetes tipo

2. Los glucocorticoides juegan un rol central en la adipogénesis, ejerciendo su acción a través de la unión a su receptor, GR (*Glucocorticoid Receptor*). GR se encuentra en el citoplasma formando parte de un heterocomplejo que involucra una inmunofilina de alto peso molecular (IMM) FKBP52 o FKBP51. Mientras el nivel de expresión de FKBP52 disminuye, el de FKBP51 aumenta progresivamente durante la diferenciación de los preadipocitos. Debido a que se desconoce la función de FKBP51 durante dicho proceso, nos avocamos a su estudio. Demostramos por primera vez que FKBP51 sufre una dinámica relocalización mitocondria-núcleo durante el proceso de adipogénesis. Esta redistribución es regulada por la vía AMPc y en menor medida en respuesta a glucocorticoides. FKBP51 se concentra transitoriamente en la lámina nuclear, coincidiendo con su reorganización en estadios tempranos de la diferenciación. Se sabe que PKA-c se asocia con GR de manera ligando dependiente potenciando su actividad transcripcional. Nosotros demostramos que la translocación de FKBP51 dependiente de PKA reduce la capacidad transcripcional de GR, por lo tanto, PKA podría ejercer un rol dual en la regulación de dicho factor. FKBP51 no sólo interactúa con GR sino también con CREB modulando negativamente su capacidad transcripcional. Por lo tanto la presencia de FKBP51 en el núcleo puede ser crítica para el control de GR, y de otros factores no pertenecientes a la familia de los receptores nucleares, como lo es CREB, en una etapa del proceso de diferenciación con alto nivel de remodelamiento de cromatina, pero donde la transcripción debe estar estrictamente controlada para la adquisición del fenotipo adipocítico.

PREMIO PATRICIO COSSIO

008. (530) EFECTO DOMINANTE NEGATIVO DE UNA VARIANTE TRUNCADA DE LA PROTEÍNA REGULADORA AGUDA DE LA ESTEROIDOGENESIS (STAR). EVIDENCIA DEL ROL DEL PÉPTIDO DE SEÑALIZACIÓN MITOCONDRIAL N-TERMINAL EN LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA IN VIVO

Baquedano, M.; Guercio, G.; Marina, R.; Berensztein, E.; Costanzo, M.; Elisa Vaiani; Ramírez, P.; Rivarola Marco A.; Belgorosky, A.

Servicio de Endocrinología. Hospital de Pediatría JP Garrahan

StAR facilita la entrada de colesterol a la mitocondria formando parte de un gran complejo multiproteico, denominado transduceosoma, encargado del transporte de colesterol. Mutaciones recesivas causan formas clásicas y no clásicas de CLAH. El objetivo del estudio es evaluar las consecuencias moleculares de una nueva mutación heterocigota en StAR en un paciente 46,XY con genitales ambiguos e insuficiencia adrenal primaria. Se encontró un cambio heterocigota de novo, IVS1-2A>G, no descrito en el gen *STAR* y el polimorfismo heterocigota, pG146A, en SF1. No se detectaron mutaciones en los genes *CYP11A1*, *FDX1* y *FDXR*, potencialmente causantes del fenotipo del paciente. Por RT-PCR y secuenciación se observó un transcrito -exón2 y el transcrito normal (WT) de StAR a partir del RNA de tejido gonadal del paciente. Se detectó el precursor (37kD) y la proteína StAR madura (30kD) en células COS-7 transfectadas con el plásmido mutante y WT. Por inmunofluorescencia casi no se observó colocalización de la proteína mutante (p.G22_L59delStAR) en mitocondrias. La actividad de p.G22_L59delStAR fue del 65%±13 respecto del WT. La cotransfección de los plásmidos p.G22_L59delStAR y WT redujo la actividad de WT en 62%±13.9. La mutación en StAR (IVS-2A>G) provocó la pérdida de los aminoácidos 22 a 59 en el péptido de señalización mitocondrial N-terminal y en función de los resultados postulamos que esto conduciría a un plegamiento anormal de la proteína que alteraría el procesamiento y translocación. Sugerimos que la proteína mutante estaría interfiriendo con la acción de la proteína StAR WT bloqueando el complejo transduceosoma y causando una forma dominante de deficiencia de StAR que explicaría el fenotipo clínico en heterocigosis.

009. (459) EVALUACIÓN DEL COMPLEJO PROTECTOR DE LOS TELÓMEROS EN DESÓRDENES A CÉLULAS PLASMÁTICAS

Panero, J.¹; Arbelbide, J.²; Fantl, D.²; Kohan, D.²; García Rivello, H.²; Rabinovich, G.^{3a}; Slavutsky, I.¹

Instituto de Medicina Experimental CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Sección Hematología y Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Italiano² Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET³ FCEN, Universidad de Buenos Aires⁴

Las proteínas que conforman el complejo telomérico protector (TRF1, TRF2, TPP1, TIN2, RAP1 y POT1) participan activamente en la preservación de los telómeros y en el mantenimiento de la estabilidad e integridad genómica. En este trabajo se evaluaron los perfiles de expresión de los componentes del complejo protector, sus interacciones, y su correlación con la longitud telomérica (LT), la expresión de telomerasa (*hTERT*) y el regulador de diferenciación de células plasmáticas *LGALS1* (Galectina-1), en pacientes con mieloma múltiple (MM) y gamopatía monoclonal de significado incierto (MGUS). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Se estudiaron muestras de 154 pacientes: 70 con MGUS (40 mujeres; edad media: 69,3 años) y 84 con MM (42 mujeres; edad media: 67,5 años). El análisis de expresión, mediante PCR en tiempo real, mostró un aumento significativo de *TRF2*, *POT1* y *hTERT* ($p < 0,03$) en MM respecto de MGUS. Debido a la gran heterogeneidad observada en los niveles de *hTERT*, los pacientes fueron clasificados en tres grupos: baja (G1), intermedia (G2) y alta (G3) expresión del mismo. Este análisis mostró sobreexpresión de *TRF2* y *RAP1* en G3 vs. G1 ($p < 0,01$) en MGUS, e incremento en los niveles de *TRF2* y *TPP1* en G3 vs. G1 y G2 ($p < 0,04$) y disminución de la LT en G3 vs. G1 ($p = 0,02$) en MM. La expresión de *LGALS1* se observó también aumentada en G2/3 respecto de G1 ($p = 0,013$). Además, en MM la expresión de *POT1* se asoció positivamente a β 2microglobulina (β 2M), estadios Durie-Salmon avanzados, hipercalcemia y lesiones óseas ($p = 0,009$), en tanto que la LT correlacionó positivamente con hemoglobina y negativamente con β 2M ($p = 0,02$). Estos hallazgos muestran una modificación global de la expresión de las seis subunidades del complejo protector de los telómeros. La estrecha correlación de *POT1* con diferentes parámetros de mal pronóstico sugiere la importancia del mismo como posible blanco molecular para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

PREMIO FARYNA DE RAVEGLIA

010. (266) ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE LDL OXIDADAS Y LA CONCENTRACIÓN DE TIROTROFINA EN INDIVIDUOS EUTIROIDEOS NORMOCOLESTEROLÉMICOS

Duaip, J.; Rojo, D.; Maggi, L.; Marziali, L.; Pacienza, N.; Yannarelli, G.; Giunta, G.; Cuniberti, L.

Universidad Favaloro

Las lipoproteínas LDL oxidadas (LDLox) son un factor proaterogénico de gran importancia, ya que son precursoras en la formación de placas de aterosclerosis. Diversas investigaciones muestran que las hormonas tiroideas pueden influir en la oxidación de lipoproteínas de enfermos con patología tiroidea. Sin embargo es motivo de controversia la existencia de esta asociación en individuos eutiroideos. Objetivo: evaluar si la concentración de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en individuos eutiroideos sin hipercolesterolemia está asociada con la oxidación de lipoproteínas. Materiales y métodos: se evaluó una población de individuos sanos mayores de 18 años, sin patología tiroidea o hipercolesterolemia. Se excluyeron los pacientes tratados con hipolipemiantes, glucocorticoides o remplazo hormonal tiroideo. Los pacientes portadores de patología renal o hepática crónica también fueron excluidos. Se determinaron los valores de perfil lipídico, glucemia y TSH por métodos automatizados. Se realizó medición de LDLox por un kit de ELISA comercial (MERCODIA). Se analizó una muestra de 71 individuos, con una edad prome-

dio de $40,1 \pm 13$ años, de los cuales 46,5% eran mujeres (33 p). Los participantes presentaron un IMC de $25,4 \pm 4,5$. Los valores de presión arterial sistólica y diastólica fueron 113 ± 15 mm Hg y 72 ± 10 mm Hg respectivamente. Se observó una asociación entre los valores de LDLox y la concentración de glucemia ($R=0,28$; $p<0,05$), colesterol total ($R=0,37$; $p<0,005$), TSH ($R=0,28$; $p<0,05$), triglicéridos ($R=0,34$; $p<0,01$) y colesterol LDL ($R=0,36$; $p<0,005$). En el análisis de regresión lineal múltiple la concentración de glucemia ($p<0,05$), TSH ($p<0,05$) y colesterol LDL ($p<0,01$) estuvieron independientemente asociados a los niveles de LDLox plasmáticos. Conclusión: Estos resultados sugieren un vínculo entre el perfil tiroideo y la oxidación de lipoproteínas en pacientes eutiroideos en ausencia de hipercolesterolemia.

011. (373) IDENTIFICACIÓN DE GALECTINA-1 COMO UN NUEVO BLANCO TERAPÉUTICO EN CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO

Dalotto Moreno, T.; Croci, D.; Cerliani, J.; Dergan Dylon, S.; Martínez Allo, V.; Mendez Huergo, S.; Mascanfroni, I.; Sunblad, V.; Toscano, M.; Rabinovich, G.; Salatino, M. *Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET*

Galectina-1 (Gal1) es una lectina endógena capaz de atenuar la respuesta inmune y promover escape tumoral. En este trabajo investigamos el impacto de Gal1 tumoral sobre la inmunosupresión, el crecimiento tumoral y las metástasis en cáncer de mama. Observamos por inmunohistoquímica que la expresión de Gal1 en carcinomas de mama humano está asociado con un mayor grado histológico y malignidad ($p<0,001$). Con el objeto de silenciar Gal1 elegimos el modelo de cáncer de mama murino altamente metastásico 4T1 con alta expresión de Gal1. El silenciamiento de Gal1 (shRNA) inhibió el crecimiento tumoral ($p<0,05$) y el número de metástasis pulmonares. Este efecto fue inhibido cuando en el flanco opuesto se inoculó un tumor WT ($p<0,05$), sugiriendo la participación del sistema inmune en este efecto. El estudio de los componentes inmunológicos en estos ratones reveló una frecuencia mayor de células T regulatorias (Tregs) Foxp3+ en bazo, ganglios drenantes (GD) ($p<0,01$), tumor y pulmón. El bloqueo de Gal1 tumoral revirtió la inmunosupresión asociada al tumor, observándose un aumento en la proliferación *ex vivo* de esplenocitos y linfocitos de GD y un desvío de la respuesta hacia un perfil Th1 ($p<0,05$) en ratones portadores de tumores con Gal1 silenciada (KD). La inhibición de Gal1 tumoral redujo la frecuencia de células Tregs Foxp3+ tanto *in vivo* como *in vitro* ($p<0,01$) y su capacidad supresora ($p<0,05$), evidenciada por una menor expresión de la proteína LAT. Más aún, la transferencia adoptiva de Tregs provenientes de GD WT favoreció la formación de metástasis en ratones portadores de tumores KD. Finalmente, la administración i.p. de un anticuerpo monoclonal neutralizante de Gal1 a ratones portadores del tumor 4T1 WT inhibió el crecimiento tumoral ($p<0,01$), la formación de metástasis pulmonares ($p<0,05$) y revirtió la inmunosupresión asociada al tumor ($p<0,05$). Los resultados expuestos permiten postular a Gal1 como nuevo blanco terapéutico en cáncer de mama metastásico.

PREMIO LEONARDO SATZ

012. (348) MECANISMOS MEDIADOS POR EL ÁCIDO ALL-TRANS RETINOICO ASOCIADOS AL REESTABLECIMIENTO DE LA INMUNOCOMPETENCIA EN UN MODELO DE INMUNOSUPRESIÓN POR LIPOPOLISACÁRIDOS BACTERIANOS

Martire Greco, D., Landoni, V., Chiarella, P., Schierloh, P., Rearte, B., Isturiz, M., Fernández, G. *IMEX-CONICET. Academia Nacional de Medicina*

La inmunosupresión derivada de los procesos sépticos está asociada a la disminución de la proliferación de los linfocitos (Li) T. A su vez, las células mieloides inmaduras supresoras (MDSC) Gr-1+CD11b+ participan en este proceso mediante la producción de la óxido nítrico (ON) y la activación de la Arginasa1 (Arg1). El Ácido Trans-Retinoico (ATRA) es una droga inmunomoduladora

y tiene efectos sobre distintas poblaciones celulares, muchas veces modulando su sobrevivencia. Nuestro objetivo fue determinar el/los mecanismos de acción del ATRA para revertir los parámetros alterados en la inmunosupresión por lipopolisacáridos (LPS) establecida en un modelo experimental. Trabajamos con un modelo murino aplicando dosis crecientes de LPS i.p. (2-100 ug/día/ratón) durante 20 días en paralelo con ATRA (500 ug/día/ratón) (grupo IS+ATRA) o vaselina (vehículo) (grupo IS) vía oral. Al grupo Control se le administró solución fisiológica i.p. o ATRA sólo (grupo ATRA). La proliferación T fue determinada en cultivos de células de ganglio en respuesta a concanavalina A midiendo la actividad mitocondrial con MTT (Abs 570 nm). Mientras que en el grupo IS se observó una disminución de la proliferación T con respecto al Control, el grupo IS+ATRA fue capaz de revertir este efecto ($p<0,05$). También el grupo IS+ATRA registró un aumento del número de Li de ganglio CD19+, CD8+, CD4+ medido por citometría de flujo respecto al grupo IS ($p<0,05$). La administración paralela de ATRA no logró disminuir la población MDSC aumentada en el grupo IS respecto al Control ($p<0,05$). Sin embargo, la actividad de las MDSC se encontró disminuida en el grupo IS+ATRA presentando una menor producción de ON y actividad de Arg1 y mayores niveles de apoptosis respecto al grupo IS ($p<0,05$). Por lo tanto el ATRA disminuye la actividad supresora de las MDSC, posiblemente disminuyendo su sobrevivencia y de esta forma contribuyendo a la restauración de la proliferación de LiT.

013. (39) LA RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LAS ENFERMEDADES DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (EHGNA) ES SENSIBLE A LA MODULACIÓN POR CURCUMINA

Inzaugarat, M.¹, Vodánovich, F.¹, Baz, P.¹, De Matteo, E.², Lucero, D.³, Daruich, J.⁴, González Ballerga, E.⁴, Sorda, J.⁴, Wald, M.⁵, Cheriñavsky, A.¹

INIGEM-LAB DE INMUNOGENÉTICA¹ Anatomía Patológica, Hospital de Niños "R. Gutiérrez"² Depto de Bioquímica Clínica, UBA-Fac de Farmacia y Bioquímica³ División de Gastroenterología, UBA-Hospital de Clínicas "Jose de San Martín"⁴ CEFYBO-UBA Fac de Medicina⁵

Introducción: Las células de Kupffer (CK) y los monocitos (Mo) contribuyen a la inflamación y al daño hepático en EHGNA a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y citoquinas. **Objetivo:** Evaluar el efecto de ácidos grasos, leptina (Lep) y citoquinas sobre la producción de ERO y TNFa en Mo y CK, y su reversión *ex vivo* (pacientes) y/o *in vivo* (modelo murino de esteatohepatitis) por el agente antiinflamatorio Curcumina (Cur). **Métodos:** se incluyeron 60 pacientes (EHGNA) y 40 controles (Co) adultos, y ratones C57Bl/6 (n=27) sometidos a dieta normal (DN) o alta energía (AE) ± Cur por 23 sem. Producción de ERO: en células mononucleares (CM) periféricas y suspensiones celulares hepáticas preincubadas con diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) 15 min seguido de ácido linoleico (AL), palmítico (AP) [200-400µM], Lep [10nM] o TNFa [1,2 ng/ml]+PMA [100ng/ml] con/sin Cur [30µM] 50 min (para producción de ERO) o Lep[100nM] + Brefeldina [1µM] ± Cur [5µM] 6 hs (para producción de TNFa). Se identificaron Mo con CD14/CD16 y CK con CD11b/CD14(Hu) o F4/80(ratón). Se calcularon índices de estimulación [(IE): fluorescencia DCFH post/pre-estímulo] y de incremento por Lep [(I): %Mo TNF+ post/pre-estímulo. Test estadísticos: ANOVA (dos factores)/ Bonferroni, Mann-Whitney, Wilcoxon (pareado) y correlación de Spearman. **Resultados:** AL induce aumento de ERO en Mo (EHGNA vs. Co, $p=0,032$) que disminuye con Cur ($p=0,030$) y en CK ($p=0,015$), con correlación positiva entre ambos IE en EHGNA ($r=0,610$, $p=0,032$). Lep incrementa TNFa en Mo (II EHGNA vs. Co, $p=0,029$) que disminuye con Cur ($p=0,031$). En ratones AE, las CK aumentan el IE frente a AL y el II frente a Lep ($p<0,05$ vs. DN en ambos casos). El tratamiento *in vivo* con Cur (AE+Cur) revierte producción de ERO frente a AL y TNFa frente a Lep ($p<0,05$ vs. AE en ambos casos). **Conclusiones:** la sensibilidad a Cur demuestra su potencial utilidad para futuras estrategias de modulación terapéutica de la inflamación en EHGNA.

014. (471) LOS NEUTRÓFILOS REGULAN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS T $\gamma\delta$

Larangeira, A.¹, Ernst, G.¹, González, H.², Gabelloni, M.¹, Sabbione, F.¹, Trevani, A.¹, Geffner, J.¹², Jancic, C.¹
 IMEX-CONICET-ANM¹ CNRS, Facultad de Medicina UBA²

Las células T se encuentran en la interfase de los elementos propios a la inmunidad innata y adaptativa. Están implicadas en la respuesta inmune contra patógenos, en la vigilancia tumoral y en fenómenos de reparación tisular. Es conocido que las células T $\gamma\delta$ median el reclutamiento de los neutrófilos a focos inflamatorios y activan su arsenal de mecanismos secretorios y citotóxicos. No existen trabajos previos en la literatura que hayan analizado la capacidad de los neutrófilos de modular la actividad de las células T $\gamma\delta$, temática que abordamos en el presente trabajo. Las células T $\gamma\delta$ cultivadas en presencia de neutrófilos mostraron una severa reducción en su capacidad de responder al agonista HMBPP, medida en función de: a) una expresión incrementada de CD25 evaluada por citometría de flujo ($p < 0.05$ vs controles, $n=22$), b) la estimulación de la producción de IFN- γ analizada por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos ($p < 0.05$ vs controles, $n=5$) y c) la inducción de una respuesta proliferativa evaluada en células T $\gamma\delta$ marcadas con CFSE por citometría de flujo ($p < 0.05$, $n=4$). La inhibición de la activación de las células T $\gamma\delta$ solo se evidenció al co-cultivar a las células T $\gamma\delta$ con neutrófilos viables, pero no con neutrófilos apoptóticos. Por otra parte, observamos que los sobrenadantes de neutrófilos activados por cultivo sobre IgG inmovilizada, mediaron un efecto inhibitorio similar al ejercido por los neutrófilos ($p < 0.05$, $n=7$), sugiriendo que el mecanismo inhibitorio es mediado a través de la liberación de mediadores solubles. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un mecanismo paracrino a través del cual las células T $\gamma\delta$ y los neutrófilos modulan mutuamente sus niveles de actividad.

INMUNOLOGÍA CLÍNICA Y AUTOINMUNIDAD 1**015. (201) LA DEFICIENCIA DE IL12P70, PERO NO DE IL4, CONFIERE RESISTENCIA AL DESARROLLO DE PROSTATITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL**

Motrich, R., Bresler, M., Sanchez, L., Altamirano, A., Rivero, V.
 CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba

La Prostatitis Crónica No Bacteriana es una enfermedad prevalente y la autoinmunidad ha sido propuesta como responsable. El modelo de Prostatitis Autoinmune Experimental (PAE) ha demostrado ser válido para su estudio. Previamente, un rol clave de IFN-gama en la patogénesis de la enfermedad ha sido propuesto. Con el objetivo de avanzar en los mecanismos inmunopatogénicos involucrados, en este trabajo estudiamos el desarrollo de PAE en ratones deficientes de IL-12p70 e IL-4. Ratones IL4-KO, IL12p70-KO y *wild type* (C57Bl/6) de 6-8 semanas de edad fueron inmunizados con extracto prostático (EP) o solución salina (C) emulsificados en CFA, en los días 0 y 15. Los animales fueron sacrificados en el día 24 y se realizaron ensayos de linfoproliferación específica, determinación de secreción y frecuencia de células productoras de IFN-gama, IL-17, IL-4 e IL-10 y de niveles séricos de autoanticuerpos. Además, se analizaron y cuantificaron los leucocitos infiltrantes de próstata (FACS). Animales C57Bl/6 inmunizados con EP desarrollaron una elevada respuesta linfoproliferativa con secreción específica de IFN-g e IL-17 y un marcado infiltrado leucocitario en próstata compuesto principalmente de linfocitos T CD4 y monocitos/macrófagos ($p < 0.01$). Animales IL4-KO inmunizados desarrollaron un perfil similar de respuesta pero de una manera más exacerbada ($p < 0.01$). Por el contrario, animales IL12p70-KO inmunizados desarrollaron una débil respuesta inmune contra antígenos prostáticos, caracterizada por la secreción específica de altos niveles de IL-4 ($p < 0.001$) y ausencia de infiltrado en el órgano blanco. Estos resultados demuestran que luego de la inmunización con EP se genera una respuesta autoinmune asociada a Th1/Th17, con elevada secreción espe-

cífica de IFN-gama e IL-17, la cual resulta en infiltración y daño de la glándula prostática. La ausencia de citocinas asociadas a Th1 (IL12) o a Th2 (IL4) protege o incrementa la susceptibilidad al desarrollo de PAE, respectivamente.

016. (408) ROL DEL EJE CXCL10/CXCR3 EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

Bondar, C.¹, Guzmán, L.², Cueto Rúa, E.², Chopita, N.³, Chirido, F.¹
 Laboratorio de Investigación en el Sistema Inmune LISIN Facultad de Ciencias Exactas UNLP¹ Servicio de Gastroenterología, Hospital de Niños "Sor María Ludovica" La Plata² Servicio de Gastroenterología. Hospital San Martín, La Plata.³

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica de base inmune generada en individuos genéticamente susceptibles ante la ingesta de un grupo de proteínas de trigo. El infiltrado linfocitario y la atrofia de vellosidades son los hallazgos histológicos característicos en mucosa duodenal en EC activa. Las células que infiltran la lámina propia (LP) de la mucosa son principalmente linfocitos T CD4⁺ del perfil Th1, secretores de IFN γ . CXCR3 es un receptor de quimocinas determinante en el reclutamiento celular en tejidos inflamados. CXCR3 es inducido en células Th1 y activado por tres ligandos: CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Se ha descrito que el eje CXCL10/CXCR3 participa en la patogenia de colitis ulcerosa, diabetes tipo 1 y artritis reumatoidea. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de dicho eje en la EC. Se analizaron biopsias duodenales y muestras de suero de pacientes celíacos al momento del diagnóstico, de celíacos en tratamiento y de individuos no celíacos. El análisis de expresión por PCR cuantitativa en biopsias duodenales reveló un mayor nivel de mRNA de CXCL10 y de CXCL11 en pacientes con EC activa respecto a controles ($p=0,0002$ y $p=0,0003$) y respecto a pacientes tratados ($p=0,0132$ y $p=0,0095$). Los niveles de CXCR3 y CXCL9 no presentaron diferencias significativas. El análisis por microscopía confocal mostró que el número de células CXCR3⁺ en LP en EC activa fue significativamente mayor que en controles ($p=0.0120$). Estudios por microscopía también mostraron una mayor expresión de CXCL10 en mucosa celíaca respecto a controles. Encontramos que células CD138⁺, linfocitos T CD3⁺ y enterocitos son productores de CXCL10. Los pacientes celíacos, tanto al diagnóstico como en tratamiento, presentaron mayores niveles de CXCL10 en suero (cuantificados por ELISA), respecto a los controles ($p=0,0002$ y $p=0,0076$). Nuestros resultados sugieren la participación del eje quimiotáctico CXCR3/CXCL10 en la patogenia de EC.

017. (544) ANÁLISIS DEL MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DEL SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO AUTOINMUNE A TRAVÉS DEL ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN FAS

Simesen De Bielke, M.¹, Yancoski, J.¹, Oliveira, J.², Danielian, S.¹
 Hospital de Pediatría J.P. Garrahan¹ Immunology Service, Clinical Center, NIH, MD²

Mutaciones heterocigotas en el gen *FAS* son la causa más frecuente de un desorden inmunológico complejo, Síndrome Linfoproliferativo y Autoinmune (ALPS). La mayoría de ellas afectan la zona intracelular de Fas y tan solo un tercio, la zona extracelular. En nuestro laboratorio se diagnosticaron 4 familias (5 pacientes) con una mutación C107Y que afecta la zona extracitoplasmática de la molécula. Debido a la controversia respecto del mecanismo fisiopatológico en mutantes *missense* extracelulares, estudiamos la expresión y localización subcelular de C107Y en comparación con Wild Type (WT) y una mutante intracelular. La expresión de Fas se estudió en una línea celular humana HEK 293 mediante generación de proteínas de fusión Fas-GFP y Fas-RFP, WT y 3 mutantes: C107Y, C104Y y D260E. La expresión fue confirmada mediante microscopía de fluorescencia, Western Blot (WB) y Citometría de Flujo (CF). La localización celular fue analizada por microscopía confocal. Por métodos bioinformáticos se había predicho que las mutaciones extracelulares C104Y y C107Y son

probablemente dañinas, al afectar un dominio rico en cisteína. La mutante D260E no afectaría estructura sino función, a través de un efecto dominante negativo. De hecho, observamos la expresión en superficie del WT y D260E pero no de C104Y ni C107Y; mientras que todas mostraron expresiones comparables en WB. En células permeabilizadas, la CF confirmó la expresión intracelular de C104Y ni C107Y. Mediante microscopía confocal, ambas mutantes extracelulares mostraron retención en retículo endoplasmático (RE) (colocalización con plásmido específico de RE) sin generar stress de esta organela (WB anti BiP). A diferencia de WT y D260E, C104Y y C107Y no mostraron localización en Golgi (Ac anti-giantin). La retención anormal en RE de las mutantes extracelulares de FAS, debida probablemente a un mal plegamiento de las proteínas, permite proponer un mecanismo de haploinsuficiencia como base de la expresión de ALPS en estos pacientes.

018. (762) ANALISIS DEL CAMBIO ISOTÍPICO DE INMUNOGLOBULINAS MEDIANTE EL ESTUDIO DE UNIONES SWITCH SMU-SALPHA PERMITE DEFINIR SUBGRUPOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE (IDCV)

Almejun, M.¹, Campos, B.¹, Gallichio, M.², Zelazko, M.¹, Oleastro, M.¹, Danielian, S.¹
HOSPITAL de PEDIATRIA J. P. GARRAHAN¹ HOSPITAL de NIÑOS V. J. VILELA²

La hipogamaglobulinemia caracteriza al heterogéneo grupo de inmunodeficiencias primarias conocido como IDCV. El nivel en plasma de IgG tiene bajo valor predictivo de la severidad de IDCV. El estudio de los mecanismos de diferenciación tardíos del linfocito B (CSR y SHM), responsables de maduración de la respuesta anticorpórea podría orientar en localización de defectos génicos. En trabajos previos estudiamos la capacidad in vivo de realizar SHM en pacientes IDCV correlacionándose una severa alteración con un bajo porcentaje de B circulantes "memoria con switch" y presencia de complicaciones clínicas (esplenomegalia/ autoinmunidad). El objetivo del presente estudio es analizar el cambio isotópico de Igs (CSR) evaluando la reparación del ADN en las uniones switch Smu-Salpa, cuya estructura presenta anomalías en presencia de diversos defectos en la recombinación S-S. Se clonaron y secuenciaron 137 fragmentos S-S de 12 pacientes IDCV, así como 54 de 6 controles sanos. Cada fragmento es único y representa un evento independiente de CSR. Los resultados demuestran en pacientes un incremento significativo en la extensión de la homología donar-aceptor en las uniones Smu-Salpa respecto de controles sanos (media de secuencias con perfecta homología 2.52 ± 4.45 pb en controles sanos vs 5.34 ± 5.11 pb en pacientes IDCV; $p < 0.001$ two tailed Student's t test). Una alteración significativa de la microhomología se correlacionó además con el subgrupo de pacientes con mayor compromiso en SHM y presencia de complicaciones clínicas. La identificación de este subgrupo de pacientes pediátricos IDCV nos permitirá focalizar en mecanismos moleculares que puedan ser compartidos en la inducción y direccionamiento de regiones S de CSR, así como en la introducción de mutaciones puntuales en las regiones V de Igs, para la búsqueda de genes candidatos.

019. (774) EL BOQUEO DE CXCR3 Y CCR5 REDUCE LA INFILTRACIÓN DE LAS GLÁNDULAS PANCREÁTICA, TIROIDEA Y PROSTÁTICA EN RATONES SCURFY

Breser, M.¹, Martins, A.², Lino, A.², Paiva, R.², Motrich, R.¹, Demengeot, J.², Rivero, V.¹
Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. CIBICI-CONICET¹ Instituto Gulbenkian de Ciência. Oeiras, Portugal²

Los linfocitos T regulatorios (Treg) expresan el factor de transcripción Foxp3 y son fundamentales en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Ratones scurfy (sf) deficientes en Foxp3, no poseen Treg y desarrollan autoinmunidad multi-órgano. Estos ratones presentan una activación sistémica de células T (LT), junto con una exacerbada inflamación e infiltración multi-órgano. En el

presente trabajo, nos propusimos evaluar la expresión de receptores de quimiocinas (RQ) en LT de ratones sf. Luego de evaluar la expresión de CXCR3, CCR5, CCR6, CCR3 y CCR4 en LT de bazo y nódulos linfáticos de ratones sf y controles, encontramos que ~60% de los LT de ratones sf expresaban receptores CXCR3, comparado con un ~3% en LT de ratones controles ($P \leq 0,001$). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los demás RQ. Debido al particular incremento en la expresión de CXCR3 en LT, nos propusimos evaluar el efecto del bloqueo de CXCR3 y CCR5 mediante la administración del antagonista TAK-779. Para ello, se administró diariamente TAK-779 o vehículo a neonatos sf por 17 días y posteriormente se evaluó la infiltración en diferentes tejidos como páncreas, tiroides, pulmón, piel, cerebro y próstata. Se observó que los ratones tratados con TAK-779 evidenciaron una reducción significativa en la infiltración en páncreas, tiroides y próstata comparada con la observada en animales sf tratados con vehículo ($P \leq 0,005$). Al analizar la presencia de infiltración en piel y pulmón, se observó una marcada infiltración tanto en ratones sf tratados con TAK-779 como con vehículo. Otros tejidos en los que ratones sf no presentaban infiltración, no mostraron diferencias entre animales tratados con TAK-779 o vehículo. Estos resultados evidenciaron un importante incremento en LT CXCR3⁺ en ratones sf y demuestran que la expresión de este receptor es importante para la llegada de LT activados a la glándula tiroides, páncreas y próstata en ratones sf.

ONCOLOGÍA 1

020. (8) MESOTELIOMA MALIGNO VS. PROLIFERACIONES MESOTELIALES REACTIVAS: PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO

Moretti, L.; García, A.; Nieto, S.; Avagnina, A.; Elsner, B.; Denninghoff, V.
Servicio de Patología Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas CEMIC

Introducción: El diagnóstico diferencial entre mesotelioma e hiperplasia mesotelial reactiva puede ser dificultoso en términos morfológicos. Hasta el momento existen pocos marcadores inmunohistoquímicos que hayan demostrado utilidad para realizar tal distinción. **Objetivos:** El presente estudio tiene como objetivo principal el valor diagnóstico de los anticuerpos GLUT-1 y EMA (antígeno epitelial de membrana) para distinguir las lesiones mesoteliales benignas de las malignas, y establecer su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, en forma individual o usados en combinación. **Diseño del estudio:** Se seleccionaron 53 casos diagnosticados como mesotelioma o hiperplasia mesotelial reactiva. Se realizó hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica: (EMA y GLUT-1, investigándose el índice de proliferación con el anticuerpo Mib-1 para Ki 67. **Resultados:** La cohorte de mesoteliomas fue inmunoreactiva para GLUT-1 en 11/15 (73%) casos y para EMA en 13/15 (87%) casos. Las lesiones reactivas fueron positivas para GLUT-1 en 2/38 casos (5,2%) y para EMA en 7/38 (18,2%) casos. La mediana del índice de proliferación fue del 1% en lesiones benignas y del 3% en mesoteliomas. **Conclusión:** EMA y GLUT-1 son marcadores sensibles y específicos, que pueden sugerir que una proliferación mesotelial es maligna si no se cuenta con los criterios de invasión, siendo complementarios del estudio histopatológico. De esta manera, una lesión mesotelial morfológicamente dudosa que presentase marcación positiva difusa e intensa para estos anticuerpos, correspondería muy probablemente a un mesotelioma. Sin embargo, la demostración de infiltración de los tejidos subyacentes por las células mesoteliales sigue siendo actualmente el *gold standard* para el diagnóstico de mesotelioma.

021. (22) ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTINEOPLÁSICOS DE UN NUEVO ANÁLOGO DE CALCITRIOL

Ferronato, M.¹; Salomón, D.¹; Fall, Y.²; Curino, A.¹; Facchinetti, M.¹
INIBIBB-CCT-Bahía Blanca¹ Facultad de Química- Universidad de Vigo - España²

El calcitriol ($1\alpha, 25$ dihidroxivitamina D3) es un seco-esteroide que presenta acciones inhibitorias sobre el desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer. Sin embargo su utilidad como agente antitumoral se ha visto limitada debido a su actividad hipercalcemiante. Por ello, es importante desarrollar análogos sintéticos del calcitriol que conserven o incrementen los efectos antineoplásicos y no causen hipercalcemia. En el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Vigo se ha sintetizado un nuevo análogo de calcitriol de tipo Gemini: el UVB1. El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción antineoplásica de este compuesto sobre diferentes líneas celulares tumorales comparándola con la ejercida por el calcitriol y estudiar su efecto sobre la calcemia en ratones. El análogo sintetizado ejerce una disminución estadísticamente significativa sobre la supervivencia de las líneas celulares humanas HN12 y HN13 (carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello) ($p < 0.001$), U251 (glioblastoma multiforme) ($p < 0.05$), T47D (adenocarcinoma mamario hormono dependiente) ($p < 0,01$) y HCT116 (carcinoma colorectal) ($p < 0.001$). No se observaron efectos sobre la supervivencia en las líneas T98G (glioblastoma multiforme humano) y LM3 (adenocarcinoma mamario murino hormono independiente). En esta última, en cambio, el análogo redujo la migración celular ($p = 0,0079$). Se comenzaron a estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la acción de este análogo, detectándose efectos sobre la expresión del receptor de vitamina D (VDR) y de la enzima hemoxigenasa-1 (HO-1). Los ensayos de calcemia en ratones CF1 demostraron que, a diferencia del calcitriol, el nuevo análogo no provoca hipercalcemia (dosis de $5 \mu\text{g}/\text{kg}$). Observaciones preliminares de los animales mostraron que el nuevo compuesto no ejerce efectos tóxicos. En conclusión, los resultados de estos estudios aportan evidencia significativa sobre el potencial uso terapéutico de este nuevo análogo como droga antitumoral.

022. (47) USO DE MICELAS COMO MEDIOS DE VEHICULIZACIÓN DE UNA FTALOCIANINA DE ZN(II) LIPOFÍLICA CON PROPIEDADES FOTOTÓXICAS Y ANTITUMORALES

Marino, J.¹; Chiarante, N.¹; García Vior, M.²; Sosnik, A.³; Awruch, J.²; Roguin, L.¹

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA² BIO-NIMED, Departamento de Tecnología Farmacéutica, UBA³

Las ftalocianinas (Pc) son compuestos de síntesis promisorios para uso en terapia fotodinámica como antitumorales. La principal dificultad de estos fotosensibilizantes es su tendencia a la agregación y escasa solubilidad en condiciones fisiológicas, dando como resultado baja biodisponibilidad y disminución de su eficiencia fotodinámica. Con el propósito de hallar agentes fotosensibilizantes antitumorales, se estudiaron las propiedades fototóxicas de una ftalocianina lipofílica, la Pc9, sustituida con cadenas alifáticas azufradas. Para mejorar la solubilidad en medio acuoso y prevenir agregaciones, se emplearon cuatro micelas de poloxamina con diferente grado de polimerización: T304, T904, T1107 y T1307. En primer lugar, evaluamos el efecto de las micelas sobre el crecimiento de células KB (carcinoma orofaríngeo humano). Los resultados obtenidos tanto en la oscuridad como en presencia de una dosis de luz de $2,8 \text{ Jcm}^{-2}$ mostraron un efecto citotóxico de las micelas T304 y T904 a partir de concentraciones de 0,1% y 0,02%, respectivamente. Por su parte, puesto que las micelas T1107 y T1307 no resultaron citotóxicas en las concentraciones ensayadas, fueron seleccionadas para vehicular la ftalocianina lipofílica. La Pc9 encapsulada presentó un potente efecto fototóxico con valores de IC_{50} (concentración que inhibe el 50% la viabilidad celular) de $10 \pm 1 \text{ nM}$ (T1107) y $9,5 \pm 0,7 \text{ nM}$ (T1307). La comparación de estos resultados con el efecto de la Pc9 disuelta en DMSO $0,4\%$ ($\text{IC}_{50} 0,12 \pm 0,07 \mu\text{M}$) permite comprobar una mayor efectividad fotodinámica de la forma encapsulada, debido a una menor tendencia a la agregación. Por ensayos de microscopía confocal demostramos que la Pc9 es internalizada al interior celular y se localiza en vesículas lisosomales. En conclusión, la Pc9 es un compuesto fototóxico muy potente, siendo las micelas de poloxamina T1107 y T1307 medios efectivos para su

vehiculización hacia los lisosomas y para optimizar su eficiencia fotodinámica.

023. (72) BLOQUEO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA PARA SUPERAR LA RESISTENCIA AL TRASTUZUMAB

Mercogliano, M.¹; Rivas, M.¹; Venturutti, L.¹; Tkach, M.¹; Cordo Russo, R.¹; Proietti, C.¹; Maronna, E.²; Frahm, I.²; Elizalde, P.¹; Schillaci, R.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Servicio de Patología, Sanatorio Mater Dei²

El ErbB2 está sobreexpresado en ~20% de los cánceres de mama y se asocia con mal pronóstico. Los pacientes son tratados con trastuzumab (T), un anticuerpo monoclonal contra el ErbB2. Sin embargo, sólo el 26-50% de los pacientes responden al T debido a la resistencia intrínseca o adquirida de los tumores al T. En nuestro laboratorio demostramos que el factor de necrosis tumoral α (TNF) induce la transactivación del ErbB2 y bloquea el efecto inhibitorio producido por T en la proliferación de células BT-474 y SK-BR-3 mediante la activación de NF- κ B. En este trabajo exploramos el efecto del bloqueo del TNF sobre la línea celular JIMT-1, que tiene resistencia intrínseca al T. El bloqueo del TNF *in vitro* se realizó con ARNi o con Etanercept (E, proteína de fusión TNF receptor 2-Fc IgG humana). El *binding* de T fue analizado por citometría de flujo. En los experimentos *in vivo*, se inyectaron ratones nude con 3×10^6 células JIMT-1 y fueron tratados con 5 mg/kg E dos veces/semana, 5 mg/kg T una vez/semana, la combinación o con IgG humana. Comprobamos que las JIMT-1 producen TNF maduro y su precursor, mediante Western Blots (WB). En los ensayos *in vivo*, observamos que el crecimiento de los xenoinjertos de JIMT-1 tratados con E o T no mostraron diferencias significativas respecto del control. El tratamiento con E+T redujo el tamaño tumoral en un $54.1 \pm 4.6\%$ ($P < 0.05$), observamos menos mitosis en el análisis histopatológico (H&E) y comprobamos el bloqueo en la activación de la vía de NF- κ B por WB. La inmunohistoquímica de ErbB2 mostró una mayor marcación en los tumores del grupo E+T respecto al resto de los grupos. El bloqueo de TNF *in vitro* indujo un aumento del *binding* de T en JIMT-1. Estos resultados sugieren que el bloqueo de TNF en las células JIMT-1 produce un enriquecimiento de ErbB2 en la membrana plasmática, el cual puede ser bloqueado por T. Esto conforma una prometedora herramienta terapéutica para pacientes resistentes a T que sobreexpresen ErbB2.

024. (142) FACTORES SOLUBLES PROVENIENTES DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO REGULAN LA PROLIFERACIÓN Y TRANSMIGRACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS HUMANAS TUMORALES Y NO TUMORALES. ¿EL PROTEOGLICANO VÉRSICAN INVOLUCRADO EN LOS EFECTOS OBSERVADOS?

Fletcher, S.¹; Sacca, P.¹; Coló, F.³; Fabiano, V.³; Amat, M.³; Pistone Creydt, M.³; Calvo, J.^{1,2}; Pistone Creydt, V.¹

IByME - CONICET¹ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA² Instituto de Oncología "Alexander Fleming"; Buenos Aires, Argentina.³

Las interacciones epitelio-estroma median el desarrollo de la mama, así como la progresión del cáncer. Objetivos: evaluar el efecto de medios condicionados (MCs) de explantos de tejido adiposo humano de mama normal (EANh) y tumoral (EATh) sobre la proliferación de líneas celulares epiteliales mamarias humanas tumorales (MCF-7 e IBH-7) y no tumorales (MCF-10A y HBL100); evaluar la trans migración de las líneas celulares incubadas con los MCs; evaluar cambios en la expresión/localización de vérsican en las células. Se obtuvo tejido adiposo de mama normal y tumoral de pacientes. Se recolectaron MCs de EANh y EATh luego de 24hs de incubación. Se incubaron células MCF-10A, HBL100, MCF-7 e IBH-7 con los MCs por 24 y 48hs a diferentes concentraciones (50% y 75%); se midió la proliferación por MTS. Se evaluó la migración de células incubadas con los MCs utilizando Transwells y la expresión/localización de vérsican por inmunofluorescencia y Western-blot. Resultados: todas las líneas celulares aumentaron

significativamente la proliferación respecto al control ($p < 0,001$) luego de incubarlas 24 y 48hs con MCs-EATH. También aumentó significativamente la proliferación de las líneas celulares tumorales al incubarlas con 75% de MCs-EATH respecto a la incubación con 50% de esos MCs ($p < 0,05$). Los MCs-EATH estimularon la migración de MCF-7 e IBH-7 luego de 18hs de incubación en Transwells ($p < 0,05$). Observamos una localización celular de vérsican en las cuatro líneas celulares incubadas con los MCs de EANH y EATH. La intensidad de fluorescencia total celular aumentó significativamente en las líneas celulares tumorales al incubarlas con los MCs-EATH respecto de MCs-EANH y control. Este aumento de vérsican también se observó por Western blot. Esto sugiere que factores solubles secretados por el tejido adiposo modulan la proliferación y trans migración de células epiteliales mamarias tumorales y no tumorales. El proteoglicano vérsican podría estar involucrado en los efectos observados.

025. (148) LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TUMORAL MAGEB2 CONFIERE A LAS CÉLULAS VENTAJAS PROLIFERATIVAS

Ladelfa, F.¹; Laiseca, J.¹; Toledo, F.¹; Dusetti, N.²; Monte, M.¹
Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA¹ Laboratorio de Stress Celular, U624-INSERM, Marsella, Francia²

La subfamilia MAGE-I está compuesta por los grupos A, B y C, de expresión específica tumoral y alta homología de secuencia. Sin embargo, existen diferencias funcionales entre ellos. En este sentido, demostramos que MageA2 reprime la respuesta proapoptótica de p53 e interfiere sobre la senescencia inducida por PMLIV/p53. Aquí reportamos que MageB2 aumenta la proliferación celular, evidenciada por curvas de crecimiento y cicatrización de herida. Además, las células que expresan MageB2 continúan creciendo en ausencia de nutrientes. Previamente, reportamos que MageB2 activa transcripcionalmente a E2F1. En este trabajo analizamos a E2F2 y E2F3, también implicados en el pasaje de la fase G1 a S del ciclo celular. Nuestros resultados indican que MageB2 induce a E2F2 y E2F3 aún más que a E2F1, y no induce a E2F4, un factor de transcripción represor de la proliferación celular. MageB2, a diferencia de los Mage-A, es una proteína nucleolar. Observamos que MageB3, también de localización nucleolar, activa transcripcionalmente a E2F1, E2F2 y E2F3, efecto no observado con miembros del grupo Mage-A. Mediante la utilización del mutante MageB2ΔNoLS, que carece de secuencia de localización nucleolar, observamos que la activación de los distintos E2Fs no depende exclusivamente de la localización nucleolar de MageB2. Por último, evidenciamos la falta de co-localización e interacción directa MageB2-E2Fs y observamos que la activación de E2F por MageB2 sería independiente de RB pero dependería de la actividad de HDACs. Nuestros datos indican que MageB2 induce a los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3 y confiere a las células ventajas proliferativas. Este efecto podría ser redundante entre miembros del grupo Mage-B. Considerando que las proteínas MAGE se encuentran co-expresadas en tumores, la inhibición de la apoptosis y la senescencia mediada por MageA2, sumada a los efectos proliferativos de MageB2 contribuirían al potencial oncogénico de las proteínas MAGE-I.

026. (186) GALECTINA-1 (GAL-1) INDUCE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL (EMT) DE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO (HCC)

Bacigalupo, M.^{1,2}; Manzi, M.^{1,2}; Elola, M.¹; Wolfenstein De Todel, C.^{1,2}; Rabinovich, G.³; Espelt, M.¹; Troncoso, M.^{1,2}
Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB), UBA-CONICET.¹ Dto de Química Biológica, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA² Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET³

La EMT es un proceso crucial para la progresión del cáncer en el que las células epiteliales adquieren la capacidad de invadir y generar metástasis. En este proceso se alteran interacciones célula-célula, célula-matriz, anclaje y movilidad. Gal-1, proteína con afinidad por β -galactósidos, no se expresa en hepatocitos normales pero su expresión aumenta en el HCC. Previamente

demostramos que Gal-1 promueve la adhesión de células de HCC, HepG2, a la matriz extracelular, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis en nódulos drenantes al tumor. El objetivo de este trabajo fue determinar el rol de Gal-1 en la EMT de células de HCC. Mediante western blot (WB) evaluamos la expresión de cadherina epitelial (cadE) y vimentina (vim, marcador mesenquimal) en células HepG2 wild-type (wt), células que sobre-expresan Gal-1 (HepG2-G2), células con expresión de Gal-1 disminuida (HepG2-siRNA Gal-1) y sus respectivos controles. Células HepG2-G2 expresan niveles inferiores de cadE ($37 \pm 1\%$ $p < 0,05$) mientras que células HepG2-siRNA Gal-1 presentan una expresión del $125 \pm 1\%$ respecto a sus controles. La expresión de vimentina fue de $171 \pm 1\%$ ($p < 0,05$) en células HepG2-G2 y de $63 \pm 1\%$ en células HepG2-siRNA Gal-1 respecto a sus controles. La proteína adaptadora β -catenina presenta una mutación en uno de los alelos en las células HepG2 (delección del dominio de fosforilación por GSKIII β) por lo que las células co-expresan el alelo wt y el mutado. El alelo wt se expresa en menor nivel en las células HepG2-G2 ($69\% \pm 1$, WB) y mediante inmunofluorescencia, se detecta menor expresión en la membrana respecto al control. Además, las células HepG2-G2 presentan mayor capacidad de formar colonias en agar blando ($p < 0,05$). Estos resultados demuestran que Gal-1 altera la adhesión intercelular disminuyendo marcadores epiteliales (cadE, β -cat), favoreciendo el fenotipo mesenquimal (vim) y el crecimiento independiente de anclaje, indicando su papel novedoso en la inducción de la EMT de células de HCC.

027. (215) PERFIL PROTEÓMICO DE LOS INTERACTORES DE HO-1 EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Gueron, G.¹; Valacco, P.²; Elguero, B.¹; Coluccio-Leskow, F.³; Paez, A.¹; De Siervi, A.¹; Vazquez, E.¹
IQUIBICEN-CONICET¹ CEQUIBIEM - Departamento Química Biológica FCEN UBA - IQUIBICEN CONICET² Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Buenos Aires, Argentina³

La etiología del cáncer de próstata (PCa) no es clara, dificultando la prevención temprana. El antígeno prostático específico (PSA) se utiliza como el marcador de detección, sin embargo tiene baja especificidad. Surge la necesidad de encontrar otros marcadores tumorales prostáticos más específicos. La hemo-oxigenasa 1 (HO-1) ejerce funciones anti-oxidantes y anti-inflamatorias. Previamente documentamos su expresión nuclear en carcinomas prostáticos humanos. En líneas celulares de PCa la sobre-expresión de HO-1 indujo su localización nuclear e inhibió la proliferación, migración e invasión y el crecimiento tumoral *in vivo*. Análisis de ChIP demostraron que HO-1 se asocia a promotores de genes relevantes en PCa como PSA. Nuestra hipótesis se basa en que HO-1 en el núcleo podría actuar como un co-regulador de la transcripción favoreciendo un fenotipo menos agresivo. Por tal motivo es importante encontrar los interactores moleculares de HO-1. Para abordar este objetivo empleamos técnicas de proteómica utilizando la proteína recombinante HO-GST expresándola en células PC3. Se purificaron los complejos que co-eluyeron con HO-1 y se corrieron en un gel de poliacrilamida. Las bandas proteicas fueron digeridas con tripsina. Los péptidos se analizaron por MALDI-TOF/TOF (Ultraflex II). Con los espectros obtenidos se generaron lista de picos (Software Flex Analysis) y se realizaron búsquedas con el Mascot, (tolerancia de 200 ppm), utilizando carbamidometilación, acetilación del extremo N-terminal y oxidación, como modificaciones fijas. Se compararon los hits significativos obtenidos para las células identificándose a la proteína muskelina, como candidata a ser interactora de HO-1. Se realizarán estudios de pull-down, para verificar esta interacción y construir el interactoma de HO-1, permitiendo detectar la expresión de proteínas no reportadas aún en células tumorales prostáticas y que pueden surgir como blancos terapéuticos novedosos o factores pronóstico para el PCa.

028. (221) MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN, APOPTOSIS Y SENESCENCIA EN LA LÍNEA DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM38-LP POR EL TRATAMIENTO COMBINADO DE RETINÓIDOS (ATRA) CON INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC)

Berardi, D.; Diaz Bessone, M.; Flumian, C.; Cirigliano, S.; Bal De Kier Joffe, E.; Urtreger, A.; Todaro, L.
Instituto de Oncología Angel H Roffo

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. En el presente trabajo estudiamos A) La modulación de la expresión de las isoformas α y δ de PKC frente al tratamiento con ATRA (1 μ M) y el perfil de receptores retinoideos cuando las células son tratadas con ATRA/inhibidores de PKC α/δ (Gö6976 2,5 μ M /Rottlerina 1 μ M). B) Evaluamos el efecto de la combinación de ATRA e inhibidores de PKC, sobre el crecimiento y la distribución en el ciclo celular *in vitro*. Utilizamos como modelo la línea mamaria murina LM38-LP compuesta por células luminales (LEP), mioepiteliales (MEP) y stem/progenitoras. Observamos por RT-PCR que el tratamiento por 48 hs con ATRA aumento los niveles de PKC δ y disminuimos los de PKC α . Asimismo, el tratamiento con Gö6976 redujo los niveles del receptor RAR γ 2, mientras que su combinación con ATRA incrementó los niveles de RAR β 2. Por otro lado, el tratamiento por 96 hs con ATRA, Gö6976 y Rottlerina o sus combinaciones provoco una disminución del crecimiento en cultivo (células x10⁵: control 22 \pm 1,1; Gö6976 3,6 \pm 0,6; Rottlerina 9 \pm 0,1; ATRA 11 \pm 0,1; ATRA/Gö6976 2,3 \pm 0,03; ATRA/Rottlerina 6,7 \pm 1,3; p \leq 0.05). Mediante citometría de flujo pudimos determinar que tanto el ATRA como la Rottlerina inducen un arresto en la fase G1 del ciclo, mientras que Gö6976 aumenta el porcentaje de células en la fase subG1, hecho que se correlaciona con un aumento de la apoptosis, confirmado por ensayos con Anexina V. Por ensayo de la actividad β -galactosidasa y microscopía de contraste de fase, pudimos determinar que el tratamiento con ATRA induce senescencia principalmente en el componente MEP mientras que el tratamiento con Gö6976 lo hace principalmente sobre la población LEP. Concluimos que la inhibición del crecimiento celular ejercida por los retinoides sería potenciada por la reducción en expresión y/o actividad de PKC α .

029. (223) DETERMINACIÓN DEL VALOR DE REFERENCIA DEL MARCADOR TUMORAL SÉRICO CA-15.3 POR INMUNOENSAYO

Lebensohn, N.¹; Moretto, V.²; Codino, E.¹; Andrin, J.³; Felthaus, G.³; Ghione, G.³; Racca, L.¹; Cipulli, G.²; Capitaine Funes, C.²; Bartoli, A.²; Tozzini, R.²; Di Paolo, O.¹
Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR¹ Hospital Provincial del Centenario² SIEMENS Healthcare Diagnostic S.A³

El cáncer de mama metastásico puede asociarse a un conjunto de antígenos circulantes relacionados específicamente con la masa tumoral, entre ellos una glucoproteína de elevado polimorfismo denominada CA-15.3. La monitorización de un marcador tumoral para la detección de recurrencia, constituye una de las utilidades clínicas más frecuentes de este tipo de moléculas. El objetivo de este trabajo fue establecer los valores de referencia (VR) para el marcador tumoral CA-15.3, en mujeres pre y post menopáusicas con y sin diagnóstico de cáncer de mama. Se trabajó con muestras de suero (n= 134) provenientes de mujeres libres de patología mamaria (grupo control) y mujeres con patología mamaria (n=49). Se determinaron los niveles de CA-15.3 mediante la metodología desarrollada por la empresa SIEMENS Healthcare Diagnostic S.A. (Sistema automatizado ADVIA Centaur): inmunoensayo tipo sandwich en dos pasos, con detección por quimioluminiscencia directa. Los valores de referencia, definidos sobre la base del percentil 95 fueron los siguientes: mujeres premenopáusicas sin patología VR=25 U/ml y postmenopáusicas VR=26.4 U/ml. En las mujeres con diagnóstico definitivo de cáncer pre menopáusicas VR=34.0U/ml y post menopáusicas VR= 33.6 U/ml respectivamente. El valor de la mediana obtenido para CA-15.3 en el grupo control es significativamente mayor en las mujeres post menopáusicas que en las pre menopáusicas (p<0.005. Test de Mann Whitney). No se encontraron diferencias significativas en los valores de las medianas del marcador estudiado entre las pacientes con cáncer pre y post menopáusicas, como tampoco

entre las mujeres pre menopáusicas y post menopáusicas del grupo control y con patología (p>0.10). Consideramos que es de importancia clínica conocer los VR del marcador CA-15.3 según el estado menstrual de la población en estudio y de acuerdo a la metodología empleada. Cada laboratorio debe determinar sus propios rangos de referencia para el seguimiento de las pacientes.

030. (233) ESTUDIO DE MECANISMOS DE DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN INDUCIDOS POR LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN TIROIDES

Rodriguez, C.¹; Carpano Marina¹; Perona Marina¹; Thorp Silvia¹; Curotto Paula¹; Pozzi Emiliano¹; Casal Mariana²; Juvenal Guillermo¹³; Pisarev Mario¹³; Dagrosa Alejandra¹³
Comisión Nacional de Energía Atómica¹ Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo" -UBA² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³

En trabajos anteriores hemos comenzado a estudiar los mecanismos de daño y reparación inducidos por BNCT en células tumorales de tiroides. Demostramos una diferencia en los patrones de genotoxicidad en células irradiadas con radiación gamma, con neutrones solos, con neutrones más boronofenilalanina (BPA). El conocimiento de los mecanismos de daño y reparación activados por BNCT permitiría manipular la respuesta del tumor a la terapia. El objetivo de estos estudios fue analizar en células tumorales tiroideas irradiadas y la expresión de los transcritos de Ku70, Rad51 y Rad54, BRCA1 proteínas de las vías de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (HRR) respectivamente. **Materiales y Métodos:** se utilizaron células de la línea de carcinoma folicular de tiroides humano (WRO) en fase de crecimiento exponencial. Estas células fueron distribuidas en los siguientes grupos: 1) BPA (10 μ g¹⁰B/ml) + neutrones; 2) Neutrones solos; 3) Rayos gamma. Un grupo control para cada tratamiento fue incluido. Las células fueron irradiadas en la facilidad de la columna térmica del reactor RA-3 (fluencia= 1.10¹⁰ n/cm² sec) o con una fuente de ⁶⁰Co. Las irradiaciones se llevaron a cabo en diferentes lapsos de tiempo a fin de obtener una dosis física total entre 1-5 Gy (\pm 10%). La expresión de los ARNm de Ku70, Rad51, Rad54 y BRCA1 fue analizada mediante transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR) a diferentes tiempos (2, 4, 6, 24 y 48 h). **Resultados:** La expresión de Rad51 aumentó a las 2 horas post-irradiación y persistió hasta 6 h solo en el grupo neutrones y neutrones + BPA (p<0.05). Rad54 aumentó su expresión entre las 2 y las 24 h en ambos grupos irradiados con neutrones (con y sin BPA) (p<0.05) y BRCA1 muestra un máximo de expresión a las 24 h en el grupo neutrones + BPA (p<0.01), indicando que la vía HRR es la que se activa en las células tumorales de tiroides irradiadas con neutrones con y sin boro. Por otro lado, los niveles del transcripto de Ku70 no se vieron modificados en los grupos irradiados respecto al control. **Conclusión:** Estos resultados indicarían una activación de la vía HRR en las células de carcinoma de tiroides tratadas con BNCT para la reparación del ADN dañado. La vía NHEJ no varió en las células irradiada respecto a las no irradiadas.

031. (235) LOS ELEMENTOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL MODULAN LA POBLACIÓN CON CARACTERÍSTICAS "STEM" EN MODELOS DE CÁNCER DE MAMA MURINO Y HUMANO

Raffo, D.; Sampayo, R.; Berardi, D.; Todaro, L.; Bal De Kier Joffe, E.; Simian, M.
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"

El 75% de los tumores de mama son positivos para receptor de estrógeno y el tamoxifeno es la terapia más utilizada, sin embargo, 1/3 de las pacientes desarrolla resistencia. Demostramos previamente que la fibronectina, laminina y medio condicionado de fibroblastos generan resistencia al tamoxifeno en modelos murinos y humanos. Por otro lado, se postula que las células "stem" podrían ser iniciadoras del desarrollo tumoral siendo capaces de dar lugar a las distintas poblaciones del tumor y tendrían

una menor susceptibilidad a los tratamientos clásicos como la quimio y radioterapia. El objetivo fue estudiar los efectos de los elementos del microambiente tumoral sobre las poblaciones con propiedades stem. Utilizamos dos técnicas en las líneas celulares LMO5-E murina y la MCF7 humana. Primero estudiamos mediante ensayos de mamíferas la capacidad de autorrenovación de las células con propiedades stem y luego la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1). Para los primeros, luego de pretratamientos de 2 días con laminina, fibronectina o vehículo se sembraron 10000 células en placas de 6 wells no adherentes con medio de mamíferas (DMEM/F12 con B27 y EGF) y se contó el número de esferas a los 7 días. Para ALDH1 se utilizó el kit ALDEFLUOR® que permite cuantificar la actividad de esta enzima en las células luego de realizar los mismos pretratamientos explicados anteriormente. Como resultado de estos experimentos se observó que tanto la fibronectina, la laminina y el medio condicionado disminuyeron la capacidad de formar mamíferas en ambas líneas celulares ($p < 0,01$) incluso hasta un mes después de interrumpido el tratamiento ($p < 0,01$). También llevaron a una reducción en el porcentaje de células ALDH positivas en la línea LM05-E ($p < 0,05$). Concluyendo, existe una regulación por parte del microambiente tumoral sobre la población con características stem; queda por delante adentrarse en los mecanismos involucrados en esta regulación.

INFECTOLOGÍA

032. (50) ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN INTRACELULAR Y PARTICIPACIÓN DE LAS RIBONUCLEOPROTEÍNAS HETEROGÉNEO-NUCLEARES A2 Y K DURANTE LA INFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES CON LOS VIRUS HEMORRÁGICOS JUNÍN O DENGUE TIPO2

Brunetti, J.; Scolaro, L.; Castilla, V.

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA

Las ribonucleoproteínas heterogéneo-nucleares (hnRNPs) son proteínas de unión a ARN predominantemente nucleares. Se ha demostrado que diversos virus provocan la acumulación de estos factores en el citoplasma y los utilizan para su replicación. Los virus Junín (JUNV) y Dengue (DENV) representan un serio problema sanitario en nuestro país, siendo ambos virus con genoma ARN, que replican en el citoplasma de la célula hospedadora. El objetivo de este trabajo fue analizar la localización intracelular y participación de las hnRNPs A2 y K en células infectadas con DENV y JUNV. Se analizó, mediante inmunofluorescencia (IF), la localización intracelular de hnRNP K en células Vero o A549 infectadas con DENV o JUNV a distintos días post-infección (dpi), y en células Vero persistentemente infectadas con JUNV (V3). Se determinó que en células Vero hnRNP K transloca del núcleo al citoplasma a los 5dpi y 7dpi para DENV y JUNV respectivamente. En células A549 sólo se detectó translocación de hnRNP K en los cultivos infectados con DENV a los 5 dpi. No se detectó acumulación de hnRNP K en el citoplasma de células V3. En ningún caso se observó translocación al citoplasma de hnRNP A2. La acumulación de hnRNP K en el citoplasma de células Vero infectadas con DENV se corroboró infectando células transfectadas con un plásmido que permite la sobreexpresión de hnRNP K. Se evaluó el efecto del silenciamiento de hnRNP K, utilizando ARN de interferencia (siRNA), sobre la replicación de DENV y JUNV en células A549. Se demostró que dicho silenciamiento inhibe la producción de ambos virus, determinado por el método de UFP y el número de células infectadas, reveladas por IF. Nuestros resultados muestran que el cambio en la localización intracelular de hnRNP K inducido por la infección con JUNV o DENV depende del tiempo de infección y del tipo celular, mientras que la distribución hnRNP A2 no fue alterada. Demostramos además que hnRNP K es necesaria para la multiplicación de ambos virus.

033. (108) SEROPREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI EN CINCO PARAJES DEL "MONTE IMPENETRABLE" DE LA PROVINCIA DE CHACO

De La Vega Elena, C.¹⁴; Peralta, E.¹⁵; Baigorri, E.³; Pugliesi, M.¹⁵; Baquío, M.⁵; Frontini, A.¹; Montagne, A.¹³; Cerana, A.⁸; Montagne, J.⁶; Casella, E.⁸; Ricci, P.⁶; Pallas, H.⁶; Chialina, S.⁴; Solis, E.⁴; Venera, G.¹²

Instituto Universitario Italiano de Rosario IUNIR¹ IQUIFIB, FFyB, UBA; CONICET² ONG SOS ABORIGEN³ STEM SRL⁴ Instituto de Bioquímica Clínica de Rosario⁵ Alumnos del IUNIR⁶

Durante el mes de agosto de 2011 se realizó el relevamiento serológico para la enfermedad de Chagas en cinco comunidades rurales aisladas del "Monte Impenetrable" de la Provincia del Chaco: el Techat, las Hacheras, Miraflores, Campo Medina y Tres Lagunas, ambiente que reúne condiciones de alto riesgo para contraer la enfermedad. Se analizaron muestras de suero de 350 individuos por hemaglutinación indirecta (Chagatest HAI, Wiener lab), ELISA recombinante (Chagatest ELISA recombinante, Wiener lab) y ELISA Lisado (Chagatest Elisa lisado, Wiener lab). Se consideraron positivas las muestras reactivas por al menos dos técnicas serológicas. Se obtuvo evidencia serológica de infección por *Trypanosoma cruzi* en 172 (49,14 %) de los 350 individuos estudiados. La prevalencia fue de 5,26% en el grupo etario de 1-5, de 36,76% en el de 6-15 años, de 58,88% en el de 16-30 años, de 63,64% en el de 31-45 años y de 70,73% en mayores a 46 años. La seroprevalencia global en las poblaciones toba y wichi fue mayor que en la población criolla (53,10 vs. 38,04%, $p < 0,01$). La prevalencia en el grupo etario de 1-5 años resultó significativamente menor respecto a los demás grupos y a estudios anteriores en la región (5,26 vs. 53,85%, $p < 0,001$). La misma tendencia se observó en el grupo etario de 6-15 años (27,94 vs. 45,83%, $p < 0,01$). Los datos obtenidos - comparados con un estudio previo llevado a cabo en poblaciones vecinas en 1999-2000 (Biancardi y col; Medicina 2003; 63: 125-129) - indican una disminución marcada de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en el grupo etario 1-5 años, probablemente como consecuencia de la implementación de tareas de control vectorial.

034. (170) DHEA INHIBE AL VIRUS DEL SARAMPIÓN MEDIANTE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE SU CAPACIDAD DE MODULAR LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RAF/MEK/ERK

Torres, N.; Quintana, V.; Castilla, V.; Wachsmann, M.

Lab. de Virología. Depto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

El virus del sarampión (MV) es un patógeno humano miembro de la familia Paramyxoviridae. Durante el transcurso de la enfermedad los pacientes pueden desarrollar fiebre, tos, rash cutáneo e inmunosupresión transitoria y aunque generalmente la infección es controlada por el sistema inmune, en algunos casos la inmunosupresión puede ser severa y dar paso a enfermedades oportunistas. A pesar de la existencia de una vacuna efectiva, el sarampión sigue siendo muy frecuente y es responsable de la muerte de 16 niños por hora. En la década pasada numerosos brotes en Europa y Norteamérica dieron un nuevo ímpetu a la investigación de este virus. En este trabajo estudiamos la actividad antiviral de DHEA por su actividad sobre otros virus y la inexistencia de antivirales contra MV. Además, dado que DHEA activa la vía de señalización de Raf/MEK/ERK, analizamos su posible rol en la infección de MV y en la actividad de DHEA. Para ello, con un ensayo de reducción del rendimiento viral se determinó la actividad antiviral de DHEA, del inhibidor de ERK UO126 y del activador anisomicina. Asimismo, se estudió el paso de multiplicación afectado por DHEA y su posible efecto virucida. Para analizar el efecto de MV sobre la vía de señalización se siguió mediante western blot la fosforilación de ERK durante 22 hs. Además se analizó con inmunofluorescencia la acción de los compuestos sobre el efecto citopático de MV. Encontramos que DHEA y UO126 inhiben fuertemente la multiplicación de MV y previenen el efecto citopático. Asimismo, hallamos que la unión del virus al receptor celular desencadena la fosforilación de ERK, que se mantiene durante 7 hs. Nuestros resultados sugieren que DHEA inhibe etapas tardías de la multiplicación y que su actividad

no estaría relacionada con su capacidad de modular la vía de Raf/MEK/ERK. El descubrimiento del rol de esta vía de señalización en la multiplicación del virus podría ser el primer paso para el desarrollo de nuevas terapias contra MV.

035. (188) NOVEDOSA ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA DE UNA BACTERIOCINA AISLADA DE BACILLUS AMYLIQUEFACIENS

Quintana, V.; Torres, N.; Castilla, V.; Wachsmann, M.
Lab. de Virología, Depto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) son virus humanos de la familia Herpesviridae. HSV-1 está generalmente asociado a enfermedades orofaciales y genitales, mientras que HSV-2 la causa más frecuente de úlceras genitales. El desarrollo de nuevos antivirales es importante ya que en inmunosuprimidos es frecuente hallar resistencia al antiherpético de referencia aciclovir (ACV) y porque el tratamiento de la infección no disminuye el riesgo de contagio de HSV. La subtilosina (SUB) es un péptido cíclico de 35 aminoácidos producido por *Bacillus amyliquefaciens* y *subtilis*. Debido a sus propiedades antimicrobianas frente a distintos patógenos se decidió estudiar la actividad antiherpética de SUB y su mecanismo de acción. Se evaluó la citotoxicidad de SUB, ACV y foscarnet (FOS), un antiviral usado en casos de resistencia a ACV) y con un ensayo de reducción del rendimiento viral se determinó la actividad antiviral frente a cepas wild type y resistentes a ACV de HSV-1 y 2. Se estudió además su posible efecto virucida y la etapa afectada del ciclo de multiplicación utilizando ensayos de agregados a distintos tiempos de SUB, western blot e inmunofluorescencia. Se encontró que SUB en concentraciones no citotóxicas (200 µg/mL) posee un efecto virucida frente a HSV-1 y 2. SUB en concentraciones menores a 100 µg/mL previene el efecto citopático causado por HSV y es un potente antiviral, particularmente sobre cepas wild type y resistentes (actividad 2,2 veces mayor que el FOS). Los resultados obtenidos indican que como antiviral SUB no afecta pasos previos a la síntesis de proteínas sino que inhibiría etapas tardías del ciclo de multiplicación. Estos resultados promueven el estudio de subtilosina como posible antiviral para HSV, ya que la misma es de fácil obtención debido a la ubicuidad de las bacterias productoras. Por eso, es importante a futuro realizar más ensayos para dilucidar con mayor precisión el mecanismo de acción antiviral del compuesto.

036. (329) EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE VITAMINAS B12 Y C CON BENZNIDAZOL EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Martínez, M.¹; Puente, V.¹²; Frank, F.³; Batlle, A.²; Lombardo, E.¹²

Dto. Química Biológica- FCEN-UBA¹ Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, CIPYP (UBA-CONICET), Hospital de Clínicas J² Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Cátedra de Inmunología, IDEHU (UBA-CONICET),³

La enfermedad de Chagas no cuenta con una terapéutica apropiada. El actual tratamiento con Benznidazol (Bnz), posee una eficiencia limitada y significativa citotoxicidad. Recientemente reportamos la actividad anti-*T. cruzi* de la vitamina B₁₂. En este trabajo evaluamos el efecto de la Vit C, así como otros agentes reductores (R) y su combinación con B₁₂ *in vitro* sobre epimastigotes. Tanto ácido ascórbico (Vit C), como Trolox y ditiotreitól (DTT) mostraron significativa actividad antiparasítica con valores de IC₅₀ de 4,27; 6,48 y 2,46 µM (todos con p<0,05) respectivamente. En presencia de B₁₂ (3 µM) estos compuestos aumentan su poder inhibitorio 30, 3 y 9 veces respectivamente. Analizamos luego en un modelo murino de esta enfermedad la utilidad de la administración de las Vitaminas B₁₂ as solas y combinadas entre sí y con Bnz: En el pico de la parasitemia, los ratones tratados con B₁₂ (1,5mg/kg/día) disminuyeron casi un 50% el número de parásitos circulantes (2,23±0,28 x10⁶ vs Control: 4,18±0,02 x10⁶ parásitos/ml). Esta reducción fue casi un 50% mayor con la administración simultánea de Vit C (1,5mg/kg/día). Incluso empleando la mitad

de la dosis de ambas vitaminas, esta disminución fue del 60%. Considerando el área bajo la curva, el número de parásitos circulantes disminuyeron un 43,9%; y 58,6% y en los ratones tratados con ambas vitaminas, o Bnz (0,75 mg/kg/día) respectivamente, alcanzando un 64,6% al combinar los tratamientos (p<0,01). Estos valores se reflejaron en la sobrevida de los animales. El 83,3% de los ratones que recibieron tratamiento combinado de Bnz + Vit B₁₂ y C sobrevivió hasta el final de la experiencia (100 dpi), mientras que los animales control murieron entre el día 14 y 28 pi. Concluimos que el tratamiento con las vitaminas solas o con Bnz podría ser consideradas al momento de diseñar nuevas modalidades terapéuticas para la enfermedad de Chagas.

037. (354) EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EN MUJERES GRÁVIDAS: RIESGOS DE TRANSMISIÓN MATERNO-FETAL

López Ferrucci, M.¹; Girgulsky, L.¹; Felici, M.¹; Cohen, E.²; Morin, A.²; Mauro, J.²; Eiguchi, K.¹
Universidad del Salvador, Facultad de Medicina¹ Hospital G.A. "C.G. Durand". Servicio de Tocoginecología – Unidad materno-infantil²

Existen evidencias que sugieren la transmisión hematogénica del Papilomavirus Humano (HPV), lo cual podría tener implicancias en la transmisión materno-fetal del virus. Las vías de esta transmisión no han sido elucidadas, siendo de importancia para las estrategias de vacunación, para el manejo clínico de pacientes infectadas y sus futuros neonatos y para el estudio del posible potencial oncogénico de este virus en niños. **O:** Aumentar el conocimiento sobre el modo y riesgo de transmisión vertical de HPV en mujeres grávidas. **M:** Se analizaron (i) 81 muestras de sangre periférica (Control G1 n=14, CIN I G2 n=18, CIN II/III G3 n=20, Carcinomas G4 n=30) de mujeres no grávidas, y (ii) 37 muestras de mujeres con lesiones cervicales (n=20) y sin ellas (n=17) cursando el tercer trimestre de embarazo y sus neonatos (muestras de cérvix, placenta fetal/materna, secreciones nasales y bucales neonatales, sangre periférica materna y sangre de cordón umbilical). Se determinó presencia de genoma HPV consenso, y se tipificaron los tipos 6, 11, 16 y 18. **R:** En el grupo (i) se observaron frecuencias significativamente mayores de ADN Viral en el grupo G4 con respecto al G1 (G1vs G4 p<0.07). En el grupo (ii) 15 pacientes grávidas con lesiones presentaron genoma HPV en cérvix. Los tipos más frecuentes fueron 16 (7/16) y 18 (2/16). En 5 muestras no observamos amplificación de los tipos estudiados, pudiendo estar infectados con otros subtipos. Se observó ADN viral en 5 muestras de sangre periférica materna, 3 muestras de sangre de cordón umbilical y 1 de secreciones bucales. **D:** La presencia de ADN viral en sangre de pacientes con CC observada en nuestros resultados, es científicamente prometedora y requiere de mayor investigación para lograr resultados fehacientes. Distintos autores sugieren que las células mononucleares serían los carriers y podrían diseminar el virus a través de la sangre, por lo que se continúa investigando sobre la naturaleza del ADN encontrado en éstas muestras.

038. (365) FOTOSENSIBILIZACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS INDUCIDA POR EXTRACTOS DE ORIGEN VEGETAL

Gándara, L.¹; Mamone, L.¹; Dotto, C.²; Rodríguez, L.¹; Di Venosa, G.¹; Batlle, A.¹; Buzzola, F.²; Casas, A.¹
CIPYP Htal de Clínicas UBA¹ Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA²

Una alternativa al control de las infecciones estafilocócicas consiste en la aplicación de la terapia fotodinámica, la cual combina la acción de un fotosensibilizante no tóxico y la luz visible. En nuestro laboratorio se realizó un "screening" sobre 100 muestras de plantas autóctonas, en búsqueda de nuevos fotosensibilizantes, identificando varias especies vegetales capaces de inactivar bacterias Gram positivas. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la capacidad de fotoinactivar *Staphylococcus aureus* cepa RN6390 mediante el uso de extractos de especies vegetales previamente

clasificadas como potenciales fotosensibilizantes. Se empleó además el fotosensibilizante sintético Azul de Toluidina. Como fuente de luz se utilizó un arreglo de cuatro tubos fluorescentes con un espectro de luz entre 350 y 800 nm. Se iluminaron placas de 24 pocillos conteniendo la suspensión bacteriana preincubada en oscuridad durante 10 min con el fotosensibilizante y la viabilidad se determinó mediante plaqueo en placas de agar tripteína de soya. La fotoinactivación luego de 3 horas de irradiación con extracto de flor de *Solanum verbascifolium* (0,5 mg/ml), así como con raíz de *Cissus verticillata* (0,5 mg/ml), indujo una disminución de 6 órdenes de magnitud. Con hoja de *Scutia buxifolia* (0,01mg/ml) se observó una reducción en 2 órdenes de magnitud, mientras que la reducción observada con hoja de *Combretum fruticosum* (0,005 mg/ml) no resultó estadísticamente significativa. El tratamiento con el fotosensibilizante sintético Azul de Toluidina (5 µM) indujo una disminución de 7 órdenes de magnitud en las UFC/ml. La principal conclusión es que el patógeno *S. aureus* es susceptible a la fotoinactivación mediada tanto por fotosensibilizantes naturales como sintéticos, lo cual resulta de particular interés para la aplicación de un tratamiento fotodinámico sobre cepas de *S. aureus* metilino resistentes, especialmente en sitios donde se pueda acceder con luz láser acoplada a una fibra óptica.

039. (387) INHIBICIÓN BACTERIANA POR EXTRACTOS DE PLANTAS AUTÓCTONAS ARGENTINAS

Mamone, L.¹; Gandara, L.¹; Casas, A.¹; Rodriguez, L.¹; Batlle, A.¹; Buzzola, F.²; Di Venosa, G.¹

Centro de Investigaciones de Porfirinas y Porfirias CONICET¹ Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina, UBA²

La aparición de resistencias a antibióticos en cepas responsables de enfermedades infecciosas hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos. Las especies vegetales son una fuente de compuestos medicinales que pueden dar respuesta a este problema. En este trabajo, realizamos una colección de 70 extractos vegetales de plantas autóctonas, a partir de extracciones con metanol y agua con el objetivo de encontrar nuevas especies bactericidas. Para ello determinamos la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) sobre *Staphylococcus epidermidis*. Observamos que 11 de los extractos fueron inhibitorios de crecimiento bacteriano. Los mismos pertenecieron a las especies: *Collaea argentina*, *Combretum fruticosum*, *Lochnera australis*, *Jacaranda mimosifolia*, *Prunus subcoriacea*, *Prunus cerasifera* y *Scutia buxifolia*.

Extracto (parte, solvente)	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)
C. argentina (hoja, metanol)	2,5	2,5
C. fruticosum (hoja, agua)	5	7,5
C. fruticosum (hoja, metanol)	2,5	5
L. australis (flor, agua)	10	10
L. australis (flor, metanol)	5	7,5
L. australis (hoja, agua)	5	10
L. australis (hoja, metanol)	5	5
J. mimosifolia (flor, agua)	2,5	2,5
P.s subcoriacea (hoja, metanol)	10	>10
P. cerasifera (hoja, metanol)	5	7,5
S. buxifolia (hoja, metanol)	1,75	2,5

Estos extractos se probaron además en las especies *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. Coli* y *P. aeruginosa*.

Los resultados obtenidos indican la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana en nuestros extractos. Es necesaria su purificación y aislamiento para continuar con la investigación de su efectividad comparada a otras drogas, y sus vías de acción.

040. (404) INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA DE TRYPANOSOMA CRUZI POR EL TRATAMIENTO CON UNA AMINOPORFIRINA

Martínez, M.¹; Randazzo, L.¹; Durantini, E.²; Fukuda, H.^{1,2}; Batlle, A.³; Lombardo, E.^{1,3}

Dto. Química Biológica- FCEN-UBA¹ Dto. de Química, FCE-FQYN, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina² Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, CIPYP (UBA-CONICET), CABA, Argentina³

Las porfirinas son citotóxicas debido a que generan especies reactivas de oxígeno, cuando se irradian con luz visible. El oxígeno singulete, es el principal responsable de la pérdida de funcionalidad celular. Altas concentraciones de hemina ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*, en este trabajo evaluamos el efecto *in vitro* de una porfirina sintética, 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (A4) sobre los estadios epi y tripomastigote. Debido a su estructura, A4 interactúa con la membrana celular. Estudios *in vitro* mostraron para epimastigotes un valor de IC₅₀ de 10,04±0,50 µM (p<0,05), similar al del benznidazol tomado como droga de referencia (7,40±0,45 µM, p<0,05). Sobre tripomastigote el efecto de A4 se evaluó con y sin una irradiación de 15 minutos luego del agregado de la droga. Los parásitos no irradiados mostraron un IC₅₀ de 11,64±0,48 µM mientras que luego de la irradiación, fue menor de 11,6 nM (p<0,05). Debido a la efectividad de A4 como potente agente tripanomicida, postulamos su utilización en bancos de sangre para minimizar la propagación del parásito transfusiones. Establecido un método eficiente de cuantificación de A4, investigamos su estabilidad en distintas condiciones. Al tratar sangre entera con A4 e irradiación, los glóbulos rojos no se dañaron y no detectamos vestigios de la porfirina ni en plasma ni glóbulos rojos. Descartada la interacción de A4 con la albúmina, postulamos que A4 posiblemente sea fagocitada por macrófagos después de ejercer su acción tripanocida. La citotoxicidad de la porfirina, ensayada sobre células Vero, arrojó una concentración 50% citotóxica de 22,1 µM y 267,4 µM (p<0,05) para células tratadas con y sin irradiación, respectivamente. Este estudio nos permitiría postular a A4 como un candidato, con acción antiparasitaria, para el tratamiento de contaminada con *Trypanosoma cruzi*.

041. (436) LA PROTEINA OSMY DE ESCHERICHIA COLI ENTEROAGREGATIVA ESTA INVOLUCRADA EN EL PATRON DE ADHESIÓN A LAS CELULAS HEP-2

Almirón, M.¹; Sanjuan, N.²

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. UNSAM-CONICET¹ Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.UBA²

La *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) es un patógeno emergente asociado a casos de diarrea persistente. La prueba de referencia para su diagnóstico es la forma de adhesión a células Hep-2. El patrón característico es el de adhesión agregativa (AA), diferente al de adhesión difusa o localizada que presentan otras categorías. La identificación de los genes que codifican para las fimbrias de adhesión no siempre se correlacionan con el patrón AA. Se supone que existen otros factores involucrados en la adhesión celular. La búsqueda de proteínas de superficie expresadas sólo en cepas de EAEC aisladas de humanos nos llevó previamente a la identificación de OsmY. Su localización demostrada por inmunomarcación ultraestructural junto a la presencia de dos dominios en su secuencia característicos de unión a membrana fosfolipídica nos llevó a planteamos la posibilidad de que OsmY estuviese involucrada en la adhesión de EAEC. Por lo tanto, se amplificó por PCR y clonó al gen *osmY* de la cepa prototipo de EAEC 17-2 (wt); se le insertó un cassette de kanamicina y la mutación fue llevada al cromosoma por recombinación homóloga. El mutante 17-2*osmY*, confirmado por PCR, presentó el mismo fenotipo de agregación que la cepa salvaje en cultivos líquidos bacterianos. Se realizaron ensayos clásicos de infección a células Hep-2 utilizando una m.o.i de 100 con cultivos de la cepa wt y *osmY* y se realizaron estudios cuali y cuantitativos de adhesión e invasión. El recuento de bacterias asociadas a las células Hep-2 e incluso las que invadieron no mostraron diferencias significativas entre el wt y el mutante, pero sí hubo diferencias en la forma en que se adherieron. La observación microscópica mostró el patrón AA para las células wt y el de adhesión difusa para el mutante. Esto se observó tanto en la adherencia a las células como al vidrio, lo cual estaría sugiriendo

que OsmY está involucrada en el modo de adhesión agregativa característica de esta cepa.

042. (450) CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO INTRACELULAR DE BORDETELLA PERTUSSIS

Lamberti, Y.¹; Schmidt, F.²; Massillo, C.¹; Valdez, H.¹; Rodríguez, M.¹

CINDEFI¹ Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, EMA-University of Greifswald²

Trabajos previos de nuestro grupo indican que *B. pertussis* (*Bp*), agente causal de la tos convulsa, es capaz de sobrevivir y multiplicar en macrófagos permaneciendo en compartimientos con características de endosomas tempranos. El objetivo de este trabajo fue avanzar en la caracterización de los factores involucrados en la adaptación a la vida intracelular mediante el estudio del proteoma intracelular de *Bp*. Para ello, células THP-1 diferenciadas a macrófagos fueron infectadas con *Bp*. Se tomaron muestras a las 2 y 48 hs post infección. Las bacterias intracelulares se aislaron en gradiente de sacarosa y se analizaron mediante nano-HPLC acoplada a un espectrómetro de masa (MS/MS). Se comparó el proteoma de *Bp* intracelular con de las bacterias infectantes (bacterias extracelulares). La cuantificación relativa se realizó por análisis de cuentas espectrales y las proteínas diferencialmente expresadas fueron identificadas aplicando el t-test de Student ($p < 0.05$). De un total de 1244 proteínas identificadas, se encontraron 114 proteínas reguladas positivamente en las muestras intracelulares respecto a las bacterias infectantes, mientras que 118 se encontraron reguladas negativamente. En particular, se observó una marcada inducción de la expresión de proteínas involucradas en la respuesta al stress, cuya actividad ha sido demostrada relevante para la adaptación al entorno intracelular de otros patógenos. Entre ellas se encuentran HslU, ClpX, GroEL, GroES y DnaK. A su vez, al menos dos proteínas relacionadas con el metabolismo de Fe están sobre-expresadas, BfrE y BfrD, receptores involucrados en la adquisición de Fe a partir de transferrina, sugiriendo esta fuente de Fe en el fagosoma. Estos estudios representan la primera caracterización del fenotipo intracelular de *Bp* y sugieren que ésta bacteria es capaz montar una respuesta adaptativa que le permite adaptarse a las condiciones de estrés y limitación de nutrientes encontradas en el entorno fagosomal.

043. (567) RESPUESTA A LA REINFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS EN UNA LÍNEA RESISTENTE DEL MODELO MURINO CBI-IGE

Indelman, P.¹; Codina, A.²; Bertorini, G.¹; Di Masso, R.^{2,3}; Vasconi, M.^{1,2}; Hinrichsen, L.^{2,3}

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR¹ Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR² CIC-UNR, Universidad Nacional de Rosario³

La endemidad estable en las infecciones parasitarias es el resultado de un proceso dinámico de reinfecciones repetidas. La frecuencia de éstas en la población dependerá de la presión de infección y de la susceptibilidad del hospedero. Los estudios sobre reinfección en trichinellosis, causada por *Trichinella spiralis* (Ts), son pocos. Si bien los eosinófilos (Eo) colaboran en la defensa contra el parásito, no hay acuerdo sobre el rol de los mismos en el control de la reinfección. Con el objetivo de analizar el comportamiento en la reinfección de una línea de ratones "resistente" a Ts y las modificaciones en Eo que la acompañan, ratones de ambos sexos de la línea CBI/L (colonia CBI/IGE, n=8 por sexo y fecha de sacrificio) se infectaron con 2 larvas L1 de Ts por g de peso corporal y se re-infectaron con la misma dosis a los 33±3 días de la primoinfección. A los 3, 6 y 13 días post-infección (p-i) o reinfección (p-ri) (fase intestinal) se determinaron el número de parásitos adultos intestinales (nPA) y la fecundidad de la hembra Ts (Fh); a los 30 días p-i o p-ri (fase muscular) se estimó la carga parasitaria (CP). El porcentaje de Eo circulantes se midió previo al desafío con el parásito (basal) y a los 3, 6, 13 y 30 días p-i y p-ri. No se observaron diferencias atribuibles al sexo en la infección ($P > 0.05$). En la reinfección, nPA en el día 3 fue menor

en las hembras que en los machos (mediana; hembras: 13, machos: 20; $P = 0.03$). La expulsión de los parásitos fue más rápida en la reinfección ya que a partir del día 6 p-ri no se encontraron parásitos adultos en el intestino (mediana; nPA 6 p-i: 13, nPA 6 p-ri: 0; $P < 0.0001$). CP en la reinfección fue mayor en ambos sexos pero este aumento sólo fue significativo en los machos (media±EE; CPi: 132±19,2, CPri: 235±20,4; $P = 0.003$). Eo a los 3 y 6 días p-i y a los 3 días p-ri fue menor que Eo basal ($P < 0.001$). La rápida recuperación de Eo en la reinfección estaría asociada a la resistencia en esta línea de ratones.

044. (750) ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA ARTESANAL DE EXTRACCIÓN DE ADN EN MATERIA FECAL PARA DIAGNÓSTICO DE STRONGYLOIDES STERCORALIS

Repetto, S.¹; Alba Soto, C.¹; Tekiel, V.²; González Cappa, S.¹ Instituto Nacional de Microbiología y Parasitología Médica, UBA- CONICET¹ Instituto Nacional de Microbiología y Parasitología Médica, UBA- CONICET² IUNSAM³

El diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* (*Ss*) es por observación directa de larvas en heces (H) por métodos convencionales y cultivo en agar nutritivo (CAN). Su sensibilidad es baja y por ello las técnicas moleculares son útiles. Éstas utilizan kits comerciales para la extracción de ADN que no siempre son eficientes para nematodos por su estructura cuticular y los inhibidores presentes en las H. Nosotros estandarizamos un método artesanal (MetArt) de extracción de ADN para una PCR diagnóstica de *Ss* en H. Aquí comunicamos la sensibilidad analítica (SA) de la PCR utilizando como templado ADN obtenido por el MetArt comparado con un kit comercial.

Materiales Y Metodos: Para determinar la SA se purificó ADN de muestras con 1 larva/ gH utilizando en paralelo el MetArt y un kit comercial. Para el 1ro. las muestras se incubaron en GTES (glicina, SDS, Tris/HCL, EDTA) con posterior lisis mecánica por congelación/ descongelación – sonicación. Luego se incubaron en buffer de lisis (EDTA, NaCl, Tris y SDS, proteínasas K) y realizó extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y precipitación con etanol 100%. La pureza del ADN se estableció por espectrofotometría. La PCR se realizó con un cebador dirigido contra el gen 18S de rRNA de *Ss* y como templado diluciones en diez de las muestras de ADN obtenidos por ambos métodos. Luego se evaluó la PCR en H de 17 pacientes con diagnóstico de strongiloidosis por CAN. Resultados: El límite de detección de la PCR fue de 10⁻² larvas /gH cuando el ADN se extrajo con el MetArt y de 1larva /gH con el kit comercial. Para ambos la relación 260/280 fue 1,7-1,8. La PCR fue positiva en los 17 pacientes con el templado de ADN artesanal y solo en 7 cuando se utilizó el ADN obtenido por el kit comercial. **Conclusiones:** El tratamiento de las muestras con GTES y posterior lisis mecánica y química permite obtener ADN de calidad para efectuar una PCR altamente sensible para evaluar pacientes con sospecha de strongiloidosis. Financiado por UBACyT.

GASTROENTEROLOGÍA, METABOLISMO Y NUTRICIÓN 1

045. (70) ESTUDIO DE LA SUPERFICIE NEURONAL DEL PLEXO MIENTERICO COLONICO EN RATAS INYECTADAS CON ALOXANO Y SUPLEMENTADAS CON ACIDO ASCORBICO

Feltrer, A.¹; Hisano, N.¹; Posadas, M.²

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR¹ Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR²

El aloxano destruye a las células β del islote de Langerhans, con la formación de radicales libres y por lo tanto su efecto podría ser evitado por la acción del ácido ascórbico. En la presente estudiamos la distribución de los tamaños neuronales en el colon proximal inyectado con aloxano y aloxano + ácido ascórbico. Ratas "m" de 23 días de edad fueron divididas en 4 grupos

experimentales: 1.- inyectados con aloxano (A) 24mg/100g PC (n=4). 2.- inyectado con agua destilada (C) 1cc/100gPC.(n=4) 3.- inyectados con aloxano que recibieron ácido ascórbico(2g/L) disueltos en agua corriente, como bebida *ad libitum* (A+AA) (n=4). 4.- recibieron ácido ascórbico (2 g/L) disueltos en agua corriente, como bebida *ad libitum* (AA). Se detectó la glucemia con tiras reactivas ACCU-check (®Roche) a las 48 hs. A los 7 días las ratas fueron sacrificadas y se disecaron el colon obteniéndose segmentos del colon proximal, 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 500 neuronas en un procesador de imágenes. Las neuronas fueron divididas en $100 \mu^2$, entre 100-200 μ^2 , entre 200-300 μ^2 , entre 300-400 μ^2 . Neuronas: 100-200 μ^2 : A (276), A+AA (134), C (135), AA (139); 200-300 μ^2 : A (51), A+AA (120), C (136), AA(131); 300-400 μ^2 : A (9), A+AA (127), C (132), AA(138). Los resultados indicaron que los cuerpos neuronales en los animales tratados con aloxano presentaron una cantidad mayor en neuronas de 100-200 μ^2 , mientras que fue de menor cantidad en las neuronas mayores a 200 μ^2 . El aloxano afecta el tamaño y la cantidad neuronal (SAIC.2010). Los tamaños neuronales de los animales que recibieron aloxano y ácido ascórbico son similares a los animales controles, como consecuencia del efecto antioxidante.

046. (370) NIVELES DE NITRATOS Y NITRITOS EN LA SALIVA DE PACIENTES CON DISTINTO GRADO DE SEVERIDAD DE ENFERMEDAD PERIODONTAL

Miozza, V.¹; Sánchez, G.²; Busch, L.¹

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA¹
Cátedra de Biofísica, Facultad de Odontología, UBA²

Las glándulas salivales liberan nitratos (NO₃) a la saliva, donde son reducidos a nitritos (NO₂) por las bacterias. La enfermedad periodontal (EP) es un proceso inflamatorio de origen infeccioso, en el que se registra un aumento de distintas especies activas del nitrógeno con efecto bactericida y potenciales efectos lesivos en los tejidos. El objetivo del trabajo fue estudiar los niveles de nitratos totales en muestras de saliva no estimulada (SNE) y estimulada (SE), de pacientes con distintos niveles de severidad de EP. El estudio incluyó 23 individuos con forma leve (L), 22 moderada (M) y 22 severa (S) de EP y 10 controles sanos (Co). En todos los casos, se determinaron colorimétricamente los niveles de NO₂ en forma directa y de NO₃ luego del tratamiento de las muestras con nitrato reductasa. En la SNE los niveles de NO₂ aumentaron en los grupos M y S (420 ± 20; 615 ± 28 y 275 ± 46 μ M, para M, S y Co respectivamente, p<0,05) mientras que los NO₃ aumentaron en todos los enfermos (995 ± 91; 1014 ± 63; 929 ± 59; 530 ± 90 μ M para L, M, S y Co, respectivamente). En la SE se registró un aumento en los niveles de NO₂ y NO₃ en las formas M y S de EP (448 ± 12; 416 ± 8; 5714 ± 114 y 5734 ± 91 μ M NO₂ y NO₃, respectivamente) y una reducción en la forma L (157 ± 11 y 2358 ± 125 μ M NO₂ y NO₃, respectivamente) con respecto a los controles (343 ± 14 y 3895 ± 37 μ M NO₂ y NO₃, respectivamente), p<0,05. Se registró también una correlación positiva y significativa entre los niveles de NO₂ y NO₃ de la SE (0,9), de NO₂ con los parámetros clínicos de profundidad de bolsa (PB) y pérdida de inserción (PI) 0,28 y 0,62, respectivamente sólo en SE y de NO₃ con PB tanto en SE como en SNE (0,43 y 0,37, respectivamente) y con PI (0,75) sólo en SE, p<0,05. Nuestros resultados indican que las glándulas salivales responden a la EP incrementando el potencial defensivo de la saliva a través de un aumento en la liberación de NO₃ en respuesta a la enfermedad periodontal.

047. (419) LA AUSENCIA DE SPARC (SECRETED PROTEIN, ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE) ATENUA EL DESARROLLO DE FIBROSIS HEPÁTICA EN RATONES

Atorrasagasti, M.¹; Peixoto, E.¹; Aquino, J.¹; Kippes, N.¹; Malvicini, M.¹; Alaniz, L.¹; García, M.¹; Piccioni, F.¹; Fiore, E.¹; Bayo, J.¹; Guruceaga, E.³; Corrales, F.³; Podhajcer, O.²; Mazzolini, G.¹

Universidad Austral¹ Fundación Instituto Leloir² Universidad de Navarra³

Introducción: La fibrosis hepática se caracteriza por una excesiva acumulación de componentes de la matriz extracelular (MEC) y cambios en las interacciones celulares que conducen a una distorsión del parénquima hepático. SPARC (Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine) es una glicoproteína de MEC con diversas funciones biológicas que se encuentra sobre-expresada en hígados con cirrosis. El objetivo fue estudiar el papel de SPARC en el desarrollo de la fibrosis hepática utilizando ratones *knock-out* para SPARC (SPARC^{-/-}) y explorar los mecanismos de atenuación. **Métodos:** Se desarrollaron dos modelos de fibrosis hepática en ratones SPARC^{+/+} y SPARC^{-/-}: administración crónica de tiacetamida y ligadura del conducto colédoco. La expresión de SPARC fue evaluada por qPCR e IFI en muestras humanas y murinas con fibrosis. Se evaluó el grado de fibrosis y la actividad necroinflamatoria. Se evaluó la activación de las células estrelladas hepáticas (CEH) por inmunohistoquímica de actina alfa de músculo liso. La expresión de genes profibrogénicos y citoquinas inflamatorias se midieron por qPCR y/o ELISA. El patrón de expresión génica hepático se analizó utilizando microarreglos de DNA (Affymetrix). **Resultados:** La expresión de SPARC se encuentra incrementada en hígado con fibrosis tanto en muestras de pacientes como en la fibrosis experimental. Los ratones SPARC^{-/-} presentaron atenuación del grado de fibrosis; con una disminución en los depósitos y estado de madurez de colágeno, menor actividad necro-inflamatoria y menor activación de CEH. A su vez, aumentó la expresión de MMP-2 en ratones SPARC^{-/-}. Se observó disminución en la expresión y en los niveles sistémicos de TGF- β 1 en ratones SPARC^{-/-}. El análisis mediante IPA (Ingenuity Pathway Analysis) mostró cambios en la expresión de genes involucrados en mecanismos de protección contra la fibrogénesis, activación de mecanismos de reparación del ADN y detoxificación. **Conclusión:** En este trabajo se presentan evidencias que demuestran un papel central de SPARC en fibrosis hepática, identificándola como un blanco potencial para el tratamiento de esta patología.

048. (465) EL COMPUESTO JNJ7777120 DISMINUYE LA LESIÓN ÓSEA Y EL DAÑO DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR INDUCIDO POR LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Prestifilippo, J.^{1,2}; Fernández-Solari, J.^{2,3}; Martinel Lamas, D.⁴; Mohn, C.²; Cortina, J.⁴; Rivera, E.⁴; Elverdin, J.²; Medina, V.^{3,4}

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA² CONICET³ Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA⁴

La enfermedad periodontal es una patología bucal causada por infección bacteriana e inflamación local persistente, que conduce a la resorción ósea. El compuesto JNJ7777120 (JNJ), desarrollado por Johnson & Johnson, presenta efectos anti-inflamatorios y actúa como ligando del receptor a histamina H4. Los objetivos del presente trabajo fueron: investigar la capacidad del JNJ de reducir el daño funcional e histológico sobre la glándula submandibular (GSM) y prevenir la pérdida ósea en un modelo de periodontitis experimental (PE). La PE se indujo en ratas Sprague Dawley macho (300 g) mediante una ligadura con hilo, alrededor de los primeros molares inferiores que se dejó hasta el sacrificio de los animales (14 días). Los últimos 5 días los animales se trataron con una única inyección diaria subcutánea de JNJ (10 mg/kg). La pérdida ósea se evaluó en la zona vestibular y lingual de los primeros molares inferiores midiendo la distancia entre el límite amelo-cementario y la cresta alveolar. En la GSM se realizaron estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos de marcadores de proliferación y apoptosis y estudios funcionales de secreción salival inducida por metacolina. Los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) se determinaron como indicador de respuesta inflamatoria mediante radioinmunoanálisis. El tratamiento con JNJ previno parcialmente la reducción de la secreción salival inducida por PE (P<0.01) mientras que evitó el daño histológico, reduciendo el edema periductal, la vacuolización de acinos y apoptosis inducida por PE en la GSM (células apoptóticas por campo: 2.1±0.8 vs. 75.4±3.5, P<0.001). Además, el tratamiento con JNJ revirtió com-

pletamente el aumento de los niveles de PGE2 inducido por PE en la GSM (658.6 ± 160.6 vs. 1774.0 ± 158.8 fg PGE/mg, $P < 0.001$) y disminuyó la pérdida ósea inducida por PE (0.70 ± 0.05 vs. 1.02 ± 0.06 mm; $P < 0.01$). Podemos concluir que el tratamiento con JNJ disminuye la lesión ósea y la alteración de la GSM inducida por la enfermedad periodontal.

049. (793) EL FACTOR NATRIURETICO ATRIAL (ANF) ATENUA EL DESARROLLO DE PANCREATITIS AGUDA EN LA RATA

Najenson, A.¹; Ventimiglia, M.¹; Perazzo, J.²; Lago, N.²; Vatta, M.³; Davio, C.⁴; Bianciotti, L.¹
 INIGEM-CONICET- Cátedra de Fisiopatología, FFyB-UBA¹
 Departamento de Patología- Fac. Medicina-UBA² Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), FFyB-UBA³ Cátedra de Química Medicinal, FFyB-UBA⁴

En las células acinares pancreáticas en aumento de AMPc en un contexto de activación de fosfolipasa C sensibiliza los gránulos de zimógeno y predispone al desarrollo de pancreatitis aguda (PA). En estudios previos reportamos que el ANF regula los niveles de AMPc favoreciendo su eflujo al medio extracelular en acinos pancreáticos aislados y a la sangre *in vivo* (*Gastroenterology*, 140:1292,2011). Por lo tanto decidimos investigar el efecto de ANF en el desarrollo de PA. Utilizamos ratas Sprague Dawley tratadas con 4 inyecciones de ceruleína (Ce) (40mg/kg cada hora) o con vehículo. Media hora antes de la administración de Ce o vehículo, los animales se subdividieron y se infundió solución fisiológica (control), secretina (S), ANF o S+ANF durante 1 hora. Luego de finalizada la administración de Ce, se tomaron muestras de sangre y de tejido pancreático para distintos estudios. El grupo Ce +S mostró niveles de amilasa plasmática mayores que los tratados con Ce sola, mientras que Ce+S+ANF mostró niveles menores que Ce +S. La actividad de tripsina en páncreas mostró un patrón similar. Estudios de microscopía de alta resolución (MOAR) mostraron en páncreas de ratas con Ce sola alteraciones compatibles con PA como gran número de vacuolas, pequeñas áreas hemorrágicas, necrosis y congestión vascular. Estos cambios morfológicos fueron mayores en animales con Ce+S pero menores en los que además recibieron ANF. Asimismo el grupo Ce+S+ANF mostró un mayor número de núcleos apoptóticos (técnica de TUNEL) que Ce sola o Ce+S, lo que se relaciona inversamente con necrosis. Estos resultados sugieren que el ANF tendría un efecto protector en el desarrollo de PA en la rata.

050. (807) EL EFECTO COLERETICO DE LAS ENDOTELINAS 1 Y 3 (ET-1 Y ET-3) ESTA MEDIADO POR EFECTOS TRANSCRIPCIONALES Y POST-TRANSCRIPCIONALES

Rodríguez, M.¹; Soria, L.²; Ventimiglia, M.¹; Najenson, A.¹; Marinelli, R.²; Vatta, M.³; Bianciotti, L.¹
 INIGEM-CONICET- Cátedra de Fisiopatología, FFyB-UBA¹
 Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), UNF²
 Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), FFyB-UBA³

Las endotelinas (ETs) son importantes péptidos vasoactivos que participan del control de la función cardiovascular y renal, si bien sus receptores (ETA y ETB) se encuentran ampliamente distribuidos en distintos tejidos y tipos celulares, incluyendo los hepatocitos. En estudios previos demostramos que ET-1 y ET-3, en dosis que no modifican el flujo sanguíneo portal ni la presión portal, inducen coleresis mediada por activación de receptores ETB acoplados al óxido nítrico y reflejos vago-vagales. Como las ETs incrementan la velocidad de excreción de los ácidos biliares y glutatión, entre otros solutos, estudiamos si aumentaban la disponibilidad de los principales transportadores involucrados en la formación de la bilis en la membrana plasmática. Ratas Sprague Dawley se infundieron con ET-1 o ET-3 durante 2 hs en presencia o ausencia de un antagonista específico de los receptores ETB (BQ788) y por centrifugación diferencial de muestras de hígado se obtuvieron fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas (MP) y membranas intracelulares (MI) donde por WB se determinó la expresión de Bsep, Mrp2, Ntcp y AQP8. Los resultados mostraron que las ETs incrementaron la expresión de

todos los transportadores en la fracción enriquecida en MP, efecto inhibido por BQ788. Asimismo las ETs aumentaron la expresión de los transportadores en MI, lo que supone un aumento en su transcripción. Esto nos llevó a evaluar la expresión del ARNm de los transportadores por PCR en tiempo real observando que las ETs incrementaron la expresión del ARNm de todos los transportadores a través de la activación del receptor ETB. Nuestros resultados indican que las ETs vía ETB favorecen la inserción de Ntcp, Bsep, Mrp2 y AQP8 en la membrana plasmática, lo que explicaría la coleresis pero también incrementan el ARNm de estos transportadores. Estos hallazgos sugieren que las ETs podrían tener un efecto beneficioso en la colestasis hepatocelular.

051. (810) EL EFECTO PROTECTOR DEL FACTOR NATRIURETICO ATRIAL (ANF) EN LA PANCREATITIS AGUDA ESTARIA MEDIADO POR PROTEINAS DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS (MRPS)

Ventimiglia, M.¹; Najenson, A.¹; Perazzo, J.¹; Lago, N.²; Vatta, M.³; Davio, C.⁴; Bianciotti, L.¹
 INIGEM-CONICET, Cátedra de Fisiopatología, FFyB-UBA¹
 Departamento de Patología, Fac. Medicina-UBA² Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), FFyB-UBA³ Cátedra de Química Medicinal, FFyB-UBA⁴

En trabajos previos mostramos que el ANF regula los niveles de AMPc en el páncreas exocrino a través del receptor NPR-C acoplado a la vía fosfolipasa C/proteína quinasa C favoreciendo la salida del segundo mensajero a través de MRPs (*Gastroenterology*, 140:1292, 2011). Como el ANF demostró tener un efecto protector en las alteraciones fisiopatológicas que caracterizan la pancreatitis aguda (PA), estudiamos si este efecto protector era mediado por MRPs, mediante la inhibición farmacológica de los mismos en un modelo animal de la patología (ratas Sprague Dawley tratadas con ceruleína (Ce)). La inhibición de MRPs se realizó con probenecid 50mg/kg (P) (inhibidor general de MPRs) 60 min antes de la administración de Ce y/o infusión de ANF, secretina (S) o su combinación. Los resultados mostraron que los niveles plasmáticos de amilasa fueron mayores en los grupos con PA tratados con P, siendo el máximo valor en el grupo P+S. El grupo con PA tratado S+ANF no mostró diferencias respecto al grupo con PA tratado con S. Los valores de amilasa se correlacionaron con las alteraciones morfológicas observadas en el páncreas. El grupo con PA tratados con P+S mostró graves alteraciones de la arquitectura normal del páncreas con elevado número de micro y macro vacuolas confluentes con digitación de la membrana nuclear, importante congestión vascular y mayores áreas hemorrágicas que el grupo de PA tratado con S sola. En presencia de ANF el grupo P+S no mostró reversión ni mejora de las alteraciones morfológicas como se observa en el mismo grupo sin tratamiento con P. Estos resultados indican que el tratamiento con P agrava el cuadro de PA y que ANF no logra mantener su efecto protector en la glándula en un contexto de activación de fosfolipasa C e incremento de AMPc. Estos hallazgos sugieren que el efecto protector de ANF en los eventos tempranos que disparan la PA estaría mediado por MPRs.

052. (609) EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE COENZIMA Q Y VITAMINA E PLASMÁTICA EN COLESTASIS INTRAHEPÁTICA DEL EMBARAZO

Martinefski, M.¹; Contin, M.¹; Samassa, P.¹; Rodríguez, M.¹; Bianciotti, L.^{1,2}; Lucangioli, S.^{1,2}; Tripodi, V.^{1,2}
 Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA¹ CONICET²

La colestasis intrahepática del embarazo (CIE) es considerada una condición de alto riesgo dado que puede provocar serias consecuencias para el feto (incremento de partos prematuros, distress fetal y mortalidad perinatal). La CIE se caracteriza por la acumulación de ácidos biliares séricos (ABS) maternos. Aunque su patogénesis no está completamente dilucidada, los ABS hidrofóbicos, particularmente el ácido litocólico (LCA), parecieran ser los responsables dada la citotoxicidad provocada por su acción detergente y la generación de radicales libres que inducen estrés oxidativo y apoptosis, disminuyendo la capacidad antioxidante del

organismo. Si éste evento ocurre durante la gestación, la salud del feto podría verse afectada. La vitamina E (vit E) y la Coenzima Q (CoQ) poseen acción antioxidante y son marcadores tempranos de estrés oxidativo. A su vez CoQ regenera otros antioxidantes incluyendo la vit E. En el presente trabajo se evaluaron los niveles plasmáticos de CoQ, vit E y su relación con LCA en un modelo colestásico murino por administración de etinilestradiol, estrógeno sintético ampliamente utilizado para inducir colestasis intrahepática en animales experimentales. Dichas determinaciones se realizaron por micro HPLC-UV (CoQ y vit E) y electroforesis capilar (LCA) utilizando métodos previamente desarrollados por nuestro grupo de trabajo. Se observó una disminución estadísticamente significativa de ambos antioxidantes con un incremento de LCA respecto de ratas controles. Para corroborar lo observado en modelo murino, se evaluó CoQ, vit E y LCA en embarazos normales y en pacientes con CIE, obteniéndose los mismos resultados. El reconocimiento de la deficiencia de ambos antioxidantes en CIE es importante dado que puede ser el punto de partida para considerar la suplementación preventiva de los mismos a fin de proteger tanto a la madre como al neonato contra la producción de los radicales libres disminuyendo así el riesgo durante el parto.

053. (140) EFECTOS DE UNA DIETA A BASE DE LECHE SOBRE EL DEPÓSITO DE GRASA HEPÁTICA EN RATAS OBESAS EN CRECIMIENTO

Revelant, G.¹; Venezia, M.¹; Olguin, M.¹; Posadas, M.²; Labourdette, V.²; Roma, S.²

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR¹
Facultad de Ciencias Médicas - UNR²

Introducción: El hígado graso no alcohólico (HGNA) caracterizado por incremento del contenido de triacilgliceroles intrahepáticos –esteatosis– con o sin inflamación y fibrosis se incluye entre los trastornos asociados a la obesidad. En trabajos previos con la línea de ratas IIMbBeta, que desarrolla obesidad y diabetes espontáneas en la pubertad, demostramos efectos beneficiosos del calcio (Ca) de lácteos sobre la distribución de la adiposidad y parámetros sanguíneos relacionados con la obesidad. Objetivo: evaluar la influencia de dos dietas isocalóricas e isolípídicas con diferente nivel y fuente de Ca, sobre el contenido, la distribución y la composición de la grasa hepática –como expresiones de HGNA– en ratas obesas en crecimiento. Materiales y Metodología: dos grupos de siete ratas IIMb/β macho al destete, se alimentaron *ad libitum* durante 45 días con dietas de distinto contenido y fuente de Ca. Dieta control (DC): AIN 93 con 0,5 g% de Ca. Dieta experimental (DE): a base de leche deshidratada descremada con 1,2 g% de Ca. Los animales se sacrificaron y se extrajeron los hígados; en los que se cuantificaron lípidos totales, triacilgliceroles y colesterol. Se realizó observación microscópica del tejido. Resultados (media ± desvío estándar): lípidos totales hepáticos (g/100g): DE 0,86 ± 0,36 vs DC 1,45 ± 0,46 (p < 0,02). Triacilgliceroles hepáticos (mg/100g): DE 159,0 ± 70,5 vs DC 288,2 ± 73,6 (p < 0,001). Colesterol total hepático (mg/100g): DE 49,8 ± 24,0 vs DC 60,3 ± 20,0 (p > 0,05). En el análisis histológico, DC presenta esteatosis macro y microvesicular ubicada a nivel subcapsular y periportal, de grado moderado a intenso; ésta no se manifestó en el grupo DE. Conclusión: La dieta con alto contenido de Ca proveniente de leche produjo un menor depósito de grasa en hígado, constatado tanto bioquímica como histológicamente. Estos efectos beneficiosos se podrían atribuir al contenido de Ca y/o a otros componentes de la leche.

054. (150) LA DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA MODIFICA LA PRESIÓN ARTERIAL Y LOS PROSTANOIDES VASCULARES EN LA RATA

Puyó, A.¹; Andrade, V.¹; Donoso, A.¹; Fischerman, L.²; Galleano, M.²; Peredo, H.¹

Cátedra de Anatomía e Histología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA¹ Físicoquímica Instituto de Medicina y Bioquímica Molecular IBIMOL FFyB UBA²

La administración de estreptozotocina (STZ) en la rata produce un cuadro similar a la diabetes mellitus tipo 1 al destruir las células

beta pancreáticas. Por otra parte los prostanoides (metabolitos del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa) tienen efectos vasoactivos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posible relación entre los mismos y la presión arterial (PA) en este modelo. Se utilizaron dos grupos de ratas Sprague-Dawley: control (C, n=5) y diabéticas (D, n=6). La diabetes fue inducida por una inyección i.p. de STZ 45 mg/kg en buffer citrato pH 5,5; mientras que el grupo C recibió sólo buffer. Los animales fueron sacrificados a las 9 semanas y se midieron glucosa, triglicéridos (kits comerciales) y TBARS (determinación fluorométrica) en plasma. Los lechos mesentéricos fueron extraídos e incubados 60 min a 37°C en Krebs. Los PR liberados se midieron por HPLC. La PA sistólica (PAS) se midió por método indirecto. STZ produjo una reducción del peso de los animales (300±6 g vs C, 418±62, p<0,001); e incrementó la glucemia (473±62 mg/dl vs C, 145±7, p<0,001), los triglicéridos (218±17 mg/dl vs C, 119±23, p<0,01), los TBARS (1,0±0,1 µM vs C 0,7±0,1, p<0,01) y la PAS (139±4 mmHg vs C, 120±2, p<0,001). Por otra parte, STZ disminuyó la liberación de los prostanoides vasodilatadores prostaglandina (PG) E₂ (54±10 ng/mg de tejido vs C, 94±7, p<0,01) y 6-ceto F₁ alfa, metabolito estable de la prostaciclina (PGI₂) (59±11 vs C, 102±5, p<0,01); y la de tromboxano (TX) B₂, metabolito estable del TXA₂ (47±5 vs C, 66±5, p<0,02). Se concluye que el aumento de la PAS en la diabetes por STZ podría atribuirse en parte a las alteraciones observadas en la liberación de prostanoides en el lecho mesentérico, ya que se reducen dos metabolitos vasodilatadores; y también al incremento en el estrés oxidativo.

055. (158) CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE ALOYSIA TRIPHYLLA EN FUNCIÓN DE SUS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Lasagni Vitar, R.¹; Reides, C.¹; Ferreira, S.¹; Llesuy, S.¹²
Química General e Inorgánica, FFyB, UBA.¹ IBIMOL. UBA-CONICET.²

La *Aloysia triphylla* (cedrón) es conocida por sus propiedades digestivas y antiespasmódicas. Los extractos acuosos de esta planta medicinal serían una importante fuente de antioxidantes naturales que podrían ser administrados con el fin de proteger contra el daño oxidativo. El objetivo de este trabajo fue caracterizar in vitro extractos acuosos al 5% P/V (infusión y cocimiento) de *Aloysia triphylla* en función de sus propiedades antioxidantes. Para llevar a cabo dicho objetivo se evaluaron los siguientes parámetros: el contenido total de flavonoides y fenoles, la capacidad antioxidante total por medio de los ensayos de TRAP, ABTS y DPPH, el efecto sobre la peroxidación lipídica por la determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de la quimioluminiscencia y la capacidad de atrapamiento de anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Los resultados obtenidos para la infusión y el cocimiento, respectivamente, fueron a) Flavonoides totales (mg quercitina/g material seco): 9,74±1,82 y 10,11±3,08; b) Fenoles totales (mg ácido gálico/g material seco): 39,33±1,61 y 48,69±7,45; c) TRAP (µmol Trolox/ g material seco): 92±32 y 87±3; d) DPPH (µmol ácido ascórbico/ g material seco): 135±9 y 155±3; e) ABTS (µmol ácido ascórbico/ g material seco): 186±13 y 205±4; f) IC50 (µg/mL): 3,0 y 4,0 g) 50% de atrapamiento O₂⁻ (µg/mL): 1,3 y 1,8; h) 50% de atrapamiento H₂O₂ (µg/mL): 10,1±1,1 y 10,1±2,5. El cocimiento mostró valores significativamente mayores de fenoles totales (p<0,05), DPPH (p<0,01) y ABTS (p<0,05). Estos resultados sugieren que existe una inhibición de la peroxidación lipídica debido a la capacidad antioxidante de ambos extractos acuosos de *Aloysia triphylla* y que podrían ser implementados in vivo como nuevas estrategias terapéuticas que retrasan la progresión del daño oxidativo en diversas patologías.

056. (295) MODIFICACIONES RENALES INDUCIDAS POR LA SOBRECARGA DE FRUCTOSA EN RATAS: PREVENCIÓN POR LA ADMINISTRACIÓN DIETARIA DE (-)-EPICATEQUINA (EC)

Prince, P.¹; Geréz, E.¹; Fischerman, L.¹; Vázquez-Prieto, M.²; Galleano, M.¹; Fraga, C.³

Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA - IBIMOL¹ Departamento de Patología, Facultad de Medicina,

Universidad Nacional de Cuyo - IMBECU² Department of Nutrition, University of California, Davis, California³

El síndrome metabólico (SM) constituye un factor de riesgo para la enfermedad renal crónica. Ratas Sprague-Dawley machos se dividieron en tres grupos experimentales: control C (agua corriente y dieta control); fructosa F (dieta control y fructosa 10% (p/v) en el agua corriente) y fructosa + (-)-epicatequina FEC (dieta suplementada con EC (20 mg/kg de peso corporal/día) y fructosa 10% (p/v) en el agua) durante 8 semanas. F y FEC presentaron un consumo de bebida (C=51±4; F=73±3[#]; FEC=75±3[#] ml/día) y una diuresis (C=6.0±0.7; F=28±3[#]; FEC=30±3[#] ml/día) significativamente mayores al grupo C. La proteinuria resultó significativamente elevada en el grupo F respecto al grupo C, y la EC no logró revertir el efecto (C=8±1; F=13±3[#]; FEC=13±1[#] mg/24h). La sobrecarga de fructosa generó un aumento significativo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la corteza renal, el cual fue prevenido por EC (C=0.98±0.07; F=1.3±0.1^{*}; FEC=0.91±0.07 μmol MDA/μg proteína). La emisión de lucigenina NADPH dependiente e inhibible por SOD en corteza renal, como índice de producción de anión superóxido, mostró un incremento significativo en el grupo F, siendo prevenido por EC (C=3.3±0.7; F=7±1^{*}; FEC=2.1±0.9 UA/μg proteína). Entre las defensas antioxidantes enzimáticas, las actividades de la glutatión peroxidasa y la Cu/Zn SOD mostraron un incremento en el grupo F (27% y 33%, respectivamente). La expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa) evaluadas por western blot como marcadores de inflamación resultaron significativamente elevadas en el grupo F. La EC evitó este efecto (C=10±7; F=100±25^{*}; FEC=37±18 UA y C=70±11; F=103±8^{*}; FEC=67±14 UA). Estos hallazgos sugieren que la administración de EC tendría efectos protectores disminuyendo las alteraciones oxidativas e inflamatorias que afectarían al riñón en el SM. (* p<0.05 respecto a C y FEC, # p<0.05 respecto a C) UBACyT 20020090100111 y 20020100100659 y CONICET PIP 2012-2014. MVP, MG y CGF son miembros de la carrera de investigador científico del CONICET. PDP es becaria doctoral del CONICET.

057. (314) EFECTO DE LA MALNUTRICIÓN PROTEICA DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA SOBRE LA FISIOLÓGIA Y ESTRUCTURA HEPÁTICA EN RATAS

Podaza, E.; Vico, T.; Chisari, A.

Instituto de Investigaciones Biológicas - Universidad Nacional de Mar del Plata - CONICET

Estudios epidemiológicos luego de grandes hambrunas permitieron registrar datos estadísticos que concluyeron que individuos nacidos con bajo peso, a causa de una malnutrición severa durante el desarrollo, tienen alta predisposición a padecer enfermedades metabólicas en su adultez. En relación, surge como objetivo de este trabajo estudiar el efecto de la privación nutricional proteica durante la gestación y lactancia en la morfología y fisiología hepática. Para ello se emplearon ratas Wistar preñadas de tres meses de edad; que se alimentaron con una dieta con 8% de proteínas (P), grupo Malnutrido (M); o 20%, grupo control (C). Las crías macho de madres M, luego del destete, fueron alimentadas con dieta 8% P (MM) o con dieta control (MC). Además a las crías macho de madres C se las mantuvo con dieta C (CC). Al día 60 post-nacimiento las crías fueron sacrificadas, se les extrajo sangre por punción cardíaca y se disecó el hígado. Se registro el peso corporal y del hígado. El daño hepático se evaluó mediante el análisis de los niveles séricos de las transaminasas (GOT y GPT), fosfatasa alcalina (FA) proteínas totales (Pt), albumina (Alb), triglicéridos (TG), colesterol (Col) y glucemia (Glu). La estructura hepática se analizó en cortes histológicos. Los pesos corporales y hepáticos resultaron significativamente (p<0,05) menores en los individuos del grupo MM respecto a los CC y MC. Los niveles séricos de Pt, Alb, TG y Col en MM fueron menores respecto a los CC y MC; mientras que GOT, GPT y FA resultaron mayores en MM y MC respecto de los CC (diferencias significativas p<0,05). Los preparados histológicos presentaron diferencias notorias: los MM poseen gran cantidad de vacuolas lipídicas (VL) y hepatocitos

con cambios en la morfología nuclear; en los MC no se observan las VL pero si, las alteraciones nucleares. En Conclusión: La falta de proteínas durante el desarrollo, compromete la integridad a nivel estructural y funcional del hígado, que se manifiestan en la adultez.

058. (331) ALTERACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL POR OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES CAUSADA POR LA TOXICIDAD AGUDA DEL COBRE EN CEREBRO DE RATA

Semprine, J.¹; Musacco Sebío, R.¹; Saporito Magri, C.¹; Repetto, M.^{1,2}

Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL-UBA-CONICET)²

La sobrecarga de Cu genera daño oxidativo en cerebro y está involucrada en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la sobrecarga aguda del Cu sobre la actividad mitocondrial en cerebro de rata. Ratas Sprague Dawley machos (150 g) recibieron Cu(II) por vía peritoneal (5 mg/kg). Se determinó el consumo de oxígeno (O₂) en cerebro a las 6, 16 y 24 hs de la sobrecarga y se aislaron mitocondrias para determinar: consumo de O₂, oxidación de lípidos (TBARS) y de proteínas (carbonilos). Se estimó el control respiratorio (CR). Se observó: disminución significativa del 62% del consumo de O₂ en cerebro a las 16 hs (C:1280±45 nmol O₂/min g, p<0.001), a las 6 hs, aumento del consumo de O₂ mitocondrial del 36% con sustratos del complejo I (malato-glutamato) en estado 3 activo (C:30±2 nmol O₂/min mg prot) y aumento del control respiratorio (CR) del 43% (C:2,3±0,4), y a las 16 hs, aumentó en estado 4 un 33% (C:132±1 nmol O₂/min mg prot). Con sustratos del complejo II (succinato) se observó aumento del 80% en estado 4 y disminución del 44% del CR a las 6 hs (C:15±3 nmol O₂/min mg prot y 2,4±0,2), a las 16 hs disminuyó un 41% en estado 4 y 61% en estado 3 (C:22±1 y 55,20±0,09 nmol O₂/min mg prot) y 25% el CR (2,4±0,1). A las 24 hs incrementó CR 75% con sustrato del complejo I y 37% con succinato (C:2,8±0,4 y 1,5±0,2). La oxidación de lípidos incrementó un 43% a las 24 hs (C:1,4±0,6 nmol/mg) y la de proteínas 56% a partir de las 6 hs (C:3,2±0,6 nmol/mg). La sobrecarga aguda de Cu altera la funcionalidad mitocondrial del cerebro mediante oxidación de proteínas mitocondriales, disminución del consumo de O₂, alteración del flujo de protones a través de la membrana, acumulación de sustratos reducidos y generación de especies reactivas. El aumento del CR (24 hs) sugiere aumento de la actividad mitocondrial en estado activo con síntesis de ATP y peroxidación de lípidos por incremento de especies reactivas.

INMUNOLOGÍA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS 1

059. (67) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FUNCIONAL DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE LA TOXINA SHIGA (STX) EN CÉLULAS EUKARIOTAS

Bentancor, L.¹, Bilen, M.², Mejias, M.¹, Fernández-Brando, R.¹, Panek, C.¹, Ramos, M.¹, Fernández, G.¹, Isturiz, M.¹, Ghiringhelli, P.², Palermo, M.¹

¹IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina; ²LIGB-CM-Universidad Nacional de Quilmes

La toxina Shiga está formada por una subunidad A y cinco subunidades B. Mediante estudios *in silico* de las regiones promotoras de ambas subunidades, encontramos dos fragmentos con alta probabilidad de ser reconocidas en un entorno eucariota y fueron denominadas pr1 y pr7. Dichos fragmentos presentaron un score de 0.99 y 0.97 respectivamente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de la maquinaria eucariota de expresar Stx2 funcionalmente activa. Se realizaron construcciones plasmídicas en las cuales se clonó la secuencia codificante para GFP bajo el control de pr1 y pr7. Observamos por microscopía confocal la expresión de GFP en células eucariotas transfectadas con ambas construcciones, mientras que los controles transfecta-

dos con Dpr-GFP no mostraron fluorescencia. Células con distinta susceptibilidad a Stx2 (Vero y BHK) fueron transfectadas con el plásmido pGEMT conteniendo la secuencia codificante para Stx2 (pStx2). Al transfectar células Vero observamos efecto citotóxico similar al observado en células incubadas con Stx2 purificada (DO Stx2: 0.77 + 0.06; pStx2: 0.69 + 0.07). Células transfectadas con pGEMT no mostraron citotoxicidad (DO pGEMT: 1.27 + 0.06; Vero sin tratar: 1.40 + 0.14). Al utilizar sobrenadantes de células transfectadas con pStx2 sobre células Vero *naïve*, observamos daño citotóxico específico de Stx2, ya que fue neutralizado con suero policlonal anti-Stx2 (DO-pStx2 vs DO-pStx2 + anticuerpo P<0.01). Al transfectar células BHK observamos importantes cambios morfológicos y en el citoesqueleto. En base a los resultados obtenidos podemos concluir que las células eucariotas son capaces de expresar Stx2 funcionalmente activa. Este resultado sugiere que las propias células del huésped podrían ser fuentes alternativas de producción de Stx2. Estos hallazgos aportan una nueva mirada en los mecanismos patogénicos durante las infecciones por STEC con implicancias directas sobre el desarrollo de tratamientos preventivos frente al SUH.

060. (198) RATONES BALB/C DEFICIENTES EN VITAMINA A PRESENTAN MAYOR SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR BACTERIAS ESCHERICHIA COLI PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC)

Cabrera, G.¹, Fernández Brando, R.¹, Baschkier, A.², Miliwebsky, E.², Mejías, M.¹, Abrey Recalde, M.¹, Zotta, E.³, Rivas, M.², Palermo, M.¹

IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina, Bs. As.¹ Servicio Fisiopatología, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS Malbrán, Bs. As.² Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina UBA, Bs. As.³

Las bacterias STEC se transmiten por vía oral y pueden causar varias patologías en humanos, incluyendo el síndrome urémico hemolítico. Dado que el retinol o vitamina A (VA), influencia el mantenimiento del epitelio intestinal y la homeostasis del tejido linfoide asociado a intestino, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo murino para estudiar la influencia de la VA durante la infección con bacterias STEC. Los ratones deficientes en VA (VA-D) se generaron utilizando un alimento sin VA. A distintos tiempos, se midió por ELISA la concentración (cc) sérica de la proteína RBP4 (proteína de unión a retinol-4), la cual se utiliza como marcador de los niveles de VA, detectándose una disminución progresiva de RBP4 a partir de los 2 meses de edad con respecto a los ratones alimentados con una dieta control (Control): por ej: 3 meses de edad: (cc RBP4 mg/ml±DS; n) (A) Control: 35,3±9,1; 3, (B) VA-D: 10,9±3,7; 3. p<0,05. Los ratones VA-D mostraron una reducción en la sobrevida cuando fueron inoculados oralmente con una dosis de 2-3x10¹¹ UFC de STEC O157:H7/kg de peso, (% sobrevida; n): (A) Control infectados (STEC+): 100%; 12, (B) VA-D STEC+: 64%; 14. p<0,05. (Los ratones control y VA-D no infectados (STEC-) tuvieron sobrevida del 100%). Además, solo los ratones VA-D que murieron por la infección tuvieron neutrofilia en sangre periférica (42,3±10,5%; n=4. p<0,05) y mayores niveles de urea en plasma (288,5±67,9; n=4. p<0,05) 120 hs post infección. Por último, el análisis histológico, incluyendo relación villi/cripta y número de células de Globet, entre otros parámetros, mostró que los ratones VA-D presentan alteraciones basales tanto en intestino delgado como grueso, siendo dichas alteraciones más notorias en aquellos ratones que murieron por la infección. El modelo presentado podría ser valioso para caracterizar roles de la VA, tanto a nivel del epitelio intestinal como en las respuestas inmunes generadas contra patógenos de mucosas.

061. (203) EFECTO DE LA TOXINA SHIGA SOBRE LA RESPUESTA TROMBÓTICA Y SU INTERACCIÓN CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA A TRAVÉS DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO EN EL MODELO MURINO

Abrey Recalde, M., Panek, C., Ramos, M., Mejías, M., Cabrera, G., Palermo, M.

IMEX-CONICET Academia Nacional de Medicina

La forma típica del síndrome urémico hemolítico (SUH) se desarrolla secundariamente a la infección con cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (Stx) y está caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda. La Stx produce daño endotelial, generando una respuesta protrombótica exacerbada que contribuye con la obstrucción de la microvasculatura y el daño renal. La respuesta trombótica e inflamatoria están ligadas a través de múltiples mecanismos, entre ellos el sistema de complemento (C). Diversas proteínas del C activan plaquetas y a su vez las plaquetas activadas son capaces de activar al sistema de C. La deposición de C3b sobre plaquetas promueve la activación del C localizando la respuesta inflamatoria en los sitios de trombosis. El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de Stx2 sobre la respuesta trombótica y su interacción con el sistema C, buscando posibles puntos de intervención. Ratones BALB/c fueron inoculados con PBS (A) o Stx2 vía endovenosa (e.v) (10ng/ratón). A las 24 hs (B) Y 72 hs (C) post Stx2, los animales fueron sangrados, las plaquetas aisladas y se midió por citometría de flujo, activación plaquetaria por unión de fibrinógeno (Fbg), pre (basal) y post estimulación con ADP (20uM). Los resultados se expresan como Fbg ADP/Fbg basal ± ES: A= 4,4±0,4; B= 2,5±0,6; C= 2,0±0,2*; (n ≥ 5) p<0.05 vs A. Deposición de C3b sobre plaquetas por citometría de flujo (MFI±ES): A= 510,9±64,5; B= 728,2±86,3; C= 337,7±10,5; (n ≥ 3); ns. Recuento de plaquetas por contador hematológico (x10³/ul±ES): A= 635±33; B= 437±14*; C= 462±40*; (n ≥ 5);* p<0.05 vs A. Concluimos que Stx2 induce una rápida activación plaquetaria, que se manifiesta por aumento de Fbg basal y menor capacidad de respuesta frente a estímulos *in vitro*, el depósito de complemento y trombocitopenia desde las 24 hs. Estos resultados sugieren que el bloqueo de la vía del complemento podría mejorar la evolución de la trombosis durante el SUH.

062. (276) LA INMUNIZACIÓN DE RATONES HEMBRAS POR VÍA INTRAGÁSTRICA CON UN DERIVADO DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA SHIGA II (STX2B) ES CAPAZ DE OTORGAR PROTECCIÓN PASIVA A CRÍAS A TRAVÉS DE LA LECHE

Mejías, M.¹, Ibañez, A.², Baschkier, A.³, Ghersi, G.⁴, Fernández-Brando, R.¹, Cabrera, G.¹, Miliwebsky, E.³, Cassataro, J.², Zylberman, V.⁴, Palermo, M.¹

Instituto de Medicina Experimental Academia Nacional de Medicina¹ Laboratorio de Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Servicio de Fisiopatología, ANLIS Malbrán³ Immunova S.A⁴

La infección con bacterias productoras de Stx2 puede causar colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). La Stx2 está formada por una subunidad A tóxica y un pentámero de subunidades B (Stx2B) de unión al receptor. El objetivo de este trabajo fue analizar la inmunogenicidad y capacidad protectora de una proteína de fusión generada recientemente entre Stx2B y una proteína *carrier* (proteína resultante denominada Quimera), al ser administrada por vía oral. Como adyuvante se utilizó la lipoproteína Omp19 de *Brucella abortus*, capaz de estimular el sistema inmune y de proteger a los antígenos de la degradación por proteasas. Ratones BALB/c hembras (n=5/grupo) se inmunizaron por vía intragástrica (i.g.) los días 0,1,2,7,8 y 9 con: A) Control (*buffer* bicarbonato), B) Quimera, C) Quimera+Omp19. Se preñaron las dos hembras por grupo con mayor IgG anti stx2B en suero medido por ELISA (dilución suero 1/25)(DO_{492nm}±SEM): A)0.31±0.05; B)0.46±0.09; C) 0.76±0.17. Siete crías por grupo se desafiaron i.g. con 3-6 10⁹ *E. coli* O157:H7/ratón al destete (16-18 días). Sobrevida: A) 0%, B) 0% y C) 57% (p=0.009). Dentro del grupo C, sólo las crías de la hembra número 5 (#5) (que había mostrado mayor DO en el ELISA, DO_{492nm}=0.925) sobrevivieron al desafío (100%, n=4). La hembra #5 se preñó nuevamente, sus crías se intercambiaron al nacer con las de una hembra control y se desafiaron con la bacteria al destete. Los ratones amamantados por #5 sobrevivieron al desafío (n=6) y sus crías amamantadas por el control murieron (n=9, p=0.0002). Todos los ratones sobrevivientes, también sobrevivieron a una dosis letal de Stx2 endovenosa un mes luego de los desafíos orales.

Estos resultados demuestran que es posible otorgar protección pasiva a las crías a través de la inmunización de las madres. Esta protección es otorgada a través de la leche y no durante la preñez. Sin embargo, se requiere alcanzar un umbral en el título de anticuerpos séricos como para otorgar protección a sus crías.

063. (75) LA PROTEÍNA A DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS INDUCE EL SHEDDING TEMPRANO DE TNFR1 IN VIVO

Giai, C., González, C., Ledo, C., Garófalo, A., Sordelli, D., Gómez, M.
Instituto de Microbiología y Parasitología Médica, IMPaM-UBA CONICET

Staphylococcus aureus es un patógeno causal de infecciones localizadas y sistémicas, el cual induce la producción de citoquinas inflamatorias en el hospedador. Entre ellas, TNF- α e IL-1 β son esenciales para la erradicación de la bacteria. Entre los mecanismos que regulan la acción de TNF- α , el shedding de su receptor por la metaloproteasa ADAM17 finaliza la señalización. Se ha propuesto que la presencia de TNFR1 soluble (TNFR1s) podría neutralizar el TNF- α circulante, sin embargo, esto no ha sido demostrado in vivo. La proteína A (SpA) es una proteína de superficie que induce tanto la producción de TNF- α como el shedding de TNFR1 en macrófagos. Interesantemente, el shedding de TNFR1 precede en el tiempo a la liberación de TNF- α . El objetivo de este trabajo fue determinar si SpA induce el shedding de TNFR1 in vivo y su potencial rol en la neutralización de TNF- α . Grupos de ratones fueron inoculados por ruta intraperitoneal con SpA purificada, *S. aureus* o una mutante que no expresa SpA (*spa*-) y a diferentes tiempos se cuantificaron los niveles de TNF- α y TNFR1s en suero. Se observó un aumento significativo de TNFR1s ($p < 0,05$; 30 min post-inoculación con SpA) el cual precedió a la aparición de TNF- α ($p < 0,01$; 1 hora post-desafío). En ratones inoculados con *S. aureus* se observó un aumento significativo de TNFR1s a las 2 horas post- desafío ($p < 0,05$). Por el contrario, no se detectó TNFR1s en ratones inoculados con la cepa *spa*-. Al evaluar los niveles de TNF- α en suero, se observó un aumento significativo en ratones inoculados con la cepa *spa*- ($p < 0,05$; 4 horas post-desafío) mientras que no se detectó TNF- α en respuesta a *S. aureus* pese a elevados niveles de ARNm de dicha citoquina en macrófagos. Los resultados obtenidos permiten sugerir que los niveles elevados de TNFR1s en suero inducidos por la proteína A podrían neutralizar la acción de TNF- α durante la infección por *S. aureus*, constituyendo un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

064. (101) LA PROTEÍNA A DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS INDUCE OSTEOCLASTOGÉNESIS CONTRIBUYENDO AL DESARROLLO DE OSTEOMIELITIS EN UN MODELO EXPERIMENTAL

Mendoza Bertelli, A.¹, Lattar, S.¹, Notollana, M.¹, Sordelli, D.¹, Delpino, M.², Gómez, M.¹
IMPaM-UBA CONICET¹ INIGEM-UBA CONICET²

Las infecciones osteoarticulares representan un alto riesgo en individuos de la comunidad, siendo *Staphylococcus aureus* responsable de entre el 50% y el 70% de las osteomielitis en individuos adultos. Entre los factores de virulencia de *S. aureus*, la proteína A (SpA) se ha identificado como un inductor de las cascadas de señalización de TNF- α e IFN β . La importancia de dichas moléculas en el metabolismo óseo, nos permite hipotetizar que SpA podría intervenir en la diferenciación y activación de osteoclastos contribuyendo así a la patogenia de la osteomielitis por *S. aureus*. Macrófagos derivados de médula ósea fueron cultivados en presencia de M-CSF y SpA, *Lactococcus lactis* expresando SpA en su superficie, *S. aureus*, una mutante de *S. aureus* que no expresa SpA (*spa*-) o RANKL como control positivo por 10 días y se cuantificaron las células multinucleadas positivas para la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) por microscopía (osteoclastos). Se observó un aumento significativo en la diferenciación de osteoclastos en respuesta a SpA purificada y a *L. lactis*-SpA ($p < 0.001$) el cual fue inhibido mediante el uso de un anticuerpo neutralizante anti-

SpA ($p < 0.01$). Al analizar la respuesta inducida por la mutante *spa*-, se observó una disminución significativa en el número de osteoclastos ($p < 0.001$) con respecto a lo observado en respuesta a *S. aureus*. Luego se procedió a determinar el rol de SpA en el desarrollo de osteomielitis utilizando un modelo experimental en ratas. Grupos de ratas adultas de la cepa Wistar fueron anestesiadas y la tibia izquierda fue inoculada con 2×10^6 UFC de *S. aureus* o la mutante *spa*-. Se observó una reducción significativa en el número de UFC en hueso y en el tamaño de la lesión ósea en ratas inoculadas con la mutante *spa*- en comparación con *S. aureus* a las 15 semanas post-desafío. Estos resultados sugieren un rol para la proteína A en osteoclastogénesis y en el desarrollo de osteomielitis por *S. aureus*.

065. (102) ROL DE LA PROTEÍNA SBI EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

González, C., Ledo, C., Giai, C., Garófalo, A., Gómez, M.
IMPaM, UBA-CONICET

Las proteínas SpA y Sbi de *Staphylococcus aureus* se unen a la porción Fc de la IgG e impiden la opsonofagocitosis. SpA interacciona además con el receptor de necrosis tumoral mediante los dominios de unión a IgG e induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Los dominios de unión a IgG de Sbi son homólogos a los correspondientes de SpA lo cual permite postular un rol para Sbi en la inducción de respuesta inflamatoria. El objetivo de este trabajo fue determinar la contribución de Sbi en la inducción de citoquinas inflamatorias en células inmunes. Macrófagos peritoneales fueron estimulados con Sbi, *S. aureus* o una mutante que no expresa Sbi (*sbi*-) y se cuantificó la producción de IL-1 β , TNF- α e IL-6. Grupos de ratones fueron inoculados por ruta intraperitoneal con Sbi, *S. aureus* o la mutante *sbi*- y se determinó la inducción de citoquinas en suero y el reclutamiento de neutrófilos a peritoneo. Los experimentos *in vitro* demuestran que Sbi induce niveles significativos de IL-6 y TNF- α a las 2 y 4 horas respectivamente luego de la estimulación ($p < 0.01$; $p < 0.001$) mientras que la inducción de IL-1 β se observó a las 24 horas ($p < 0.01$). La expresión de Sbi, sin embargo, no resultó indispensable para la inducción de citoquinas inflamatorias como se demostró utilizando la mutante *sbi*-. En los ratones inoculados con Sbi se observó un aumento significativo en la inducción de IL-6 en suero ($p < 0.01$) y el reclutamiento de neutrófilos a peritoneo ($p < 0.01$) a las 4 horas post-inoculación. La expresión de Sbi resultó crítica para la inducción de IL-6 in vivo ($p < 0.01$ a las 4 horas post-infección) y el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección ($p < 0.01$ a las 24 horas post-infección) como se demostró al comparar la respuesta inducida por *S. aureus* con respecto a la mutante *sbi*-. Los resultados obtenidos permiten identificar a Sbi como un nuevo factor relevante en la inducción de la respuesta inflamatoria que caracteriza a las infecciones por *S. aureus*.

066. (144) MECANISMOS EFECTORES DE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS ESTIMULADAS CON S.PYOGENES. CORRELACIÓN ENTRE ESTALLIDO RESPIRATORIO Y LFA EN SOBRENADANTE DE CULTIVO (S.C) NIVELES DE TNF α Y NITRITOS EN S.C DE POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS Y MONONUCLEARES

Möhlinger, A.¹, Chulibert, S.¹, Siffredi, V.¹, Enzink, A.², Fiorenza, G.², Ombrella, A.¹, Dlugovitzky, D.¹
Sección Inmunología de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR¹; Laboratorio Turner²

S. pyogenes agente causal de faringitis estreptocócica, fiebre reumática, glomerulonefritis aguda y fascitis necrotizante desencadena una respuesta inmune importante con la participación de diversos tipos celulares, tales como polimorfonucleares neutrófilos (PMN), macrófagos y células dendríticas. Se estudiaron diversos mecanismos efectores de la respuesta de PMN y células mononucleares (MN) de sangre periférica de sujetos normales frente al estímulo de *S. pyogenes* vivo (Spv) e inactivado (Spi), evaluando la correlación entre Estallido Respiratorio, ER y los niveles de TNF en s.c. de dichas células y también la producción de nitritos en

s.c. de PMN y MN. En una muestra de 20 ml de sangre periférica heparinizada de 48 sujetos normales, se separaron PMN y MN (gradiente de Ficoll-Triyosom). Se incubó la suspensión de células (5x10⁶ /ml) en RPMI 1640 en 6 tubos Falcon de 6ml. Se agregó a 2 tubos 250 ul de PMN (5x10⁶exp6/ml) y 5 ul de RPMI 1640, en 2 tubos 250 ul de MN y 5ul Spv y en otros 2 tubos 250 ul de PMN + 5ul Spi (conc. bacterias10exp6.Escala de Mc Farland). Los tubos se incubaron 18 hs a 37° C; luego se separaron 400 ul de s.c. y se conservaron a -30° C para evaluar nitritos y TNF. En PMN y MN lavados y resuspendidos en RPMI1640 se determinó ER y % de células estimuladas previo estímulo con Phorbol Myristate Acetate, por Citometría de Flujo (FACs Calibur). Índice Oxidativo R: (expresión de ER) IFM de Células estimuladas/ IFM basal (IFM: intensidad de fluorescencia media). De los s.c. conservados a -20^a C se utilizaron 200 ul para evaluar los niveles de nitritos por el Método de Griess y 200 ul para determinar los de TNF por ELISA (R&D Systems). Se analizó la correlación entre el Índice R de PMN y MN con en s.c. observándose una correlación positiva (r los niveles de TNF ²: 0.96) significativa (p<0.01) entre los datos correspondientes a ambos tipos celulares. Los resultados muestran los mecanismos bactericidas de MN y PMN frente a *S. pyogenes*.

067. (231) CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE LAS PROTEÍNAS SBI Y SBI EN LA INDUCCIÓN DE RESPUESTA INFLAMATORIA DURANTE LA INFECCIÓN SISTÉMICA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Ledo, C., González, C., Garofalo, A., Gai, C., Gomez, M. IMPaM-UBA CONICET

Staphylococcus aureus es un patógeno causal de infecciones sistémicas con alta morbi-mortalidad. Gran parte de la patología se debe a la intensa respuesta inflamatoria que genera. *S. aureus* expresa dos proteínas (Sbi y SpA) las cuales poseen dos y cinco dominios conservados, respectivamente, que inducen mediadores inflamatorios y el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Previamente hemos demostrado que la expresión de SpA es crítica en la inducción de respuesta inflamatoria y en el desarrollo de neumonía en un modelo de infección pulmonar. El objetivo de este trabajo fue determinar la contribución relativa de SpA y Sbi en la inducción de respuesta inflamatoria en un modelo de infección sistémica. Grupos de ratones fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* o mutantes isogénicas que carecen de la expresión de Sbi, SpA o ambas proteínas y se determinó la inducción de citoquinas inflamatorias en suero luego de 4 horas y el reclutamiento de neutrófilos a peritoneo 24 horas post-infección. La proteína Sbi contribuyó significativamente al reclutamiento de neutrófilos a peritoneo ($p < 0.01$) y al incremento de IL-6 ($p < 0.01$) como se demostró utilizando la mutante *sbi*-. Por el contrario y en contraposición a lo observado en el modelo de infección pulmonar, la expresión de SpA no contribuyó en forma significativa a la respuesta inflamatoria en el modelo de infección sistémica. La proteína Sbi desempeñó un rol crítico en el desarrollo de bacteriemia ($p < 0.05$) y neumonía ($p < 0.001$) durante la infección sistémica por *S. aureus* mientras que la ausencia de expresión de SpA no mostró diferencias significativas con respecto a la cepa parental. Los resultados obtenidos destacan la importancia de la ruta de adquisición del microorganismo y la necesidad de tener en cuenta los factores regulatorios del nicho donde se desarrolla la infección al interpretar la aparente redundancia funcional de los factores de virulencia de *S. aureus*.

068. (258) EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN GLÁNDULA MAMARIA BOVINA CRÓNICAMENTE INFECTADA

Felipe, V.¹, Somale, P.¹, Morgante, C.¹, Icely, P.², Correa, S.², Porporatto, C.¹

Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional de Villa María¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba²

Staphylococcus aureus es el principal patógeno aislado en Mastitis bovina, presenta habilidad para formar biofilms y modificar las respuestas inmunes en glándula mamaria (GM). El objetivo fue

evaluar la formación de biofilm por *S. aureus* y la respuesta inmune en GM bovina crónicamente infectada. Se tomaron muestras de leche por cuarto de 4 bovinos sanos y 4 con mastitis crónica (MC) definidas luego de 3 aislamientos consecutivos cada 20 días. Los aislamientos se identificaron como *S. aureus* mediante PCR, se determinó la producción de biofilm por cultivo en agar rojo congo (CRA) y en placas de poliestireno coloreadas con cristal violeta (CV), y la expresión de genes asociados a biofilm *icaA*, *icaD* y *bap* mediante PCR. Las cepas aisladas mostraron según CRA y CV distinta capacidad fenotípica de formar biofilm, aunque el 100% de las cepas fueron *icaAD+* y *bap+*. A fin de caracterizar la respuesta inmune en la GM bovina, se evaluó la expresión de mRNA de quimiocinas, receptores de reconocimiento en células somáticas (CS) y marcadores de activación en linfocitos obtenidos de leche de los animales en estudio. Se observó una disminución en la expresión de mRNA por RT-PCR para las quimiocinas IL8 y CCL2, y los receptores TLR2 y TLR4 en CS de animales con MC, siendo significativa para CCL2 (10,4 vs 4,0) y TLR2 (5,6 vs 2,1) ($p < 0.05$). Se evaluó por citometría de flujo los porcentajes de las poblaciones linfocitarias (CD5+, CD21+, CD4+, CD8+) y la expresión de marcadores de activación (CD25+ y CD11a+). Se observó una disminución en el porcentaje de células CD25+ en MC (29,5 vs 11,1%, $p < 0.05$). Estos resultados muestran la habilidad de *S. aureus* aislado de bovinos con MC para producir biofilm, inducir disminución en la expresión de mRNA de quimiocinas y receptores Toll, y en la expresión de marcadores de activación. Estos mecanismos desencadenados por la bacteria en la GM llevarían a la evasión de la respuesta inmune y a la generación de infecciones persistentes.

069. (698) EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN COMUESTA POR PROTEÍNAS RECOMBINANTES E ISCOMATRIX™ DESTINADA A LA INMUNOPROFILAXIS DE LA MASTITIS BOVINA PROVOCADA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Pujato, N.¹, Camussone, C.², Veaute, C.¹, Renna, M.³, Calvino, L.², Marcipar, I.¹

Laboratorio de Tecnología Inmunológica. FBCB.UNL¹ E.E.A. Rafaela, INTA² Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL³

Staphylococcus aureus es el principal causante de mastitis bovina en la Argentina. Actualmente no existen estrategias de inmunoprofilaxis efectivas contra las infecciones estafilocócicas, pero los nuevos conocimientos acerca de los factores de virulencia junto con la disponibilidad de nuevos adyuvantes podría contribuir al desarrollo de vacunas protectivas. El objetivo de nuestro grupo de trabajo es desarrollar un inmunógeno multi-componente que integre moléculas bacterianas que intervienen en las distintas etapas de la infección y formularlos con el adyuvante de nueva generación ISCOMATRIX™. Hasta el momento evaluamos 3 de las proteínas candidatas. Fragmentos de ADN correspondientes a Clumping Factor A (Clf), proteína de unión a fibronectina A (FnBP) y toxina beta (β -tox) de *S. aureus* se clonaron en pET 32a/E. coli, se expresaron y purificaron. Se inmunizaron vaquillonas Holstein preñadas con 2 dosis, 45 y 15 días antes del parto, de una mezcla de 0,6 mg de las proteínas obtenidas (grupo R, n= 4), o con PBS (grupo C, n=6), ambos formulados con ISCOMATRIX. Mediante ELISA indirecto se evaluó IgG total en suero. Se vio que el grupo R generó mayores niveles de anticuerpos contra las proteínas recombinantes y nativas respecto del C ($p < 0,05$). Se comprobó la capacidad de los anticuerpos anti β -tox de inhibir la actividad hemolítica de la exotoxina sobre eritrocitos bovinos y la capacidad los anticuerpos anti rClf y rFnBP de opsonizar la bacteria y favorecer la fagocitosis por neutrófilos bovinos, mediante citometría de flujo. Finalmente se determinaron por Real Time PCR los niveles de expresión de TNF- α , IL-10 e IL-12, los cuales fueron significativamente mayores en el grupo R respecto del grupo C ($p < 0,05$). La formulación evaluada fue capaz de inducir anticuerpos específicos y funcionales en bovinos, indicando la factibilidad de nuestra estrategia para lograr una vacuna y propiciando la incorporación de nuevas subunidades a la misma.

070. (82) EFECTOS MODULATORIOS DE LAS VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BRUCELLA DURANTE LA INFECCIÓN DE MONOCITOS

Pollak, C.¹, Delpino, M.², Fossati, C.¹, Baldi, P.¹
Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) - FfYB¹ INIGEM (CONICET/UBA)²

Diversas bacterias gram negativas liberan vesículas de membrana externa (VME) que pueden contener factores de virulencia y modular la respuesta inmunológica a favor del patógeno. Previamente mostramos que la preincubación con VME de *Brucella* inhibe la producción de TNF- α por monocitos humanos (THP-1) en respuesta a agonistas de TLRs, pero aumenta la expresión de ICAM-1. Por ello decidimos evaluar si la preincubación de THP-1 con VME modifica su adhesión a endotelio (HMEC-1). Las VME fueron obtenidas por concentración del medio de cultivo de *B. abortus*. Células THP-1 fueron preincubadas o no con VME, luego marcadas con calceína y colocadas sobre monocapas de HMEC-1 previamente activadas con TNF- α . Las células no adheridas fueron removidas y se midió la fluorescencia. Las VME produjeron un aumento dosis-dependiente ($p < 0.001$ para 10 $\mu\text{g/ml}$) en la adherencia de los monocitos. También evaluamos si la incubación de células THP-1 con VME antes o durante la infección con *B. abortus* aumenta la adhesión e invasión de *Brucella*. La preincubación con VME (10 $\mu\text{g/ml}$) produjo un aumento significativo de bacterias adheridas (9.5 veces) e internalizadas (10.8 veces) en los monocitos respecto de las células no pretratadas con VME. La coincubación, aumentó 17.8 veces la adhesión y 11.3 veces la invasión. Para evaluar el efecto de las VME sobre la producción de citoquinas en la infección, células THP-1 fueron incubadas o no con VME 4 h antes de la infección con *B. abortus* y se midieron las citoquinas en los sobrenadantes de cultivo a las 24 hs. La preincubación con 1 o 10 $\mu\text{g/ml}$ de VME disminuyó significativamente la secreción de TNF- α (76% y 83%) y de IL-8 (13% y 68%). Los resultados sugieren que las VME liberadas por *Brucella* ejercen efectos que promueven la adhesión e internalización de la bacteria a monocitos, a la vez que regulan negativamente su respuesta inmune innata frente a la infección. Esto podría favorecer la persistencia de *Brucella* dentro de las células hospedadoras.

071. (106) B. ABORTUS INFECTA SINOVIOCIOS INHIBIENDO LA APOPTOSIS Y ESTIMULANDO LA EXPRESIÓN DE RANKL

Scian, R.¹, Barrionuevo, P.¹, Arriola Benitez, C.¹, Rodriguez, A.¹, Fossati, C.², Giambartolomei, G.¹, Delpino, M.¹
Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM, CONICET-UBA)¹ Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU, CONICET-UBA)²

La localización osteoarticular es la más común de la brucelosis activa. Previamente demostramos que los sinoviocitos median mecanismos inflamatorios en la artritis por *Brucella*. El objetivo en este trabajo fue determinar si *B. abortus* puede mediar daño mediante la inducción de la apoptosis de los sinoviocitos (SW982) o mediante la inducción de un aumento patológico de la osteoclastogénesis. Para ello, medimos apoptosis por citometría (Anexina V/PI) y microscopía (Hoechst y TUNEL), y determinamos la presencia de osteoclastos mediante el recuento de células multinucleadas que expresan fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y el estudio de su capacidad de resorber matriz mineral, por microscopía. *B. abortus* indujo una reducción en los niveles de apoptosis basales y en los inducidos por estaurosporina ($p < 0,001$). Por otro lado, utilizando un array de proteínas demostramos que la infección por *B. abortus* aumentó la expresión de factores antiapoptóticos (cIAP-2, Clusterin, Livin, P21/CIP/CDNK1A). Dado que *B. abortus* es una bacteria intracelular especulamos que los sinoviocitos podrían ser un nicho replicativo en el sitio de infección articular. Además, *B. abortus* invadió y se replicó en los sinoviocitos induciendo la expresión de RANKL. RANKL interacciona con RANK expresado en la superficie de los precursores de los osteoclastos induciendo un aumento patológico en el número de osteoclastos y consecuente resorción ósea. Nuestros resultados mostraron que los sobrenadantes de los sinoviocitos infectados

por *B. abortus* indujeron la diferenciación de monocitos a osteoclastos en presencia de M-CSF ($p < 0,001$). La osteoclastogénesis fue inhibida cuando los estímulos se realizaron en presencia de osteoprotegerina (molécula que se une a RANKL inhibiendo su interacción con RANK), indicando que RANKL es la principal citoquina involucrada en este fenómeno ($p < 0,001$). Por lo tanto, *B. abortus* invade sinoviocitos e induce el aumento patológico de la osteoclastogénesis.

072. (113) MECANISMOS IMPLICADOS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA DESENCADENADA POR LA INFECCIÓN POR BRUCELLA ABORTUS

Arriola Benitez, P.¹, Scian, R.¹, Fossati, A.², Giambartolomei, G.¹, Delpino, M.¹
Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM, UBA-CONICET)¹ Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU, UBA-CONICET)²

La fibrosis hepática es una respuesta al daño inflamatorio para confinar las lesiones. Las células estrelladas del hígado están implicadas en este fenómeno a través de la regulación de la producción de MMPs y de la deposición de colágeno. En estudios previos demostramos que *B. abortus* induce inflamación en el hígado. Por lo tanto, estudiamos si podía inducir fibrosis y los mecanismos implicados en dicho fenómeno. Determinamos la producción de MMP-9 por zimografía y la cuantificamos por ELISA, la secreción de TGF- β se midió por ELISA y la deposición de colágeno mediante tinción con rojo sirio por microscopía y semicuantificada por lectura de los depósitos solubilizados a 550 nm. *B. abortus* inhibe en las células estrelladas (LX-2) los niveles basales de secreción de MMP-9 ($p < 0,01$), e incrementa la deposición de colágeno ($p < 0,01$). Estudiamos las interacciones entre LX-2, los hepatocitos (HepG2) y los monocitos (THP-1). Demostramos que los sobrenadantes de HepG2 y de THP-1 infectados por *B. abortus* inducen un aumento dosis dependiente ($p < 0,1$) en la expresión de MMP-9 por parte de las células LX-2. Sin embargo, cuando se estimulan con los sobrenadantes mencionados, las células LX-2 previamente infectadas por *B. abortus* a distintas multiplicidades de infección (MOI) observamos que hay una reducción en la producción de MMPs, la cual es dependiente de la MOI utilizada ($p < 0,01$). Para determinar que citoquina estaba involucrada, estudiamos la presencia de TGF- β en los sobrenadantes de cultivos de las células LX-2 infectadas o estimuladas con los sobrenadantes mencionados. Demostramos que las células LX-2 infectadas por *B. abortus* producen TGF- β ($p < 0,01$). Sin embargo, TGF- β no se detectó en los sobrenadantes de las LX-2 (no infectadas) estimuladas con sobrenadantes de THP-1 o HepG2 infectados por *B. abortus*. Por lo tanto, la infección por *B. abortus* induce mecanismos reguladores del daño producido por la inflamación en el hígado y TGF- β participa en los mismos.

073. (159) EFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DE LA INFECCIÓN CON BRUCELLA ABORTUS SOBRE CÉLULAS HUMANAS ENDOTELIALES DE LA MICROVASCULATURA CEREBRAL

Miraglia, M., Rodríguez, A., Delpino, M., Giambartolomei, G.
INIGEM Instituto de inmunología, genética y metabolismo (CONICET/UBA)-Laboratorio de Inmunogenética

La invasión del sistema nervioso central (SNC) por *B. abortus* (*B.a.*) resulta en la patología inflamatoria denominada neurobrucelosis. Demostramos recientemente que *B.a.* infecta la glia produciendo citoquinas inflamatorias que contribuyen al daño tisular. El SNC se encuentra protegido por la barrera hematoencefálica (BHE), cuyas células endoteliales actúan como filtro entre la circulación general y el SNC. Nuestro objetivo general es determinar la interacción de *B.a.* con la BHE durante la neurobrucelosis. Para tal fin, investigamos la influencia directa de *B.a.* sobre células endoteliales de microvasculatura cerebral (HBMEC) mediante la infección a diferentes multiplicidades (MOI) y el efecto indirecto por estimulación con sobrenadantes de células gliales infectadas. Se determinó la producción de citoquinas y quimiocinas, la expresión de moléculas de adhesión y la apoptosis para ambos

casos. *B.a.* se adhiere, infecta y replica en HBMEC de manera MOI dependiente en función del tiempo. Se observaron aumentos significativos en la adherencia y la internalización bacteriana utilizando MOI crecientes ($p < 0,001$ MOI 25 vs 1000). La infección induce la secreción de las citoquinas IL-8 e IL-6 y de la quimiocina MCP-1 ($p < 0,001$ MOI 25 vs 1000). A excepción de la replicación bacteriana intracelular, estos resultados son reproducidos en las cepas rugosa y mutante del sistema de secreción tipo IV. El efecto directo de la infección de *B.a.* sobre las HBMEC produce un aumento de la expresión basal de la molécula de adhesión CD54, sin embargo no produce secreción de TNF- α ni genera apoptosis. Sin embargo, el aumento de CD54 es significativamente mayor ($p < 0,01$) cuando las HBMEC son estimuladas indirectamente con sobrenadantes de microglia y astrocitos infectados; al igual que aumenta la apoptosis. Nuestros resultados sugieren que el efecto indirecto causado por citoquinas pro-inflamatorias provenientes del ambiente glial contribuirían más eficientemente a la injuria en la BHE en la neurobrucelosis.

074. (161) BRUCELLA ABORTUS INDUCE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y CO-ESTIMULATORIAS EN MONOCITOS HUMANOS

Velásquez, L. , Delpino, V. , Miraglia, C. , Giambartolomei, G. , Barrionuevo, P.

INIGEM Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (CONICET/UBA). Laboratorio de Inmunogenética

La brucelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella*. Se caracteriza por una poderosa respuesta Th1 e inflamación de distintos tejidos, la cual es acompañada por un característico infiltrado leucocitario a través del endotelio vascular. En este trabajo investigamos el efecto de la infección con *B. abortus* sobre la expresión de moléculas clave para la activación de los linfocitos T y de adhesión al endotelio, tales como las moléculas co-estimuladoras y de adhesión de los monocitos humanos. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* por 24 o 48 h. Luego, la expresión de las moléculas co-estimuladoras (CD86 y CD40) y de las moléculas de adhesión (CD54 y CD106) fue evaluada por citometría de flujo. La infección con *B. abortus* incrementó significativamente ($p < 0,05$) la expresión de CD40 y CD86 a las 24 y 48 h, respectivamente. A su vez, la infección con la bacteria indujo un incremento significativo ($p < 0,05$) de CD54 y CD106 a las 24 y 48 h. Con respecto a estos últimos marcadores, observamos la aparición de dos poblaciones con diferente intensidad de expresión. Para determinar si este patrón de expresión bimodal se debía a variaciones en el nivel de infección, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus*-GFP y la expresión de los marcadores fue evaluada por citometría de flujo. Las poblaciones con mayor expresión de CD54 y CD106 correspondieron a células GFP positivas, indicando que en las células más infectadas la expresión de las moléculas de adhesión estudiadas es mayor. Por último, *B. abortus* muerta por calor (HKBA) también incrementó significativamente ($p < 0,05$) pero de manera no bimodal la expresión de CD54 y CD106, indicando que el fenómeno no depende de la viabilidad bacteriana. En conjunto, estos resultados demuestran que la infección de monocitos con *B. abortus* sería capaz de aumentar la co-estimulación hacia linfocitos T y la expresión de moléculas de adhesión, lo que podría determinar un aumento en la invasión tisular.

075. (226) ESTUDIO DE UN INHIBIDOR DE PROTEASAS BACTERIANO COMO ADYUVANTE ORAL EN UNA FORMULACIÓN VACUNAL DE SALMONELLA INACTIVADA POR CALOR.

Risso, G.¹, Ibañez, A.¹, Bruno, L.¹, Coria, M.¹, Pasquevich, K.¹, Briones, C.², Cassataro, J.¹

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas - INIGEM, CONICET¹ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-UNSAM). Universidad Nacional de San Martín²

En trabajos anteriores demostramos que una proteína de *Brucella* (BP) es un inhibidor de proteasas capaz de inhibir serin-proteasas intestinales (elastasa, tripsina y alfa quimiotripsina)

y que administrada por vía oral con un antígeno (Ag) modelo, como Seroalbúmina bovina (OVA), induce un incremento en la cantidad de células T CD4+ y CD8+ Ag-específicas productoras de IFN- γ . Esto sugiere que BP podría utilizarse como adyuvante oral en formulaciones vacunales anti-microbianas. *Salmonella* Typhi, causante de la fiebre tifoidea, es un patógeno entérico de transmisión oral que luego de invadir la mucosa gastrointestinal se disemina por vía sistémica. Dado que esta bacteria replica principalmente dentro de macrófagos, la respuesta de tipo T helper (Th) 1 está asociada con la protección. La vía oral como ruta natural de infección y la necesidad de una respuesta Th1 hacen de *Salmonella* un gran candidato para la formulación de una vacuna oral utilizando BP como adyuvante. Por esta razón, en un modelo murino de fiebre tifoidea, ratones BALB/c fueron inmunizados con i) *Salmonella* muerta por calor (HKS), ii) HKS+BP o iii) HKS+CTB (subunidad B de la Toxina Colérica) y desafiados luego por vía oral con una cepa virulenta de *S. Typhimurium*. Los animales fueron sacrificados 6 días más tarde y se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en hígado y bazo. Se observó una reducción significativa en la cantidad de UFC en bazo de los animales inmunizados con BP en comparación con los animales que recibieron sólo HKS ($P = 0.0083$). Asimismo, el hígado presentó una leve disminución de UFCs en los animales inmunizados con BP respecto de aquellos inmunizados sólo con HKS. Evaluamos también los niveles de IgA en heces e IgG sérico y encontramos que BP induce un incremento en los niveles de anticuerpos específicos contra HKS. En conjunto, nuestros resultados indican que BP es un potencial adyuvante en vacunas orales inactivadas contra *Salmonella* Typhimurium.

076. (553) BORDETELLA PERTUSSIS MODULA LA EXPRESIÓN DE MHCII DURANTE LA INFECCIÓN.

Valdez, H. , Oviedo, J. , Lamberti, Y. , Rodriguez, M.

CINDEFI | Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales Facultad de Ciencias Exactas (UNLP)

La remergencia de *Bordetella pertussis* (Bp) en nuestro país, como en el resto del mundo, es un hecho que se agudiza a pesar de la vacunación masiva. Recientemente en nuestro laboratorio se demostró que Bp puede sobrevivir y replicar intracelularmente en macrófagos, postulándose como una posible forma de persistencia de la bacteria. Con el objetivo de determinar si Bp es capaz de modular la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) durante el establecimiento en el hospedador, se llevaron a cabo estudios de qPCR. Para ello se emplearon células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Se tomaron muestras a 3, 24 y 48 h post infección de Bp vivas, observándose paralelamente la respuesta a la fagocitosis de Bp inactivadas. Como control se usaron células sin infectar. Las tres condiciones se ensayaron tanto en presencia como en ausencia de IFN- γ . Se evaluó el nivel de expresión de *MHCI*, *MHCII* y *CIITA*. Los resultados mostraron que en ausencia de IFN- γ , *MHCI* está levemente sobre-expresado a las 3 h post-infección de Bp vivas o inactivadas, pero su expresión a las 24 y 48 h fueron comparables al control en ambos casos. No detectándose expresión de *MHCII* y *CIITA*. En presencia de IFN- γ , *MHCI* no mostró variaciones significativas a lo largo del tiempo. En el caso de *MHCII* y *CIITA* se detectó un aumento significativo de su expresión, 5 y 3 veces, respectivamente, a las 3 h post-infección tanto de Bp vivas como de Bp inactivadas respecto a las células sin infectar incubadas con IFN- γ . A las 24 y 48 h los niveles de expresión de *MHCII* y *CIITA* de células infectadas con Bp muertas mostraron valores comparables al control, mientras que *MHCII* disminuyó 4 veces su expresión en células infectadas con Bp vivas. Sorprendentemente la expresión de *CIITA*, en estas células, permaneció aumentada aun luego de 48 horas de infección. Estos resultados sugieren que Bp ejerce una regulación negativa de la presentación de antígenos modulando la expresión de *MHCII* durante la infección.

077. (682) LA INTERACCIÓN DE BORDETELLA PARAPERTUSSIS CON RAFTS LIPÍDICOS MEDIADA POR EL ANTÍGENO O MODULA LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL NEUTRÓFILO.

Gorgojo, J., Alvarez Hayes, J., Rodriguez, M.
 Centro de investigación y Desarrollo en Fermentaciones
 Industriales, CINDEFI-CONICET-UNLP

Bordetella parapertussis (Bpp) es uno de los agentes causales de la tos convulsa, una enfermedad reemergente. La presencia del antígeno O (AgO) en su superficie, bloquea el reconocimiento de los anticuerpos inducidos por las vacunas actuales. Resultados de nuestro grupo demuestran que en ausencia de opsoninas Bpp inhibe la fusión fagolisosomal y sobrevive a la interacción con neutrófilos (PMN) mediante un mecanismo dependiente del AgO. El objetivo de este trabajo es avanzar en la comprensión de las bases de este tráfico no bactericida. Empleando neutrófilos primarios humanos y técnicas de luminometría para la determinación de la inducción del estallido respiratorio se pudo comprobar que la interacción de Bpp con PMN no induce su activación y que el AgO está involucrado en este proceso. A diferencia de la cepa salvaje, un mutante defectivo en la expresión del AgO produjo la activación del PMN. En otros patógenos se ha observado que tanto la inhibición del tráfico a lisosomas como la activación de la célula inmune dependen de la unión de la bacteria a rafts lipídicos en la célula blanco a través del AgO. Utilizando bacterias GFP y sondas fluorescentes se determinaron los niveles de fagocitosis en presencia o ausencia de agentes disruptores de rafts lipídicos (metilβciclodextrina, MβCD), o que unen colesterol e interfieren en esta interacción (nistatina). La viabilidad intracelular bacteriana se evaluó utilizando ensayos de protección con polimixina B. Los resultados mostraron que la incubación de PMN con MβCD o nistatina reduce drásticamente el nivel de fagocitosis de Bpp y aumenta significativamente la actividad celular bactericida contra esta cepa. Por el contrario no se observaron diferencias en el nivel de fagocitosis o muerte de la cepa Bpp defectiva en AgO en PMN tratado o sin tratar. Estos resultados sugieren que el destino intracelular de Bpp está determinado por la presencia del antígeno O y su interacción con los rafts lipídicos en la célula inmune.

078. (641) FACTORES DE VIRULENCIA DE YERSINIA ENTEROCOLITICA INDUCEN LA SECRECIÓN DE GALECTINA-1 (GAL-1)

Davicino, R.^{1,3}, Eliçabe, J.^{1,3}, Méndez Huergo, S.², Stupirski, J.², Di Genaro, S.^{1,3}, Rabinovich, G.²

Universidad Nacional de San Luis¹ Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)² Laboratorio de Inmunopatología, IMIBIO-SL. CONICET-UNSL. San Luis.³

Yersinia enterocolitica (Ye) es una bacteria que causa infecciones gastrointestinales. Sus factores de virulencia, modulan la respuesta inmune del huésped. Galectina-1 (Gal-1), una lectina de unión a β-galactósidos, es altamente expresada en sitios de infección e inflamación e inhibe la respuesta Th1 y Th17. Su participación en infecciones bacterianas es poco conocida. Previamente determinamos el papel crítico que esta lectina endógena cumple en el curso de la infección por Ye. El objetivo de este trabajo fue investigar si los factores de virulencia YopP y YopH de Ye participan en la inducción de la secreción de Gal-1. Para tal fin usamos ratones C57BL/6 (WT) no infectados (controles) e infectados con la cepa salvaje Ye WA-314 o con las mutantes Ye ΔyopP o ΔyopH. Luego de 5 días de infección, se realizaron cultivos de los esplenocitos, los cuales fueron re-estimulados durante 72 h con *Yersinia muerta por calor* (HKY). Se obtuvieron sobrenadante (SN) en los cuales se analizó IL-17, IFN-γ, IL-10 y Gal-1 por ELISA. Además se evaluó la expresión de Gal-1 por ensayos de Western blot (WB). Se detectó un aumento de la presencia de Gal-1 en SN de esplenocitos de ratones infectados con Ye WA-314. Estos hallazgos correlacionaron con niveles incrementados de Gal-1 por ELISA en SN de células de ratones infectados con Ye WA-314 vs controles ($p < 0,05$) o Ye ΔyopP ($p < 0,05$) luego de la re-estimulación específica con HKY. Además, se observó disminución significativa de IL-17 ($p < 0,05$) luego de la infección con Ye WA-314 comparada con la infección con Ye ΔyopP ($p < 0,05$). No se detectaron diferencias en los niveles de IFN-γ. En contraste, se observó que las infecciones con Ye ΔyopP

o ΔyopH estimularon significativamente la producción de IL-10 ($p < 0,05$). Por lo tanto, los factores de virulencia plasmídicos YopP y YopH de Ye inducen la secreción de Gal-1 y modulan la respuesta de citoquinas pro- y anti-inflamatorias.

079. (675) INFLAMACIÓN PROSTÁTICA EN UN MODELO DE INFECCIÓN POR CHLAMYDIA MURIDARUM

Sánchez, L., Breser, M., Altamirano, A., Motrich, R., Rivero, V.

CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. UNC

La inmunopatogénesis de las infecciones de tracto genital masculino por *Chlamydia trachomatis* es poco conocida. Previamente, demostramos que la infección por *Chlamydia muridarum* (Cm) en ratones NOD muestra un curso ascendente con especial tropismo por la próstata, induciendo infiltración y auto-anticuerpos. El objetivo de este trabajo fue evaluar este proceso infeccioso y sus consecuencias en una cepa no susceptible al desarrollo de prostatitis autoinmune. Para ello, ratones macho de la cepa Balb/c fueron inoculados vía meato urinario con Cm (grupo INF) o buffer salino (grupo Ctrl) y se estudio el curso de la infección y la inflamación generada a lo largo de la misma. A los 30 días post-infección (30 dpi), se detectó la presencia de Cm en próstata de los animales del grupo INF demostrando el curso ascendente de la infección similar al observado en ratones NOD. Sin embargo y en discrepancia con lo observado en ratones NOD, el infiltrado presente fue menor y principalmente compuesto de células GR1⁺. Para determinar si el infiltrado fue sólo consecuencia de la presencia de Cm, administramos el antibiótico doxiciclina por 14 días a las dos cepas de animales a partir del día 30 pi (grupos INF+ATB, en NOD y Balb/c). Los animales fueron sacrificados a los 60 dpi observándose una reducción significativa en la cantidad de células CD45⁺ en próstata de ratones Balb/c del grupo INF+ATB ($p \leq 0.001$), alcanzando niveles similares al grupo Balb/c Ctrl. Por el contrario, ratones NOD tanto de los grupos INF como INF+ATB, evidenciaron una significativa infiltración de células CD45⁺, siendo éste principalmente compuesto por células CD3⁺CD4⁺ y GR1⁺. Estos resultados demuestran que después del tratamiento con ATB, el infiltrado inflamatorio en próstata sólo persiste en la cepa susceptible al desarrollo de prostatitis autoinmune, sugiriendo que la infección por *Chlamydia* podría actuar como factor desencadenante de procesos autoinmunes contra próstata.

080. (757) EL ESTRÉS NUTRICIONAL POR BAJA DISPONIBILIDAD DE HIERRO INDUCE EN B. PERTUSSIS UN FENOTIPO CON MAYOR CAPACIDAD DE INMUNOEVASIÓN

Alvarez Hayes, J.¹, Lamberti, Y.¹, Gorgojo, J.¹, Schmidt, F.², Rodriguez, M.¹

CINDEFI - UNLP - CONICET¹ Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics Ernst-Moritz-Arndt-University of Greifswald, Alemania²

La baja eficiencia de las vacunas actuales contra *B. pertussis*, agente causal de la tos convulsa, ha determinado que la enfermedad fuera declarada re-emergente. Diferencias entre el fenotipo vacunal y el infectante parecerían contribuir a esta situación. Previamente nuestro grupo caracterizó el proteoma de *B. pertussis* cultivada bajo limitación de hierro, fenotipo que la bacteria presenta durante la infección. En el presente trabajo, se completó el análisis proteómico mediante el uso de proteómica *shotgun*, una estrategia que permite estudiar un gran número de proteínas debido a su alta sensibilidad y rendimiento. Mediante esta metodología pudimos detectar que en limitación de hierro *B. pertussis* aumenta el nivel de expresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de cápsula y disminuye los niveles de expresión de todos sus factores de virulencia, entre ellos los antígenos incluidos en las vacunas actuales FHA; Fim, PT y Prn. Los resultados muestran una relación de nivel de expresión Fe⁻/Fe⁺ de 0,44, 0,56, 0,66 y 0,60, respectivamente ($p < 0,05$). Si bien la atenuación de la virulencia podría representar una desventaja para la bacteria, ensayos de fagocitosis empleando neutrófilos humanos (PMN) y técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal demostraron

que este fenotipo escapa más eficientemente a la captura por PMN, observándose una disminución en la fagocitosis cercana al 40%. Ensayos con PMN tratados con citocalasina D, demostraron que dicha disminución se debe básicamente a una menor adhesión bacteriana a la célula inmune. Este efecto podría originarse en la baja expresión de FHA, proteína que media la adhesión a células inmunes en ausencia de anticuerpos, a la producción de cápsula, o a una combinación de ambos factores. En resumen estos resultados sugieren que la adaptación a condiciones de infección induce en *B. pertussis* un fenotipo con mayor capacidad de inmunoevasión.

081. (230) IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS "HOT SPOT" RESPONSABLES DE LA ACCIÓN DIFERENCIAL DEL SUPERANTÍGENO SEG CON EL TCR MURINO Vb8.2

Fernández, M., Romasanta, P., Noli Truant, S., Todone, M., Bauer, A., De Marzi, M., Malchiodi, E., Fernández, M. *IDEHU, CONICET*

Los superantígenos bacterianos (SAGs) son toxinas que sin ser procesadas, interactúan con el CMH-II y la región Vb del TCR produciendo una respuesta inmune exacerbada de tipo proinflamatoria, conocida como SST, que puede ser letal. Además, los SAGs se asocian fuertemente con el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes en individuos susceptibles. Dos modelos murinos para estas enfermedades muestran que los TCRs involucrados expresan preferentemente cadenas Vb8.2. El SAG SEG forma parte del grupo II, que se caracteriza por interactuar con Vb8.2, pero actúa diferencialmente con esta cadena según lo demostramos mediante estudios biológicos y cristalográficos. La resolución de la estructura cristalina SEG-Vb8.2 identificó la zona de contacto, pero no los residuos responsables de la acción biológica diferencial de SEG, ni el aporte energético para la estabilización del complejo. Para ello, diseñamos mutantes a partir de los datos cristalográficos en las zonas "hot spot" y realizamos estudios de interacción por SPR e inoculación de los mutantes en ratones. Observamos que la mutación K19A disminuye en un orden de magnitud la afinidad de SEG por Vb8.2 ($KD=6.6\pm 0.3\times 10^{-6}$), mientras que G20A y F204A ($KD=3.4\pm 0.5\times 10^{-5}$ y $KD=2.8\pm 0.2\times 10^{-5}$, respectivamente) la afectan en dos órdenes de magnitud, por lo que serían energéticamente más importantes. No obstante, los ensayos biológicos demostraron que K19A sería uno de los responsables de la acción sistémica de SEG, no observada en otros miembros del grupo. Estos estudios permiten caracterizar integralmente sitios de acción para el correcto diseño de análogos competitivos que puedan aplicarse al tratamiento de las patologías causadas por estas toxinas.

REPRODUCCIÓN 1

082. (4) IGF-1 REGULA LA EXPRESIÓN GÉNICA DE BOULE Y CDC25A EN UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE TESTOSTERONA Y MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 EN TESTÍCULOS DE RATONES

González, C.; Dorfman, V B.; Vitullo, AD. *CEBBAD, Universidad Maimonides*

La familia génica *DAZ* consiste de dos genes autosómicos, *Boule* y *Daz-1* (*DAZ-like*), y el gen *Daz* en el cromosoma Y. Todos se expresan en la línea germinal y son esenciales para el desarrollo y diferenciación de las células germinales (CG). Sin embargo, la regulación de estos genes durante la espermatogénesis no ha sido aun dilucidada. Por otro lado, se ha propuesto que el factor regulador del ciclo celular *CDC25A* sería modulado por la familia *Daz*. El objetivo de este trabajo fue estudiar en testículos de ratones adultos Balb/c el patrón de expresión de las proteínas *DAZ-L*, *BOULE* y *CDC25A* y la regulación génica ejercida por testosterona (T) y el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1). Por inmunofluorescencia/inmunoquímica se observó que *DAZ-L* se localizó en CG premeióticas, mientras que *BOULE* y *CDC25A* se localizaron en espermatocitos y espermatídes. Por

otro lado, los testículos fueron cultivados en Medio 199 (0,1% de BSA) e incubados con T ($10^{-6}M$) o IGF-1 (100ng/ml) por 1, 3 y 6 h y se analizó la expresión génica de *Daz-1*, *Boule* y *Cdc25a* por Real time PCR. La expresión de *Daz-1* no se modificó en presencia de T o IGF-1. Sin embargo, T indujo un incremento significativo en la expresión génica de *Boule* ($p<0,05$), efecto que fue revertido en presencia de Flutamida (Flu) (inhibidor de la captación de T, 100nM) ($p<0,05$). La incubación con IGF-1 aumentó significativamente la expresión génica de *Boule* y *Cdc25a* ($p<0,05$). La presencia de Flu en el medio no revirtió este efecto, mientras que la incubación con U0126 (inhibidor de ERK1/2, 10 uM) bloqueó el aumento de la expresión de *Boule* y *Cdc25a* ejercido por IGF-1 ($p<0,05$). En conclusión, el patrón de expresión de *DAZ-L*, *BOULE* y *CDC25A* indicaría que estas proteínas actúan en distintos momentos durante la espermatogénesis. Por otro lado, IGF-1 modularía la expresión génica de *Boule* y *Cdc25a* en un proceso independiente de la producción de T y que involucra la activación de ERK1/2 en testículos de ratones.

083. (239) LA ACTIVACIÓN DEL PPARβ/δ (PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR β/δ) REGULA EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA CÉLULA DE SERTOLI (CS).

Regueira, M.; Riera, MF.; Galardo, MN.; Pellizzari, EH; Cigorruga, SB; Meroni, SB *CEDIE CONICET*

La CS metaboliza glucosa a lactato, fuente energética de células germinales (CG). Se ha postulado que CS utiliza los ácidos grasos (AG) como su principal fuente energética. En algunos tejidos que utilizan la oxidación de AG como fuente energética, el PPARβ/δ participa en la regulación de genes vinculados con el transporte y metabolismo de AG tales como: *FAT/CD36*, carnitina palmitoil-transferasa 1 (*CPT1*) y deshidrogenasas de cadena media (*MCAD*) y larga (*LCAD*). El objetivo del presente trabajo fue analizar si la activación de PPARβ/δ regula la expresión de los genes mencionados, así como si dicha activación modula la producción de lactato en CS. Cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron incubados en condiciones basales o estimulados por 48 h con GW0742 (GW, 5μM), activador farmacológico de PPARβ/δ. Se determinaron los niveles de ARNm de *CPT1* por Northern Blot y de *FAT/CD36*, *MCAD* y *LCAD* por RQPCR. Se observó que GW estimula la expresión de *CPT1*: $3,5\pm 0,2^*$; *FAT/CD36*: $2,2\pm 0,7^*$; *MCAD* $1,6\pm 0,3^*$ y *LCAD*: $3,6\pm 0,9^*$ veces con respecto al basal ($X\pm DS, *p<0,05, n=3$). Adicionalmente, se observó que la activación de PPARβ/δ incrementa la producción de lactato (Basal: $7,5\pm 0,5$; GW: $12,1\pm 0,6^*$ μg/μgDNA, $X\pm DS, *p<0,05, n=3$). Se evaluó la posibilidad de que este incremento fuera debido a un aumento de la disponibilidad del sustrato, piruvato. El complejo piruvato deshidrogenasa (*PDC*) cataliza la conversión de piruvato a Acetil-CoA y su actividad se inhibe por fosforilación. Al respecto, se observó que la activación de PPARβ/δ aumenta los niveles de P-PDC con su consiguiente inhibición, lo que aumentaría la disponibilidad de piruvato para ser convertido en lactato. En su conjunto estos resultados sugieren que la activación de PPARβ/δ participa en la regulación de la expresión de genes vinculados a la metabolización de AG, fuente energética para las CS, y simultáneamente asegura la producción de lactato, fuente energética para las CG (PICT2007-1004, PIP2009-806).

084. (299) CROSS-TALK ENTRE LAS VÍAS DE AMPK/PKA Y SFK/FOSFATASAS EN LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO

Battistone, M.¹; Da Ros, V.¹; Salicioni, A.²; Navarrete, F.²; Weigel Muoz, M.¹; Visconti, P.²; Cuasnicu, P.¹ *IBYME¹ Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts-Amherst²*

Estudios recientes en roedores postulan que el aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina que ocurre durante la capacitación de los espermatozoides involucraría no sólo la vía AMPK/PKA sino también la inactivación de fosfatasa mediada por la familia de kinasas SRC (SFK). En el presente trabajo, in-

vestigamos la participación de ambas vías y su posible cross-talk durante la capacitación de espermatozoides humanos. Los niveles de AMPc intracelular, evaluados por radioensayo a lo largo de la capacitación (18 hs), mostraron un valor máximo al minuto de incubación ($p < 0.05$), seguido de aumentos tanto en la fosforilación de los sustratos de PKA (1 min) como en residuos tirosina (6 hs) evaluados por Western blot. La vía de SFK/fosfatasa fue analizada mediante el uso de inhibidores de estas enzimas. En presencia de un inhibidor de SFK (SKI606), se observó una disminución en la ocurrencia de ambas fosforilaciones, no detectada cuando los espermatozoides fueron incubados con SKI606 en presencia del inhibidor de fosfatasa ácido okadaico (AO), sugiriendo que la SFK inactivaría a las fosfatasa. Resultados similares se observaron al evaluar la motilidad espermática por CASA en muestras control y tratadas con SKI606 y/o OA. Finalmente, se estudió la existencia de un *cross-talk* entre las vías descriptas. Así, la presencia de un análogo de AMPc (dibutilil AMPc), capaz de inducir la fosforilación en sustratos de PKA y en residuos de tirosina, no produjo ningún efecto cuando SFK estaba inhibida por SKI606. Más aún, la inhibición de las fosfatasa por OA no fue capaz de inducir las fosforilaciones cuando la incubación se realizó en presencia de H89, inhibidor de PKA. En conjunto, estos resultados indican la participación y *cross-talk* de las vías AMPc/PKA y SFK/fosfatasa conducentes a la fosforilación de proteínas durante la capacitación del espermatozoide humano.

085. (308) EXPRESION DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS EN TESTÍCULO: ESTUDIO COMPARADO ENTRE PRIMATE Y HUMANO

Berensztein, E.^{1,3}; Plant, T.²; Ponzio, R.³; Chirico, D.¹; Rivarola, M.¹; Belgorosky, A.¹

HOSPITAL DE PEDIATRIA GARRAHAN¹ University of Pittsburgh School of Medicine, Departments of Obstetrics, Gynecology and Reproductive² Instituto de Investigaciones en Reproducción (IdIR) Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³

El receptor de andrógenos (AR) se expresa en las células de Sertoli (CS) adultas pero no en la infancia, cuando los niveles séricos de gonadotropinas (Gn) y testosterona alcanzan valores puberales sin desarrollo de espermatogénesis. El objetivo de este trabajo fue analizar el rol de las Gn en la regulación de la expresión de AR. Estudiamos 1) la inmunexpresión de AR en testículo humano (TH) y en testículo de un primate superior, Macaca mulatta (TM), 2) la ontogenia de la expresión de AR en CS y 3) el efecto de la estimulación in vivo con Gn sobre la expresión de AR en CS de TM juvenil. Resultados: 1) En TH y TM adultos, la localización de AR fue similar: positiva en CS, C de Leydig, intersticiales y peritubulares, y negativa en C germinales. 2) En TH, la expresión de AR en CS (% de positivas) en recién nacidos (< 1 mes (m), $n=6$) fue 2.25% y en infantes (1-7 m, $n=10$) 2.96%, significativamente menor que en prepuberales (1-11 m, $n=8$) 5.9% y puberales (14-15 años, $n=4$) 92.3%. En TH adulto fue 100%. En TM, la expresión de AR en CS fue 0.5% en recién nacidos (9-18 días, $n=2$) y 0% en infantes (4-5 m, $n=2$), significativamente menor que en juveniles (13-15 m, $n=7$) 51.0% y puberales (38-47 m, $n=6$) 86.1%. En adultos (60 m, $n=4$) fue 96.7%. La correlación entre AR en CS y edad fue positiva y significativa tanto en TH ($r=0.951$, $p < 0.001$) como en TM ($r=0.898$, $p < 0.000$). 3) La estimulación con Gn demostró que AR en CS aumento bajo FSH (79.3 \pm 13.6), LH (69.2 \pm 13) y FSH+LH (85.5 \pm 10.7) respecto al vehículo (35.5 \pm 17.6 %), $p < 0.05$, ANOVA y Bonferroni. Teniendo en cuenta el incremento de AR en testículo inmaduro previo al aumento puberal de Gn, nuestros resultados sugieren que si bien FSH y LH regularían la expresión de AR en CS, otros factores participarían en la expresión temprana de AR en CS. La validación del modelo de primate Macaca mulatta con el humano abre un amplio rango de posibilidades que enriquece el actual conocimiento sobre TH inmaduro.

086. (309) LA HISTAMINA COMO FACTOR DE CRECIMIENTO AUTÓCRINO EN CÉLULAS DE LEYDIG TUMORALES

Pagotto, R.¹; Monzón, C.¹; Besio Moreno, M.¹; Pignataro, O.^{1,2}; Mondillo, C.¹

Lab de Endocrinol Molec y Transd de Señales, IBYME-CONICET¹ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA²

La histamina (HA) es una amina endógena procedente de la descarboxilación de la L-histidina por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC). Actúa como factor de crecimiento autócrino / parácrino en numerosos modelos experimentales, incluyendo células normales y tumorales. Publicaciones previas de nuestro grupo y otros han documentado la existencia de un sistema histaminérgico en testículo de diversas especies, capaz de contribuir a la regulación de la esteroidogénesis en células de Leydig (CL). A su vez, se ha señalado que la HA cumpliría un papel en el desarrollo testicular, aunque su posible función como modulador de la proliferación de las CL ha sido poco estudiada. Recientemente demostramos que la HA estimula la proliferación de las CL tumorales MA-10 mediante la unión a receptores H2 (H2R) y un aumento del AMPc intracelular. El objetivo del presente trabajo fue profundizar en el estudio del mecanismo de acción de la HA en las CL MA-10, y evaluar su posible efecto sobre la proliferación de CL normales. Para ello, empleamos cultivos de CL progenitoras (CLP) e inmaduras (CLI), purificadas a partir de testículos de ratas de 20 y 35 días de edad, respectivamente. Observamos un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 post tratamiento con HA o un agonista H2R-específico en CL MA-10, mientras que la HA no modificó la proliferación de las CLP o CLI en ninguna de las concentraciones evaluadas (0,1 nM a 10 μ M). Cuando estudiamos la expresión de HDC en CL MA-10, CLP, CLI y homogenato de testículo, encontramos niveles significativamente superiores en las primeras, lo cual se correspondió con una elevada actividad enzimática. Más aún, el tratamiento de las CL MA-10 con un inhibidor de HDC resultó en una disminución significativa de la proliferación. En conjunto, nuestros resultados constituyen la primera evidencia experimental de una posible correlación entre sobreproducción autócrina de HA y proliferación neoplásica en CL. (Subsidios: CONICET, ANPCYT, UBA y F. Roemmers)

087. (715) EL SEMEN INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN UN PERFIL TOLEROGÉNICO

Remeslenicov, F.¹; Varese, A.¹; Rodríguez Rodríguez, C.¹; Jancic, C.²; Merloti, AG.¹; González, H.¹; Alonso, A.³; Pasqualini, A.³; Davio, C.⁴; Geffner, J.^{1,2}; Ceballos, A.¹

Instituto de Investigaciones Biomedicas en Retrovirus y Sida FMED UBA¹ Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires² Hali-tus³ Laboratorio de Farmacología de Receptores, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA⁴

Estudios recientes han demostrado que el plasma seminal gatilla una respuesta inflamatoria en la mucosa genital femenina, pero además induce mecanismos regulatorios que permiten el desarrollo del feto en el útero. Estos mecanismos regulatorios, sin embargo, no están claramente dilucidados. En este trabajo estudiamos la capacidad del plasma seminal de modular el perfil de diferenciación de las células dendríticas (CDs). El plasma seminal se obtuvo a partir de muestras de semen provenientes de dadores sanos previo consentimiento. Las CDs fueron obtenidas a partir de monocitos cultivados con IL-4 y GM-CSF por 5 días, en ausencia o presencia de plasma seminal (SP-CDs). Se analizó el fenotipo de las CDs por citometría de flujo y se midió la producción de citoquinas por ELISA. Se estudió la capacidad de las CDs de inducir la proliferación de linfocitos alogénicos por marcación con CFSE y la capacidad de expandir la población T CD4+FOXP3+ por citometría de flujo. Se analizó el papel de las prostaglandinas usando antagonistas de sus receptores EP2 y EP4. Las SP-CDs presentaron una baja expresión de CD1a (MFI: 7464 \pm 106 vs 210 \pm 25 para CDs vs SP-CDs) y altos niveles de CD14. Las SP-CDs no fueron capaces de madurar en respuesta al LPS, TNF- α , CD40L, Pam2 o Pam3. Luego de la activación, producen bajas cantidades de citoquinas proinflamatorias como IL-12p70, IL-1 β , TNF- α , e IL-6, pero altas cantidades de IL-10 y TGF- β . Además,

inducen la expansión de células T CD4+FOXP3+: el % de células CD25+FOXP3+ fue 2.8±1 vs 9.1±4 (p<0.05, CDs vs SP-CDs). La inhibición de los receptores EP2 y EP4 previene el efecto inducido por el plasma seminal sobre el fenotipo y la funcionalidad de las CDs, sugiriendo un papel central de las prostaglandinas de la serie E. Mediante la inducción de CDs tolerogénicas, el plasma seminal puede favorecer la fertilidad y comprometer la capacidad de la pareja receptora de montar una efectiva respuesta inmune frente a patógenos de transmisión sexual.

088. (326) LA INTERLEUQUINA 6 (IL-6) INDUCE EN EL TESTÍCULO DE LA RATA INFLAMACIÓN Y DESCAMACIÓN DEL EPITELIO GERMINAL AFECTANDO LA FUNCIONALIDAD DE LA BARRERA HEMATO-TESTICULAR (BHT).

Pérez, C.¹; Jacobo, P.¹; Pellizzari, E.²; Cigorruga, S.²; Lustig, L.¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, UBA¹ Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez²

La inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes induce en la rata un estado de inflamación testicular asociado a un daño severo del epitelio seminífero y alteraciones de la BHT. Siendo la IL-6 una de las citoquinas que se encuentra incrementada en dicho cuadro el objetivo de este trabajo es analizar los efectos de dicha citoquina sobre la histopatología testicular y la funcionalidad de la BHT. Ratas *Sprague-Dawley* adultas fueron inyectadas en el parénquima testicular con 1 µg de IL-6 recombinante de rata en un volumen de 100 µl o con 100 µl de solución fisiológica (grupo control). La histopatología testicular analizada 72 h luego de la inyección de la citoquina reveló la presencia de focos de túbulos seminíferos (TS) con diferentes grados de descamación celular e infiltrado linfomonocitario cercano a los TS dañados. Por citometría de flujo se cuantificó el número de células CD45+ observándose un incremento significativo en los testículos inyectados con IL-6 comparados con los controles. Resultados de inmunofluorescencia muestran una reducción en la expresión de ocludina y una deslocalización de claudina-11 en el epitelio germinal de los TS dañados de ratas inyectadas con IL-6. Por otro lado, el agregado de IL-6 a cultivos de células de Sertoli indujo una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial y una redistribución de las proteínas ocludina y claudina-11 alterando la barrera formada por las uniones estrechas. Los efectos de la IL-6 son en parte mediados por la vía de señalización de la MAPK p38 ya que el agregado de un inhibidor de dicha vía bloquea el efecto inducido por la citoquina. Concluimos que el papel de la IL-6 es relevante en el desarrollo de la orquitis autoinmune en la rata facilitando el reclutamiento de células inmunes al intersticio testicular y alterando la normal estructura y funcionalidad de la BHT.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 1

089. (30) PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE P38 MAPK EN LA INDUCCIÓN DE CICLOOXIGENASA-2 POR LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO EN CELULAS ADRENOCORTICALES MURINAS

Mercau, M.¹²; Giordanino, E.¹²; Astort, F.¹²; Sánchez, R.¹²; Martínez Calejman, C.¹²; Coso, O.³⁴; Cymeryng, C.¹²

Universidad de Buenos Aires - Facultad de Medicina¹ CEFyBO CONICET² IFIBYNE - CONICET³ Universidad de Buenos Aires - FCEN⁴

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento de células adrenocorticales murinas de la línea Y1 con lipopolisacárido bacteriano (LPS) estimula la producción de glucocorticoides por un mecanismo que involucra la inducción de COX-2, vía la activación del factor de transcripción NFκB. Los presentes experimentos fueron diseñados para evaluar la participación adicional de la vía de señalización de p38 mapk en la inducción de COX-2 por LPS. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento de células Y1 con LPS (10µg/ml) induce la fosforilación de p38 MAPK a los 30 minutos (p<0.01 vs 0 min,

ANOVA). También observamos que la inducción de COX-2 en células incubadas con LPS durante 24 horas es bloqueada por el co-tratamiento con el inhibidor selectivo de p38 MAPK SB203580 (p<0.001 vs. LPS, ANOVA). Por otra parte la transfección de células Y1 con plásmidos que expresan los dominantes negativos de MEK3 y MKK6 MAPKs evita el aumento de COX-2 por LPS (p<0.01 vs. LPS, ANOVA) y la sobreexpresión de las isoformas constitutivamente activas de estas dos quinasas induce la fosforilación de p38 MAPK y la expresión proteica de COX-2 (p<0.01 vs. LPS, ANOVA). El tratamiento con el inhibidor de la vía de p38mapk (SB203580) no evitó la inducción por LPS de un plásmido reportero de la actividad de NFκB. En conclusión nuestros resultados indican que la vía de p38 MAPK está involucrada en la inducción de la expresión de COX-2 por LPS en células adrenocorticales murinas, y que este mecanismo no afecta la activación del factor de transcripción NFκB. Sugerimos entonces que en las células adrenales Y1, la inducción de COX-2 por LPS es el resultado de la activación de al menos dos vías de señalización independientes.

090. (32) RSUME REGULA A UN GEN CLAVE EN EL DESARROLLO TUMORAL HIPOFISARIO

Fuertes, M.; Tedesco, L.; Sapochnik, M.; Arzt, E.

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires - CONICET - Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

El gen *pituitary tumor transforming gene* (PTTG) cumple un rol fundamental en el desarrollo de la patogénesis de los tumores de hipófisis ya que 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, aneuploidia, apoptosis, daño al ADN, entre otros, y conlleva al desarrollo de tumores. No se sabe la causa que provoca la desregulación de PTTG durante el proceso tumorigénico de hipófisis. En trabajos anteriores demostramos que *RWD-containing sumoylation enhancer* (RSUME) induce un aumento de la estabilidad proteica de PTTG mediante sumoilación, desencadenando su acción como oncogen. En este trabajo, mediante ensayos de arresto en las distintas fases del ciclo celular y western blot, en células de la línea lactosomatotrofa GH4 demostramos que la presencia de RSUME produce un aumento de PTTG diferencialmente en las fases del ciclo donde PTTG cumple su función (transición G1-S y M). En este sistema, al transfectar un siRNA específico para RSUME, vimos que el efecto de RSUME sobre la estabilidad proteica de PTTG se revierte. A nivel funcional, en cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), observamos anomalías cromosómicas incrementadas cuando las células fueron co-transfectadas con PTTG y RSUME, confirmando la participación de ambas proteínas en la desregulación del ciclo celular. En cultivo primario de MEF y en células GH4, demostramos que PTTG induce la aparición de células multinucleadas, y la presencia de RSUME potencia dicho efecto (p<0.05). Concluimos que el efecto de RSUME sobre la estabilidad proteica de PTTG conlleva a una desregulación funcional de PTTG y, en consecuencia, al desarrollo tumoral.

091. (270) EL EFECTO ANTITUMORAL DEL 5F 203 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO HUMANO INVOLUCRA ESTRÉS OXIDATIVO Y ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE AHR.

Callero, M.¹; Luzzani, G.¹; De Dios, D.²; Bradshaw, T.³; Loaiza Pérez, A.¹

Instituto Angel H. Roffo¹ Servicio de ginecología Instituto Angel H. Roffo² Centro de Ciencia Biomolecular, Universidad de Nottingham, UK³

5F203 es un nuevo agente antitumoral que está siendo probado en ensayos clínicos de fase I y posee potente actividad anti-proliferativa en tumores de mama y ovario. Este agente aumenta la expresión de CYP1A1, induciendo su metabolismo, necesario para su acción antitumoral. Anteriormente observamos que el efecto antiproliferativo/ proapoptótico del 5F 203 sobre las células de cáncer de ovario humano IGROV-1 fue mediado por la activación de la vía del receptor de hidrocarburos arílicos (Ahr). En este trabajo desarrollamos por primera vez un bioensayo

para predecir la sensibilidad a 5F 203 en un número pequeño de muestras de pacientes, los tumores sensibles a este agente in vitro, presentaban inducción del ARNm de CYP1A1 (78% sobre el control, medido por RT-PCR) y translocación de AhR al núcleo (medido por inmunofluorescencia). Los tumores resistentes no mostraban ni inducción del ARNm de CYP1A1 (16% del control), ni translocación de AhR. Postulamos que en los tumores de ovario la inducción de CYP1A1 y la presencia de AhR citoplasmático podría ser potenciales marcadores para predecir la sensibilidad al tratamiento con 5F 203, la falta de inducción del ARNm de CYP1A1 y la localización nuclear constitutiva de AhR indicaría posible falta de respuesta al tratamiento con 5F 203. Además 5F 203 ejercería su acción pro-apoptótica induciendo estrés oxidativo ya que provocó un aumento en la formación de especies reactivas de (ROS) en IGROV-1 ($2,34 \pm 0,34$ sobre el control, efecto parcialmente revertido por inhibidores específicos de ROS: N-acetil cisteína (NAC) y Trolox ($0,215 \pm 0,03$ y $0,71 \pm 0,13$ del control respectivamente), y expresión y activación de proteínas JNK y p38 α . La pre-incubación con estos inhibidores provocó una disminución en la cantidad de cuerpos apoptóticos inducidos por 5F203 (tinción con DAPI). Nuestros resultados indican que el 5F 203 sería un potencial agente terapéutico de relevancia clínica en cáncer de ovario.

092. (278) PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS EN LA REORGANIZACIÓN MITOCONDRIAL EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDOGÉNICAS.

Poderoso, C.¹; Duarte, A.¹; Soria, G.²; Gottifredi, V.²; Podestá, E.¹

INBIOMED UBA-CONICET Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA¹ Fundación Instituto Leloir²

En tejidos esteroideogénicos el transporte de colesterol de la membrana externa a la interna mitocondrial determina la eficiencia en la esteroideogénesis. Este transporte requiere de la formación de un complejo proteico en la mitocondria con la traslocación de las quinasas ERK y PKA. Es por ello que se ha planteado que la dinámica o la reorganización mitocondrial forma parte del mecanismo que utilizan las hormonas para regular la translocación de proteínas y la síntesis de esteroides. Hemos demostrado previamente en células de Leydig, que la fusión mitocondrial es necesaria para la producción de esteroides estimulada por hCG. Dado que los mecanismos regulatorios mitocondriales son comunes e independientes del estímulo y del tejido esteroideogénico, hemos estudiado el papel de la fusión en células adrenales y de Leydig estimuladas vía señales de transducción dependientes (hCG y ACTH) e independientes (EGF) de AMPc. Además se estudio la participación de la síntesis de ATP, de PKA y la fosforilación de ERK sobre la fusión mitocondrial inducida por AMPc. Los resultados muestran que la fusión mitocondrial es necesaria para la síntesis de esteroides en ambas células esteroideogénicas (líneas Y1 y MA-10) con una secuencia temporal que correlaciona con el estímulo esteroideogénico, permitiendo también la reorganización de la mitocondria y del retículo. Estos resultados fueron observados por microscopia electrónica como por microscopia confocal. La fusión también es dependiente de la actividad de PKA (%de células con fusión mitocondrial 100 vs 15 ± 3 hCG vs hCG+H89; $p \leq 0,01$) pero independiente de la activación de MEK y ERK (100 vs $97,3 \pm 2,5$ AMPc vs AMPc+PD98059; $p \leq 0,01$) y de la síntesis de ATP mitocondrial. Sin embargo la activación tanto de MEK y ERK depende de la fusión mitocondrial. Estos resultados resaltan la importancia del estudio temporal y espacial de la reorganización de las organelas en el mecanismo de acción hormonal teniendo la dinámica de organelas un impacto en los procesos biológicos.

093. (334) DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL EN MODELOS CELULARES DE FIBROSIS QUÍSTICA

Valdivieso, A.; Clazure, M.; Massip Copiz, M.; Schulman, G.; Santa Coloma, T.

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población de origen europeo. La misma es provocada por mutaciones en el gen *CFTR*, que codifica un canal de cloruro regulado por AMP cíclico. Mediante estudios de expresión diferencial de genes hemos observado la expresión reducida del gen mitocondrial *MTND4* en modelos celulares de FQ. Este gen mitocondrial codifica una subunidad del complejo I mitocondrial (C1m), que ha sido reportada como esencial para el ensamblaje y la actividad de dicho complejo. El C1m es el punto de entrada de electrones al sistema de fosforilación oxidativa y la falla en su actividad puede conducir a la producción de especies reactivas de oxígeno, con consecuencias muy dañinas para la correcta función celular. El objetivo de este trabajo es demostrar que la actividad del C1m también se ve afectada en FQ. Mediante el uso de Blue Native-PAGE, se encontró reducida la actividad en gel (AEG) del C1m en células CFDE e IB3-1 (líneas celulares FQ) comparadas con las células CFDE/6RepCFTR y S9 (corregidas para expresar CFTR salvaje), respectivamente. Además, las líneas celulares T84 y Caco-2 de carcinoma de colon humano, las cuales poseen una alta expresión de CFTR, ya sea tratadas con inhibidores del CFTR (glibenclamida, CFTR (inh)-172 y GlyH101) o transfectadas con shRNAi ("short hairpin-RNA interference") específico contra CFTR, mostraron una reducción significativa en la AEG del C1m. La reducción de la actividad del C1m causada por la inhibición de CFTR, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, podría tener un profundo impacto en las funciones mitocondriales y la fisiología celular de la FQ. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (MMMC y GS), ANPCYT (MC), y UCA (AGV).

094. (423) EFECTO DE LA INMUNOFILINA FKBP51 SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS MEDIADA POR EL HEAT-SHOCK FACTOR

Molinari, A.; Gallo, L.; Galigniana, M.

FCEN-UBA/IQUIBICEN e IBYME-CONICET

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la inmunofilina FKBP51 modula la localización subcelular y la respuesta biológica de factores nucleares tales como GR, MR, AR, p53 y NFkB. Estudios realizados por microscopia confocal y fraccionamiento subcelular demostraron que FKBP51 es una proteína mayoritariamente mitocondrial en todos los tipos celulares estudiados así como en diversos órganos murinos. El ayuno prolongado de los animales o la exposición de cultivos celulares a estrés oxidativo favorece la rápida translocación de FKBP51 al núcleo, sugiriendo que la activación del *heat-shock factor* (HSF) podría estar involucrada en tal efecto. Con el fin de confirmar esta hipótesis, cultivos celulares fueron expuestos a diversos tipos de estrés capaces de activar a HSF, tales como el shock térmico, luz UV, hiperosmolaridad, ayuno de aminoácidos o suero, inhibidores de la glutatión sintetasa (BSO), agentes oxidantes, lipopolisacáridos bacterianos, TNFa, inhibidores de la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos, inhibición de la actividad de Hsp90, etc. En todos estos variados casos, FKBP51 migró al núcleo y además, se concentró en los nucleolos. Cuando se estimularon células MEF KO para HSF1, la relocalización nuclear de la inmunofilina se atenuó o fue abolida. Estudios de coimmunoprecipitación demostraron que FKBP51 forma complejos con HSF1, y que la sobreexpresión de HSF1 ya concentra a FKBP51 en el núcleo (y en los nucleolos) aún en ausencia de estímulos externos. La exposición de células a arsenito formó los esperados gránulos de estrés en el citoplasma (TIAR y HDAC6 positivos), a los que se reclutó también FKBP51. Como estos gránulos también fueron observados en células MEF KO para HSF1, su formación es independiente de HSF1. No obstante, el número de células y de gránulos de estrés se vió incrementado por el *knock-down* de FKBP51 con un siRNA específico. Se concluye que FKBP51 tiene un rol protector directo sobre la respuesta a estrés medida por HSF1.

095. (505) IL-10 MODULA LA ACTIVACIÓN DE NF-KB Y LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS INFLAMATORIAS MEDIANTE REGULACIÓN POSITIVA DE SOCS3 EN MIOCARDIOCITOS INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI

Hovsepian, E.; Penas, F.; Mirkin, G.; Goren, N.
IMPAM,UBA-CONICET

La miocardiopatía chagásica es el resultado de la infección con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y constituye una importante causa de muerte por fallo cardíaco. El miocardio produce altos niveles de mediadores inflamatorios en respuesta a la infección. IL-10 es una citoquina pleiotrópica que juega un papel importante en la modulación de respuestas pro-inflamatorias vía activación de STAT3, quien a su vez promueve expresión de SOCS3. En este trabajo evaluamos la participación de esta vía en la modulación de parámetros inflamatorios en un modelo de miocardiocitos infectados con la cepa letal RA de *T. cruzi*. Confirmamos mediante Western blot (Wb) que la infección con *T. cruzi* y el tratamiento con IL-10 (20ng/ml) inducen fosforilación de STAT-3 en las células cardíacas. Sin embargo, observamos mediante RT-PCR cuantitativa (Q-RT-PCR) que IL-10 induce un aumento significativamente mayor de la expresión del ARNm de SOCS3 respecto a la inducida por *T. cruzi* ($p < 0.05$). En presencia de un inhibidor específico de la fosforilación de STAT-3 (stattic 10 μ M), los niveles del ARNm de SOCS3 resultaron inhibidos ($71 \pm 4.0\%$; $p < 0.05$) confirmando la importancia de la activación de STAT-3 en la expresión de SOCS3 mediada por IL-10. Detectamos que IL-10 inhibe la expresión (Wb) y actividad de la enzima óxido nítrico sintasa2 (NOS2) a las 48 h post-infección (NOx μ M Tc: 65 ± 6.0 ; Tc+IL-10: 43 ± 4.0 ; $p < 0.05$). Asimismo, el tratamiento con IL-10 disminuye la expresión y actividad de las metaloproteasas MMP9 y 2 (MMP9: $22 \pm 3.0\%$; MMP2: $50 \pm 5.0\%$; $p < 0.05$) inducidas por la infección. Más aún, detectamos mediante Q-RT-PCR que IL-10 inhibe la síntesis de IL-6 y TNF- α 4 h post infección así como la activación de la vía de NF- κ B analizada por Wb. Los resultados demuestran que STAT3 y SOCS3 estarían involucrados en los efectos antiinflamatorios mediados por IL-10 al inhibir la activación de NF- κ B y la expresión de NOS-2, MMPs y citoquinas pro-inflamatorias inducidas por la infección de miocardiocitos con *T. cruzi*.

096. (657) AMPc EXTRACELULAR COMO FACTOR AUTOCRINO DE CRECIMIENTO EN CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS

Díez, F.¹; Copsel, S.³; Gómez, N.²; Dodurisboure, R.²; Fernández, N.²; Shayo, C.³; Davio, C.²
Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA² Instituto de Biología y Medicina Experimental³

Recientemente hemos descrito en diferentes modelos de leucemia mieloide aguda que los niveles de AMPc intracelular (AMPci) son regulados por proteínas de resistencia a multidroga (MRPs), en particular MRP4, quien media la exclusión de dicho nucleótido cíclico. Dado que el bloqueo farmacológico de este transportador con probenecid causó una inhibición de la proliferación sin modificar los niveles de AMPci nos propusimos evaluar el rol del AMPc extracelular (AMPce). El tratamiento de las células leucémicas humanas U937 con AMPc logró revertir significativamente ($p < 0.05$) la inhibición de la proliferación inducida por probenecid de forma tiempo y concentración dependiente (CE50 1nM). En este sentido el AMPce condujo a la activación de ERK $1/2$ (Western Blot) clásicamente asociada a procesos proliferativos. Sobre la base de dichos resultados y a fin de detectar sitios de unión específicos a AMPc en células intactas realizamos ensayos de unión a radioligando [³H]-AMPc, demostrando la expresión de sitios específicos, saturables y desplazables por AMPc (Kd 10nM, Bmax 35000 sitios/célula). A su vez, células U937 con menores niveles de MRP4 (U937-MRP4shRNA) presentan mayor número de sitios en membranas (Kd 10nM Bmax 60000 sitios/célula) sugiriendo que dicha expresión estaría regulada por AMPc. Con el fin de confirmar que los efectos observados son mediados por AMPc y no por un producto metabólico del mismo, determinamos que dicho nucleótido cíclico permanece estable en el medio de

cultivo por lo menos 8 h. A su vez, se realizaron ensayos de unión en presencia de 100 μ M α, β -metilen-adenosina-5'-difosfato (inhibidor de ectofosfodiesteras), sin observarse modificaciones en los parámetros de Kd-Ki y número de sitios. Estos resultados nos permiten postular al AMPc como un factor autocrino de crecimiento, incrementando la complejidad de las señales que involucran a este mensajero.

NEUROCIENCIAS 1

097. (24) LOS EFECTOS BIOLÓGICOS POR ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ZNTE EN DOSIS SUB-TÓXICAS EN RATAS EN MADURACIÓN SON MEDIADOS POR Te.

Alvarez Toro, E.; Ratti, S.; Gaglio, E.
Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Area de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, IMBECU-CONICET, Mendoza

Los compuestos inorgánicos denominados "elementos trazas" han llamado la atención en biología molecular y neurofarmacología por su participación a bajas concentraciones con sistemas enzimáticos y regulación de la expresión génica en la célula. Nuestro laboratorio ha mostrado previamente que el tratamiento con ZnTe en dosis bajas modifica la exploración motivada y ciertas conductas sociales en ratas prepuberales. Dado que tanto Zn como Te son elementos traza, no fue posible identificar si este efecto se debió al Te, Zn o ambos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si ZnCl₂ en las mismas condiciones también puede afectar los parámetros cognitivos. Para ello, se trabajó con crías provenientes de parejas expuestas a 0.3 μ g/L (1.55 nM) de ZnTe o 0.21 μ g/L (1.55 nM) de ZnCl₂ disueltos en el agua de beber. Ratas que ingieren agua corriente se consideraron control absoluto. Se dispuso de 3 grupos: [1] Control (n=20); [2] 0.3 μ g/L de ZnTe (n=12) y [3] 0.21 μ g/L de ZnCl₂ (n = 11). 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 exploran más el lado izquierdo del pasillo que el derecho (62 ± 6 Cuentas/3 min, izquierdo, Versus 41 ± 5 Cuentas/3 min, derecho, $p < 0.05$). El tratamiento con ZnCl₂ no afectó esta exploración diferencial (80.5 ± 8 Cuentas/3 min, izquierdo Vs 33 ± 2.5 , derecho, $p < 0.01$). En cambio la administración de ZnTe la anuló totalmente (39 ± 6 Cuentas/3 min, izquierdo Versus 33 ± 7 Cuentas/3 min, derecho, n.s.). Como se observó anteriormente, la proporción de animales que exploran más el lado izquierdo que el derecho (75% en los controles) se mantuvo en los tratados con ZnCl₂ (90%) pero disminuyó en los tratados con ZnTe (50%). Los resultados sugieren que Te en la rata es el responsable de afectar las conductas cognitivas lateralizadas.

098. (85) ALTERACIONES GLIALES EN LAS VÍAS VISUALES SUPERIORES EN UN MODELO DE GLAUCOMA EXPERIMENTAL EN RATAS

Bordone, M.; Rosenstein, R.
Lab. de NROE, Dpto. Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA-CEfyBO/CONICET

El glaucoma es una disfunción ocular prevalente que se caracteriza por la pérdida progresiva de las funciones visuales, la muerte de células ganglionares retinianas (CGRs) y degeneración axonal. Si bien esta neuropatía fue concebida como una enfermedad limitada al ojo, los axones de las RGCs son extraoculares, con componentes intraorbitales e intracraneales. En la rata, más del 90% de los axones del nervio proyectan al colículo superior (CS) contralateral, principal sitio de referencia retiniana. Hemos desarrollado un modelo de glaucoma experimental a través de la inyección semanal de condroitín sulfato (CSU) en la cámara anterior del ojo, que reproduce aspectos centrales del glaucoma humano. El objetivo fue analizar los efectos de la hipertensión ocular sobre el CS y los mecanismos involucrados en las posibles alteraciones morfo-funcionales de este núcleo. Para ello, se

analizó el flujo de información retino-colicular, la función de la vía visual y la arquitectura axoglial del CS a diferentes períodos de hipertensión ocular (6, 10 y 15 semanas). El transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina del cólera (CT β) al CS disminuyó significativamente y progresivamente ($p < 0.01$) a partir de las 6 semanas de inyección de CSU. El registro de potenciales visuales evocados (VEPs) reveló alteraciones funcionales con un curso temporal similar: una caída significativa ($p < 0,05$) en la amplitud del componente N2-P2 de los VEPs a partir de las 6 semanas de hipertensión que progresó en períodos posteriores ($p < 0,01$). A las 15 semanas se observó una marcada respuesta astroglial y microglial en los CS que reciben axones aferentes del ojo hipertenso. Estos resultados sugieren una "desconexión" funcional entre la retina y las vías visuales superiores en etapas tempranas de hipertensión ocular (cuando aún el número de CGRs permanece inalterado), acompañada de alteraciones gliales más tardías en el CS.

099. (91) EL PRECONDICIONAMIENTO HIPOTÉRMICO GLOBAL U OCULAR PROTEGE A LA RETINA DEL DAÑO ISQUÉMICO

Aranda, M.; Dorfman, D.; Bordone, M.; Chianelli, M.; Rosenstein, R.; Salido, E.

Laboratorio NROE - Facultad de Medicina - UBA - CEFy-BO/CONICET

La isquemia es un componente central de diversas enfermedades retinianas que pueden causar ceguera irreversible. Diversas evidencias indican que la excitotoxicidad por glutamato participa en el daño isquémico retiniano. El objetivo de este trabajo fue examinar si un período breve de hipotermia global u ocular, aplicado 24 h antes de la isquemia (es decir, preconditionamiento hipotérmico, (PCH)) protege a la retina del daño inducido por isquemia/reperfusión y la participación del glutamato en la protección de la retina inducida por PCH. Para ello, en ratas *Wistar* macho adultas se indujo isquemia por aumento de la presión intraocular a 120 mmHg durante 40 minutos. Un día antes de la isquemia, los animales fueron sometidos a hipotermia (32°C por 20 min) global (aplicando packs de hielo al cuerpo del animal) u ocular (a través del flujo de un gel a 13°C) y 14 días después de la isquemia, se registraron electroretinogramas (ERG) escotópicos y se analizó la histología retiniana. La isquemia provocó daños funcionales (ERG) e histológicos (espesor total de la retina y número de células ganglionares) significativos ($P < 0.01$ vs. control), que fueron significativamente ($P < 0.01$ vs. isquemia) prevenidos por PCH global u ocular. Tres días después de la isquemia, la captación de glutamato y la actividad de glutamina sintetasa retinianas disminuyeron significativamente ($P < 0.01$ vs. control), en tanto que el PCH ocular previno significativamente el efecto de la isquemia sobre estos parámetros ($P < 0.01$ vs. isquemia). La inyección intravítrea de niveles suprafisiológicos de glutamato reprodujo parcialmente las alteraciones electroretinográficas e histológicas provocadas por la isquemia, que fueron significativamente prevenidas por el PCH ocular ($P < 0.01$ vs. glutamato). En suma, estos resultados sugieren que el PCH global o local provee una protección funcional e histológica significativa frente al daño isquémico retiniano, a través de un mecanismo dependiente de glutamato.

100. (123) ÁNGULOS Y LONGITUDES MEDIDOS EN IMÁGENES PARASAGITALES DE RESONANCIA MAGNÉTICA DEL CEREBRO DE AMBOS SEXOS

Merlo, A.; Albanese, A.; Gómez, E.; Miño, J.; Albanese, E. Facultad de Medicina USAL

La medición de ángulos en imágenes cerebrales puede contribuir a detectar variaciones relacionadas a la edad, sexo y/o patologías con independencia del tamaño del cerebro. Objetivos: Obtención de valores de ángulos y longitudes relacionadas en imágenes de resonancia magnética del cerebro de sujetos de ambos sexos. Material y método: En imágenes parasagitales de resonancia magnética de ambos hemisferios equidistantes del plano sagital medio de 28 sujetos masculinos y 36 femeninos de 41 a 60 años, sin enfermedades neurológicas ni psiquiátricas

utilizando el programa Scion Image for Windows, se trazaron desde el punto más anterior del borde dorsal del cuerpo caloso (punto V) hasta el borde dorsal posterior del cerebro en la intersección con el surco central, el segmento de recta L1, hasta la intersección con el surco cinguli, el L2 y hasta la intersección con el surco parieto-occipital el L3. Se midieron por el programa Scion Image for Windows los segmentos y los ángulos adyacentes comprendidos entre ellos, que de dorsal a ventral se denominaron ángulo 1 y ángulo 2. Los datos, separados por sexo, se procesaron estadísticamente (ANOVA). Resultados: Los valores (media \pm ES en grados) en el hemisferio derecho son para el grupo femenino y masculino respectivamente ángulo-1: 6.18 \pm 0.33 y 7.15 \pm 0.50; ángulo-2: 21.23 \pm 0.86 y 20.00 \pm 0.83 y en el izquierdo ángulo-1: 6.11 \pm 0.44 y 6.09 \pm 0.21 y ángulo-2: 20.49 \pm 0.93 y 18.68 \pm 1.23. Los ángulos homólogos no difieren significativamente entre sexos. (ANOVA). Los segmentos L1, L2 y L3 en hemisferio derecho y L1 y L2 en el izquierdo son mayores ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ ANOVA) en el grupo masculino. Conclusión: La ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ángulos homólogos en ambos sexos es compatible con la posibilidad de que las estructuras de las zonas correspondientes sean semejantes mientras que las longitudes son mayores en el sexo masculino.

101. (167) EVOLUCIÓN DEL FLUJO AUTOFÁGICO GLIAL EN EL HIPOCAMPO DE RATONES TRANSGÉNICOS PARA APP, MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Pavía, P.¹; Pomilio, C.¹; Vinuesa, A.¹; Gorojod, R.²; Alaimo, A.²; Kotler, M.²; Galván, V.³; Beauquis, J.¹; Saravia, F.¹ IQUIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales, UBA-IBYME-CONICET¹ IQUIBICEN Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales, UBA-CONICET² University of Texas Health Science Center at San Antonio USA.³

La presencia de placas amiloides (PA) en el cerebro es una característica central en la enfermedad de Alzheimer (AD). Anteriormente hemos descrito una alteración del volumen y ramificación de la astrogliá cercana a las PA, en un ratón transgénico para APP (PDAPP-J20) portando las mutaciones *Swe* e *Ind*, modelo reconocido de la AD. Por otro lado, alteraciones en la autofagia están asociadas al proceso neurodegenerativo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el flujo autofágico en este modelo, en particular en la glía asociada a las PA y su evolución en el progreso de la enfermedad. Usamos ratones hembras de 5, 8, 14 y 20 meses (m) de edad, transgénicos (Tg) y no transgénicos (NTg), como control. Empleando tinción histológica con Rojo Congo vimos que la densidad, el tamaño promedio y el área ocupada por PA en el área CA1 del hipocampo aumentan con la edad en los Tg. Por WB de homogenato de hipocampo se estudió la relación LC3 II/I, indicador de actividad autofágica. Mediante inmunohistoquímica para GFAP -marcador de astrocitos- y LC3 sobre cortes de hipocampo y microscopía confocal, vimos que las células GFAP+/LC3+ se encuentran en mayor medida cerca de las PA, llegando a un máximo de 52.5 \pm 9.9% del total de GFAP+ a los 14m ($P < 0.01$ vs lejos de PA), proporción que decae a los 20m ($P < 0.05$). Adicionalmente, se midió la densidad de astrocitos (células GFAP+/mm²) y se observó un descenso gradual de éstos con la edad ($P < 0.05$ entre 5 y 14m), hallándose exacerbado en los Tg ($P < 0.001$). Los datos obtenidos indican que en el ratón PDAPP-J20 el flujo autofágico aumenta paulatinamente en los astrocitos que rodean las PA hasta los 14 meses, posiblemente contribuyendo al *clearance* del depósito amiloide y luego esta capacidad disminuye, acompañada de un agravamiento de la patología amiloide y una disminución concomitante de la población glial. Nuestros resultados enfatizan el rol de la glía en la progresión del proceso neurodegenerativo asociado a AD.

102. (177) EL BLOQUEO CENTRAL DEL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES (MR) DISMINUYE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DEL ARNm DE VASOPRESINA (AVP) EN LA RATA ESPONTANEAMENTE HIPERTENSA (SHR)

Pietranera, L.^{1,2}; Brocca, M.¹; Roig, P.¹; De Nicola, A.^{1,2}

*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET
Depto. Bioquímica Humana. Fac. de Medicina-UBA²*

La rata SHR presenta numerosos cambios hipocámpales, tales como disminución de la neurogénesis, astrogliosis y aumento de aromatasa. Asimismo, los animales hipertensos presentan hiperfunción hipotalámica por aumento en la expresión del neuropéptido vasopresina (AVP) en el núcleo paraventricular (PVN), e hiperrespuesta al tratamiento mineralocorticoide. Los mineralocorticoides poseen numerosos efectos en el cerebro. Estos incluyen el control de las funciones cardiovasculares, la inducción de apetito salino, interacción con neuropéptidos como AVP y angiotensina II, y el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial. En este sentido, los mineralocorticoides jugarían un rol patogénico en SHR. En trabajos anteriores mostramos que la expresión del MR esta aumentada en el hipocampo y en el PVN de ratas SHR. En este trabajo evaluamos el efecto de una inyección icv de 100 ng de RU28318 (antagonista MR) sobre la presión arterial y la expresión de AVP en el PVN. La inyección fue realizada en animales SHR y WKY (control normotenso) de 20 semanas de vida a los que se les midió la presión arterial 12 horas posteriores a la inyección. Inmediatamente los animales fueron sacrificados y los cerebros procesados para cuantificar la expresión del ARNm de AVP por hibridación *in situ* no isotópica. El tratamiento con RU28318 en los animales SHR: 1. redujo la presión arterial media (WKY:118,0±3,3; SHR:151,5±6,2; SHR+RU:126,7±5,7 mmHg; p<0.01 SHR vs todos los grupos), 2. redujo el área que expresa ARNm para AVP en el PVN (WKY:59332,5 ± 9113,4; SHR:123604,2 ± 12835,6; SHR+RU:84662,1± 15211,3 um²; p<0.05 SHR vs todos los grupos) En conclusión, las ratas SHR presentan hiperexpresión del MR en hipocampo e hipotálamo. El bloqueo de la actividad central del MR disminuye la presión arterial y la hiperexpresión de AVP. Estos resultados demuestran la participación del MR en el desarrollo de la encefalopatía hipertensiva y la génesis de la hipertensión arterial en la rata SHR.

103. (238) EL RECEPTOR DE PATRONES MOLECULARES RAGE MEDIA EL DAÑO NEURONAL Y LA GLIOSIS REACTIVA EN UN MODELO IN VITRO DE APNEA DEL SUEÑO.

Angelo, M.¹; Lukin, J.¹; Aguirre, A.¹; Villarreal, A.¹; Vanasco, V.²; Alvarez, S.²; Epstein, A.³; Jerusalinsky, D.¹; Ramos, A.¹
Instituto de biología Celular y Neurociencia Prof. E. De Robertis¹ Cátedra de Fisiología, Programa de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), FFyB, UBA² Centre de Génétique et Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Villeurbanne, France³

La Apnea del Sueño (AS) es una patología que produce importantes alteraciones cognitivas, probablemente inducidas por el stress oxidativo. Los ciclos de cese de la respiración producen una hipoxia intermitente (HI) que afecta a todo el organismo. En trabajos previos utilizando modelos experimentales de AS, hemos demostrado gliosis reactiva, alteraciones neurodegenerativas y la sobreexpresión de RAGE así como de su ligando S100B (Avilés Reyes y col., J. Neurochem 2010). Más aun, la AS experimental indujo un aumento en el stress oxidativo (TBARS) y la activación NF-κB. Para estudiar la participación de la vía S100B>RAGE>NF-κB en las alteraciones neuronales y gliales, realizamos ensayos de pérdida de función con anticuerpos neutralizantes anti-RAGE, anti-S100B o un bloqueante químico de NF-κB infundidos intrahipocámpalmente en animales expuestos al modelo de AS. El bloqueo de RAGE disminuyó las alteraciones neuronales y la gliosis reactiva, mientras que el bloqueo de S100B previno la gliosis reactiva pero no las alteraciones neuronales en estos animales. El bloqueo de NF-κB redujo las alteraciones neuronales en los animales AS pero mostró efectos perjudiciales en condiciones normóxicas. Experimentos de ganancia de función mostraron, en animales *naïve*, que la sobreexpresión de RAGE-FL entregado a través de un vector viral, pero no de su dominante negativo (RAGE-DN), produce alteraciones neuronales similares a las observadas en animales AS. En

cultivos primarios mixtos hipocámpales (glía y neuronas) la HI indujo un aumento en los TBARS y cambios en la morfología glial que fueron prevenidos por anticuerpos neutralizantes de RAGE o por la sobreexpresión de RAGE-DN. Sorpresivamente el tratamiento *in vitro* con S100B exógena no incrementó la gliosis reactiva. Estos resultados indican que RAGE y NF-κB estarían involucrados en las alteraciones neuronales y la gliosis reactiva inducidas por la AS. Subsidios: PIP CONICET 1728, UBACYT, PICT 2008-1590.

ONCOLOGÍA 2

104. (81) LA INHIBICIÓN DE P300 RETARDA EL CRECIMIENTO DEL CARCINOMA MAMARIO A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y DE LA APOPTOSIS. IMPORTANCIA DE LA LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE ESTE COFACTOR TRANSCRIPCIONAL.

Fermento, M.¹; Gandini, N.¹; Arévalo, J.²; Blasco, J.²; Lopez Romero, A.³; González Donna, L.⁴; Ferro, A.⁴; Salomón, D.¹; Ferronato, M.¹; Facchinetti, M.¹; Curino, A.¹
INIBIB-CCT-BAHÍA BLANCA¹ Servicio Anatomía Patológica, Hospital Interzonal Dr. Jose Penna Bahía Blanca² Departamento de Hematología, IACA, Bahía Blanca³ Hospital Italiano Regional del Sur, Bahía Blanca⁴

El cofactor transcripcional p300 participa en los procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia. Anteriormente demostramos que su localización sub-celular se correlaciona con la sobrevida global de los pacientes y que su inhibición disminuye la supervivencia celular y la progresión tumoral en un modelo de carcinoma mamario murino. El objetivo de este trabajo es investigar los mecanismos responsables de estos efectos y ampliar el estudio de la expresión de p300 en tumores humanos. El tratamiento de células LM3 (derivadas de un carcinoma mamario murino) con un inhibidor farmacológico del p300 (vv59; 50 μM, 24 hs), incrementó los niveles de p53, p21 y Bax, y disminuyó los de pBad sin modificar los de ciclina D y E. También se observó por citometría de flujo un incremento de la población sub G0/G1 (p=0,044) y de la marcación con anexina V (p=0,029) (test de student). En un modelo de trasplante singéico de LM3, los tumores de los ratones tratados con vv59 tuvieron una disminución significativa de la carga tumoral (p=0,042), del índice mitótico (p=0,045) y de la marcación de Ki67 (p<0,001) y un aumento de la expresión de BAX (p=0,014) (Mann Whitney). Por otra parte se duplicó el número de biopsias humanas, analizándose la expresión de p300 en 81 muestras de carcinoma mamario ductal y detectándose una mayor sobrevida de los pacientes cuyos tumores presentaban localización exclusivamente citoplasmática y una menor sobrevida en aquellos que la presentaban exclusivamente nuclear (p<0,001; Log Rank test). En conclusión, la inhibición de p300 induce apoptosis en las células LM3 y disminuye la progresión tumoral en el modelo animal aumentando la apoptosis y disminuyendo la proliferación celular. Además, nuestros resultados muestran que la presencia del co-factor en el citoplasma se correlaciona con una mayor sobrevida de los pacientes sugiriendo que su localización nuclear es necesaria para que pueda ejercer efectos pro-tumorales.

105. (120) EXPRESIÓN DE FGFR Y SUS ISOFORMAS EN CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL.

Sahores, A.; Wargon, V.; Lanari, C.; Lamb, C.
Instituto de Biología y Medicina Experimental

Los receptores para factor de crecimiento fibroblástico tipo 1 y 2 (FGFR1 y 2) presentan 2 isoformas: -IIb y -IIc, que se expresan en tejido normal en epitelio y mesénquima, respectivamente. En muestras de cáncer de mama humano demostramos, una asociación significativa entre la expresión de FGFR2 y receptores de estrógeno acompañada de una tendencia a una correlación positiva entre FGFR1 y alto grado histológico. En un modelo murino, contamos con variantes sensibles y otras que no regresionan con el tratamiento con antiprogéstágenos (hormono-independientes-

resistentes), y demostramos que en un carcinoma respondedor los FGFR2 activados por el estroma participan en el crecimiento tumoral activando a los receptores de progesterona. Nuestro objetivo es estudiar la expresión de FGFR y sus isoformas en un tumor respondedor (C4-HI), en la variante con resistencia adquirida (C4-HIR) y en un tumor con resistencia constitutiva (C4-2-HI). Por western blot e inmunohistoquímica observamos una disminución en la expresión de FGFR2 en C4-2-HI ($p < 0,001$) y en C4-HIR ($p < 0,01$) respecto a C4-HI. Por RT-PCR se detectó la expresión de mRNA de la isoforma mesenquimal de FGFR2 en extractos de células epiteliales obtenidos a partir de cultivos primarios. Por otra parte, observamos un aumento en la expresión del FGFR1 por western blot ($p < 0,05$) e inmunohistoquímica en los tumores resistentes. Estos últimos resultados se reprodujeron en otra familia de tumores sensibles y resistentes (59-2-HI y 59-HI). Estos datos sugieren que existe una correlación inversa entre la expresión de FGFR-1 y -2, asociando la expresión del primero con un fenotipo más agresivo. Estos resultados junto con otros servirán para comprender el papel de la vía de FGFR en la resistencia endócrina y apoyan el uso de inhibidores de FGFR junto con la terapia hormonal para demorar la resistencia endócrina.

106. (179) COOPERACION ESPECÍFICA ENTRE MIEMBROS DE LA FAMILIA MAGE-A EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE RECEPTORES NUCLEARES

Laiseca, J.¹; Mazaira, G.¹; Ladelfa, M.¹; Toledo, M.¹; Galigniana, M.¹²; Monte, M.¹

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA¹ IBYME, CONICET²

Las proteínas de la subfamilia Mage-A (Melanoma Antigen Genes) poseen expresión específica tumoral y una alta homología de secuencia, característica por la cual se les consideraron funciones redundantes. Sin embargo, estudios recientes indican que la expresión de distintos genes Mage-A regulan la proliferación y la supervivencia de las células tumorales por distintas vías. El Receptor de Andrógenos (AR) media el crecimiento estimulado por hormonas y contribuye al desarrollo del cáncer de próstata. MageA11 es un corregulador selectivo de AR que aumenta su actividad transcripcional (Wilson EM. et al. 2009). Esto no ocurre con otros miembros de la familia MAGE estudiados. Se ha demostrado que el Receptor de Glucocorticoides (GR) cumple un papel fundamental como inhibidor de la proliferación celular en el cáncer de próstata. Su activación por glucocorticoides induce el arresto celular. Nosotros habíamos demostrado que MageA6 inhibe la actividad transcripcional de GR y MR pero no la de AR. En este trabajo mostramos que MageA6 potencia el efecto regulador de MageA11 sobre AR. El mecanismo involucra el aumento de la estabilidad de MageA11 en presencia de MageA6. Además, la co-expresión con MageA6 reduce la ubiquitinación de MageA11, lo que podría retardar su degradación. MageA6 puede interactuar con MageA11 y esta interacción podría darse a través del dominio MHD (Mage Homology Domain), zona altamente conservada en esta familia. Sin embargo, la estabilidad de MageA11 se observa específicamente por sobreexpresión de MageA6 y no otros miembros Mage-A. Su unión podría enmascarar sitios de ubiquitinación, retardando así la degradación de MageA11. De esta manera, describimos por primera vez la interacción y cooperación entre dos proteínas Mage-A que tendría una acción sinérgica a través de mecanismos destinados a dar ventajas en procesos asociados con el desarrollo tumoral.

107. (407) COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTATICO HUMANO Y SU RELACION CON EL CANCER DE PROSTATA EN PACIENTES ARGENTINOS

Careaga, V.¹³; Sacca, P.¹; Mazza, O.²; Scorticatti, C.²; Maier, M.³; Calvo, J.¹⁴

IBYME¹ Htal de Clínicas "José de San Martín" – Cát. Urología – Fac. Medicina - UBA² UMYMFOR-Dto. Química Orgánica, FCEyN-UBA³ Dto. Química Biológica, FCEyN-UBA⁴

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte por cáncer, entre los hombres, en la Argentina. Estilo de vida y dieta son factores de riesgo asociados al CaP. Interesa conocer qué moléculas median la interacción entre tejido adiposo y cáncer. La lipídómica es un campo de investigación que podría contribuir al descubrimiento de nuevos marcadores. Según nuestro conocimiento este es el primer estudio del perfil de ácidos grasos (AG) en tejido adiposo periprostatico (TAPP). El objetivo fue analizar la composición de AG del TAPP de pacientes con hiperplasia benigna (B-TAPP) o con CaP (T-TAPP). Para este análisis se utilizó cromatografía gaseosa. Se correlacionó con el índice de masa corporal (IMC) y se intentó determinar si la dieta tiene influencia sobre esta enfermedad. Resultados: Los AG mayoritarios (alrededor del 80% del total de AG presentes) fueron Oleico (18:1 n-9c), Palmítico (16:0), Linoleico (18:2 n-6) y Esteárico (18:0). El % de ácido 16:0 fue mayor en el T-TAPP que en el B-TAPP ($p = 0,04$); el % de este ácido también fue mayor en el T-TAPP respecto a B-TAPP en pacientes con sobrepeso y obesos ($p = 0,03$). Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), específicamente el ácido araquidónico (20:4 ω -6, AA), el % de este ácido fue mayor en el B-TAPP que en el T-TAPP ($p = 0,004$). La disminución de AA en tejido de CaP puede estar relacionada con la transformación de este ácido a PGE2, LTB4, TXA2 y el ácido 12-HETE que se asocian positivamente con la carcinogénesis. Se analizaron las relaciones entre los ácidos 18:0/16:0, 20:4/20:3, 20:3/18:2 y 18:1/18:0 a fin de inferir la actividad de las enzimas elongasas y desaturasas que también regulan los niveles de eicosanoides proinflamatorios y anti-inflamatorios derivados de PUFAs. Conclusión: La mayor proporción de 16:0 y la disminución de 20:4 en TAPP de pacientes con CaP podrían relacionarse con el ambiente tumoral y posiblemente con la dieta. Este trabajo ha sido aprobado por el Comité de Ética del IBYME.

108. (304) REMODELACIÓN ÓSEA EN LA METÁSTASIS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA: ROL DE HEMO OXIGENASA-1

Ferrando, M.¹; Meiss, R.²; De Siervi, A.¹; Navone, N.³; Vázquez, E.¹

Depto de Química Biológica, FCEN, UBA - IQUIBICEN

CONICET¹ Academia Nacional de Medicina² GU Medical

Oncology, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA³

El perfil de diseminación metastásico del cáncer de próstata (PCa) muestra tendencia a desarrollarse en el hueso como principal sitio de progresión. Previamente 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 general de este trabajo es estudiar el impacto de la modulación de HO-1 en células de PCa sobre los osteoblastos (células responsables de la formación de hueso) *in vitro* y sobre la remodelación ósea *in vivo*. Se utilizó un sistema de co-cultivo de células prostáticas tumorales humanas PC3 con osteoblastos primarios de ratón (PMO). Cuando las células PC3 pre-tratadas con hemina (inductor específico de HO-1; 80 μ M, 24h) fueron co-cultivadas con PMO no se observaron efectos sobre marcadores de diferenciación osteoblástica. Sin embargo, se produjo un aumento de estrés oxidativo y de la expresión de enzimas anti-oxidantes. Se demostró menor incorporación de H³-T en los PMO co-cultivados con PC3, pero dicho efecto se revertía si las células tumorales eran pre-tratadas con hemina. En este trabajo demostramos mediante citometría de flujo un aumento significativo en la fase G2/M de los PMO por efecto del co-cultivo con células pre-tratadas con hemina y también inducción de ciclinas y disminución de p21. Mediante ensayo de genes reporteros, se observó la activación de la vía de Foxo en los PMO en dicha condición, sugiriendo un posible mecanismo para el aumento de la proliferación. Por último, se realizó un ensayo *in vivo* donde se inyectaron células PC3HO-1 o su control en la cabeza del fémur de ratones SCID. Mediante rayos X e histología se observó un aumento en la remodelación ósea en los ratones inyectados con PC3HO-1. Todos estos resultados sugieren que la modulación de HO-1 en PCa participa en la remodelación ósea afectando la proliferación de los osteoblastos y no su diferenciación.

109. (630) ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL EFECTO RADIOSENSIBILIZADOR DE LIGANDOS DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO

Martinel, D.¹; Ciraolo, P.¹; Ventura, C.¹; Rivera, E.¹; Medina, V.^{1,2}

Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA¹ CONICET²

Reportamos que la histamina es capaz de proteger tejidos radiosensibles frente al daño producido por la radiación ionizante (RI) y demostramos que aumenta la radiosensibilidad de las células de cáncer mamario humano MDA-MB-231 y MCF-7, incrementando la apoptosis y senescencia celular. El objetivo de este trabajo fue investigar los mecanismos involucrados en el efecto radiosensibilizador de la histamina. Para ello, la irradiación se efectuó con dosis de 2 Gy (¹³⁷Cs). Las células se trataron 24 h antes de la irradiación y se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa mediante ensayos espectrofotométricos 6 h post-irradiación. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se evaluaron por citometría de flujo y la expresión de lipocalina-2 por western blot. Marcadores del daño al ADN (γ H2AX y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 8-OHdG) se determinaron por inmunocitoquímica. Los resultados demuestran que la histamina a través receptor a histamina H1 (RH1) radiosensibiliza a las células MDA-MB-231 aumentando los ROS (181% vs. 95%, P<0.001) debido esencialmente a la reducción de la actividad de CAT en células irradiadas (61% vs. 108%, P<0.001), efecto asociado a un aumento de lipocalina-2, un biomarcador de estrés oxidativo. La RI aumentó el número de rupturas de doble cadena de ADN, evidenciado a través de la fosforilación de la histona H2AX que no fue modificado por los tratamientos 1 h post-irradiación. La histamina a través del RH1 incrementó el daño oxidativo inducido por la RI (% de células 8-OHdG positivas: 42.5±3.6 vs. 26.1±6.7, P<0.01). Estos efectos no se observaron en las células MCF-7. Podemos concluir que el tratamiento con histamina a través del RH1 aumenta la radiosensibilidad de las células de carcinoma mamario MDA-MB-231, intensificando el estrés oxidativo y el daño al ADN producido por la RI y de esta manera podría mejorar la eficacia de la RI como modalidad terapéutica para esta enfermedad.

110. (734) ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL TRASTUZUMAB EN UN MODELO TRIDIMENSIONAL DE ADENOCARCINOMA MAMARIO HUMANO HER2+

Rodríguez, C.²; Reidel, S.²; Moverer, L.²; Marino, L.³; Bal De Kier Joffé, E.²; Jasnis, M.²; Fiszman, G.²

Instituto de Oncología A. H. Roffo¹ Área Investigación. Instituto de Oncología A. H. Roffo, UBA² Depto Patología. Instituto de Oncología A. H. Roffo, UBA³

Los esferoides tumorales (ET) son un modelo de crecimiento celular en 3D que mimetiza la estructura del tumor avascular *in vivo*. Previamente demostramos que durante el crecimiento de ET de células de adenocarcinoma mamario humano HER2+ (línea BT474), se generan subpoblaciones con diferente grado de proliferación. El objetivo de este trabajo es estudiar la respuesta de las diferentes subpoblaciones que constituyen el ET al anticuerpo anti-HER2 Trastuzumab (Tz). Se estudió el ciclo celular de los ET a 7, 14 y 21 días de crecimiento (citometría de flujo con Ioduro de Propidio, IP) y se detectó un aumento significativo en el tiempo en G2/M (6,6%, 10,3% y 13,3% respectivamente). El Tz (50ug/ml por 21 días) indujo un arresto de células en G1 respecto al control con IgG humana comercial (80,8% vs 64,7%) y una disminución de células en G2/M (7,4% vs 11,4%). El Tz (50, 10 y 1 ug/ml) inhibió el crecimiento de ET en 38%, 21% y 13% respectivamente. Cuando el tratamiento se interrumpió al día 10, los ET recuperaron su cinética de crecimiento (p<0,05). Se observó una correlación entre citotoxicidad y producción de óxido nítrico, medida por Griess. Observamos que los ET tratados con Tz mostraron una población uniforme no apoptótica (medida por Anexina V, IP y Caspasa 3 clivada) con expresión de HIF1a y p27 citoplasmáticos y una disminución de pHER2 sin detectar

cambios en la expresión de HER2 total. En los ET control, las células periféricas mostraron expresión de HIF1a y p27 citoplasmáticos, mientras que en las células de la capa intermedia la localización fue nuclear con presencia de células apoptóticas. El Tz ejerció un potente efecto inhibitorio dosis dependiente sobre el crecimiento de células BT474 en 3D, mediado en parte por la inhibición de pHER2. El núcleo hipóxico y la subpoblación apoptótica se redujeron completamente en los esferoides tratados con Tz, quedando un esferoide de menor tamaño compuesto sólo de células proliferantes.

111. (811) SPARC PROMUEVE EL CRECIMIENTO TUMORAL Y DISEMINACIÓN METASTÁSICA EN CÁNCER DE MAMA MEDIANTE LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Güttlein, L.¹; Benedetti, L.¹; Salvatierra, E.¹; Fresno, C.²; Fernández, E.²; Mansilla, S.¹; Gottifredi, V.¹; Llera, A.¹; Podhajcer, O.¹

Fundación Instituto Leloir¹ Universidad Católica de Córdoba²

SPARC es una proteína matricelular que participa en procesos biológicos de remodelación de tejidos. Nuestro grupo y otros han demostrado que esta proteína se encuentra sobreexpresada en cánceres humanos. Estudios no publicados de nuestro grupo revelaron que el silenciamiento de la expresión de SPARC en células de cáncer de mama murino 4T1 mediante un siRNA específico, inhibe su proliferación *in vitro* así como también su crecimiento *in vivo* (p<0.001) y la aparición de metástasis en pulmón (p<0.001). Con el objetivo de identificar los principales procesos responsables del fenotipo observado se realizaron análisis transcriptómicos tanto de las células crecidas *in vitro*, como del tumor primario y los focos metastásicos. El análisis ontológico resultante indicó que SPARC modula genes involucrados en la proliferación celular y la respuesta inmune adaptativa. Nuestro primer objetivo fue investigar si SPARC podía modular el ciclo celular mediante citometría de marcación con IP. Demostramos que el bloqueo de su expresión induce un arresto en la transición G1/S, dado que el porcentaje de células en fase S es menor para la línea celular con expresión disminuida de SPARC (4T1 C18) respecto su control 4T1 SCR (30% y 45% respectivamente). Esto fue confirmado por BrdU. Asimismo analizamos si SPARC favorece la metástasis *in vivo* mediante la modulación de la respuesta inmunológica adaptativa, evaluando el efecto de la inhibición de SPARC sobre la composición del infiltrado leucocitario en un modelo alógeno de crecimiento tumoral *in vivo* (ratones Balb/c inmunocompetentes). Mediante citometría demostramos un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el tumor 4T1 C18 que en el control 4T1 SCR (0,61±0,17 y 0,10±0,03, respectivamente p<0.05). Nuestro trabajo sugiere que el efecto de SPARC sobre el ciclo celular así como sus propiedades inmunosupresoras contribuirían significativamente al crecimiento tumoral primario y al desarrollo de metástasis pulmonares en cáncer de mama.

INMUNOLOGÍA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS 2

112. (11) MADURACIÓN Y DIFERENCIACIÓN TH1 DE TIMOCITOS CD4 Y CD8 SIMPLE POSITIVOS (SP) EN SITUACIONES INFLAMATORIAS/INFECCIOSAS

Baez, N.¹; Reynolds, D.²; Young, H.²; Rodríguez Galán, M.¹ Dpto. Bioquímica Clínica Fac. de Cs Químicas UNC¹ Laboratory of Experimental Immunology. National Cancer Institute. NIH. USA.²

Durante el proceso de maduración de células T en el timo, los timocitos actúan generalmente en forma refractaria a los mediadores sistémicos que pueden producirse en distintos procesos patológicos. Sin embargo, hemos demostrado previamente que la exposición *in vitro* de timocitos de animales normales a IL-12 + IL-18, indujo la expresión de marcadores asociados a un perfil de tipo Th1 (aumento de CCR5 e IFN γ) en células CD4 y CD8 SP. Con la intención de estudiar si estos cambios ocurren

in vivo en un modelo murino donde haya producción sistémica de IL-12 e IL-18, evaluamos cambios fenotípicos y funcionales en timocitos de animales expuestos a la infección por *T. cruzi* o a inyecciones sub-letales con LPS. En el día del onset, observamos que las células SP incrementan la expresión de la molécula QA2 y disminuyen la expresión de CD24 asimilándose al fenotipo de una célula T madura presente en órganos linfáticos secundarios (control vs tratados, $p < 0,05$). Otro cambio fenotípico fue el incremento en la expresión del receptor de quemoquina CCR5, asociado a un perfil Th1 (control vs tratados, $p < 0,05$). La expresión de citoquinas Th1 como IFN γ y TNF α en sobrenadantes de timocitos estimulados *in vitro* con anti-CD3, fue significativamente mayor en animales infectados con *T. cruzi* respecto a controles ($p < 0,05$). Nuestros resultados también demuestran que gran parte de la expresión de CCR5 como de IFN γ y TNF α es debida a células T maduras que migran de periferia al timo durante la infección, sin embargo, los timocitos residentes SP también producen ciertos niveles de estas citoquinas (no estimulados vs anti-CD3, $p < 0,05$). Estos resultados demuestran que mediadores inflamatorios liberados durante procesos infecciosos tendrían la capacidad de alterar el fenotipo y función de las células CD4 y CD8 SP tímicas durante su período de maduración en el timo posiblemente condicionando su comportamiento posterior como célula T madura en órganos linfáticos periféricos.

113. (23) TELITROMICINA DISMINUYE LA SECRECIÓN DE ESPD EN E.COLI O157:H7, DISMINUYENDO LA ADHERENCIA A CACO-2 E INHIBIENDO LA FORMACIÓN DE LESIONES A/E

Fernández-Brando, R.¹, Yamaguchi, N.², Tahoun, A.², Mca-teer, S.², Palermo, M.¹, Gally, D.²

Academia Nacional de Medicina¹ Division of Immunity and Infection, The Roslin Institute, The University of Edinburgh² Instituto de Medicina Experimental, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina³

El Síndrome Uremico Hemolítico (SUH) es una complicación en infecciones con *E. coli* productor de toxina Shiga (Stx) (STEC). STEC tiene que colonizar el intestino para desarrollar la infección, con la formación de las lesiones características A/E en la zona de adhesión bacteriana. La formación de estas lesiones requiere del aparato de secreción de tipo 3 (T3S), compuesto por EspA, D y B entre otras, y de proteínas efectoras. Diversos antibióticos activan el sistema SOS bacteriano, induciendo la producción de Stx, por lo que están contraindicados para el tratamiento de estas infecciones. Previamente realizamos una búsqueda entre compuestos bioactivos que impacten en la expresión del primer operón que codifica el T3S (LEE1), y detectamos que la Telitromicina (Teli) reduce la expresión de LEE1 pero no la expresión de un gen ribosomal control. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de Teli en el T3S en una cepa *E. coli* O157:H7 Stx- (ZAP 198). Demostramos que Teli reduce los niveles de secreción de T3S en dosis que no afectan el crecimiento bacteriano, evaluado por SDS-PAGE y Western blotting. Además, ZAP 198 muestra una adherencia a Caco-2 significativamente reducida en la presencia de Teli 1.85 μ M, evaluado por cultivos bacterianos [(UFC media \pm ESM) $\times 10^5$]: Control: $6,8 \pm 1,0$ Teli: $1,7 \pm 0,2$; $p < 0,01$, t-test; y recuento por microscopía de fluorescencia [media bacteria/núcleo \pm ESM, n]: Control: $7,20 \pm 0,50$, 110, Teli: $0,13 \pm 0,03$, 104; $p < 0,0001$, t-test. Por otra parte, no se detectaron lesiones A/E en presencia de Teli, evaluado por microscopía confocal. Además, Teli no induce el sistema SOS evaluado por un plásmido reportero suLA::gfp, descartando la inducción de Stx. En conclusión, Teli reduce la secreción de T3S, e inhibe la adhesión bacteriana a cultivos celulares y la formación de lesiones A/E, representando potencialmente una opción terapéutica en infecciones con STEC. Otros compuestos relacionados están siendo investigados actualmente.

114. (74) REGULACIÓN DE LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN DE IL-1 β POR LA PROTEÍNA A DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Giai, C., Gómez, M.

Instituto de Microbiología y Parasitología Médica

Staphylococcus aureus es un patógeno asociado a diversos tipos de infecciones con alta morbi-mortalidad. Entre las citoquinas pro-inflamatorias inducidas por *S. aureus*, se ha propuesto que la IL-1 β tendría un rol crítico en la eliminación del microorganismo. IL-1 β es un potente pirógeno cuya acción se encuentra finamente regulada por múltiples vías tales como la producción de receptor antagonista (Ra) y el shedding del receptor de tipo II (IL-1RII). El objetivo de este estudio fue determinar el rol de proteína A (SpA) de *S. aureus* en la inducción de IL-1 β y sus reguladores en células inmunes. Células THP-1 fueron estimuladas con SpA purificada, *S. aureus*, una mutante que no expresa SpA (*spa*-) o *Lactococcus lactis* expresando SpA. Se demostró que SpA induce la producción de IL-1 β la cual resultó NALP3 independiente. Al comparar la respuesta inducida por la cepa *spa*- en comparación con *S. aureus* se determinó que la expresión de SpA contribuye pero no resulta indispensable para la producción de IL-1 β . Al evaluar la inducción de mecanismos reguladores de la señalización de IL-1 β se determinó que *S. aureus* induce la transcripción de Ra e IL-1RII a las 2 horas luego de la estimulación. Asimismo, se observó un aumento significativo en el shedding de IL-1RII ($p < 0,05$). La liberación del dominio extracelular de IL-1RII fue dependiente de la expresión de SpA como se demostró utilizando la mutante *spa*- (250 pg/ml con *S. aureus* versus 120 pg/ml con *spa*-, $p < 0,05$). El shedding de IL-1RII que se evidenció tan pronto como 15 min luego de la estimulación con *S. aureus* ($p < 0,05$) precedió en el tiempo a la producción de IL-1 β , la cual fue significativa a las 2 horas luego de la estimulación ($p < 0,01$). Los resultados obtenidos destacan la capacidad de *S. aureus* de modular mecanismos fisiológicos de control de la acción de IL-1 β para evadir la respuesta inmune del hospedador.

115. (163) BRUCELLA ABORTUS AFECTA EL TRÁNSITO A MEMBRANA DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I EN MACRÓFAGOS, RETENIÉNDOLAS EN APARATO DE GOLGI

Barrionuevo, P.¹, Delpino, V.¹, Velásquez, L.¹, Pozner, R.², Cassataro, J.¹, Giambartolomei, G.¹

INIGEM Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (CONICET/UBA). Laboratorio de Inmunogenética¹ IMEX Instituto de Medicina Experimental (CONICET/Academia Nacional de Medicina).²

Brucella abortus induce la activación de linfocitos T citotóxicos (LTC), sin embargo es capaz de establecer una infección crónica. Recientemente demostramos que *B. abortus* inhibe la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) en superficie de macrófagos humanos y este fenómeno correlaciona con una disminuida función citotóxica de los LTC. La disminución de MHC-I en superficie se debe a la retención intracelular de dicha molécula, aunque no hay co-localización entre *B. abortus* y MHC-I. En este trabajo investigamos la localización subcelular tanto de MHC-I como de *B. abortus*. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* en presencia de IFN- γ y luego la localización MHC-I en los distintos compartimentos celulares se determinó por microscopía confocal (MC). En células infectadas con *B. abortus* las moléculas MHC-I fueron retenidas predominantemente en aparato de Golgi (GM130) ($93 \pm 2\%$, $p < 0,001$). No fue detectada co-localización con endosomas tempranos (EEA1), lisosomas (LAMP-2) ni con retículo endoplasmático (calnexina). Por otro lado, THP-1 fueron infectadas con *B. abortus*-GFP en presencia de IFN- γ y luego se determinó la localización subcelular de la bacteria por MC. Nuestros resultados demuestran que *B. abortus* se encuentra en grandes vacuolas positivas para LAMP-2, pero negativas para EEA1, GM130 y calnexina. Por último, investigamos el mecanismo involucrado en la retención MHC-I en Golgi e hipotetizamos que *B. abortus* modifica el tránsito MHC-I por inhibir la acidificación de dicho compartimento. El tratamiento de THP-1 con el inóforo monensina, no sólo disminuyó la expresión en superficie ($p < 0,05$), sino también produjo la retención MHC-I en Golgi, mimetizando la infección por *B. abortus*. En conjunto, estos resultados describen un nuevo mecanismo basado en la retención MHC-I en aparato de Golgi mediante el cual *B. abortus*

puede inhibir la respuesta de los LTC₄, evadiendo la vigilancia inmunológica.

116. (388) YERSINIA ENTEROCOLITICA DEFICIENTE EN YOPH INDUCE CÉLULAS PRODUCTORAS DE IL-17

Dave, M., Díaz, S., Eliçabe, J., Cargnelutti, E., Di Genaro, S.

IMIBIO-CONICET-San Luis

Yersinia enterocolitica (Ye) es una bacteria enteropatógena. YopH es un factor de virulencia que cumple un rol central en la evasión de la respuesta inmune. En trabajos previos demostramos que una cepa de Ye deficiente en YopH (Ye Δ yopH) está atenuada. Así, recuentos bacterianos en órganos fueron significativamente menores ($p < 0,02$) comparados con la cepa wild-type (Ye WA-314). Sin embargo, los mecanismos inmunes involucrados en el control de esta cepa no han sido dilucidados. En el presente trabajo estudiamos por citometría de flujo (CF) en esplenocitos de ratones infectados el perfil de citoquinas involucradas, y en hígado, la expresión de los factores de transcripción T-bet y ROR-gt que caracterizan las respuesta Th1 y Th17, respectivamente. Ratones C57BL/6 hembras se infectaron por vía intragástrica con Ye WA-314 o Ye Δ yopH ($1 \cdot 5 \times 10^8$ ufc). Luego de 5 días, se extrajeron asepticamente bazo e hígado. Esplenocitos fueron re-estimulados durante 18 hs con *Yersinia* muerta por calor y analizados por CF. Por RT-PCR se analizó en hígado la expresión de T-bet y RORgt. Se observó que la infección con Ye WA-314 induce mayor frecuencia (F) de células productoras de IFN-g que la infección con Ye Δ yopH o comparada con ratones no infectados (controles) ($p < 0,05$). En contraste, la infección con Ye Δ yopH indujo mayor F de células productoras de IL-17, que presentaron mayor intensidad de fluorescencia media (MIF) comparadas con células de ratones infectados con Ye WA-314 o de ratones controles ($p < 0,05$). Por RT-PCR se observó expresión de T-bet y ausencia de expresión de ROR-gt en hígado de ratones infectados con Ye WA-314, en contraste a Ye Δ yopH que indujo expresión de ambos factores de transcripción. De los resultados se concluye que Ye Δ yopH induce un perfil de células productoras de IL-17 que podría cumplir un rol crucial en el control de la infección con esta cepa atenuada.

ENDOCRINOLOGÍA 1

117. (65) IMPACTO DE LA ENFERMEDAD RENAL SOBRE LA FUNCIÓN ADRENAL EN PACIENTES ASISTIDOS EN UN HOSPITAL UNIVERSITARIO. APLICACIÓN DE UN ALGORITMO INICIAL NO INVASIVO.

Arregger, A.¹, Cardoso, E.^{2,3}, Tumilasci, G.³, Zucchini, A.¹, Sanchez, R.¹, Contreras, L.^{1,2,3}

Endocrinología Experimental, IDIM A Lanari, UBA¹ IDIM CONICET² Fisiología, Facultad de Odontología, UBA³

La disfunción corticoadrenal ha sido escasamente investigada en la enfermedad renal crónica (IRC). En este trabajo se estudió la dinámica secretoria de cortisol y la reproducibilidad (ICC= coeficiente de correlación intraclase) del cortisol salival horario en IRC. Fueron evaluados 53 adultos ambulatorios clasificados en estadios clínicos (S) según el filtrado glomerular (FG): S₁ (n=14), S₂ (n=14), S₃ (n=9), S₄ (n=8) y S₅ (n=8). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital y todos los participantes dieron su consentimiento por escrito. El algoritmo de estudio se inició con la obtención de saliva a las 8,0 y 23,0 hs para cortisol por RIA (SAF₈ y SAF₂₃, respectivamente) en 2 días no consecutivos. A partir de los valores obtenidos, se aplicaron los siguientes criterios: a) SAF₈ \leq 3,0 nM : evaluación de la respuesta de cortisol salival al estímulo con baja dosis de ACTH sintética (25,0 μ g ACTH im); b) SAF₈ > 3,0 nM , supresión de cortisol en suero (F_{dex}) y saliva (SAF_{dex}) con 1mg de dexametasona oral nocturna. Resultados: FG se correlacionó negativa y significativamente con: edad (r= -0,328), SAF₂₃ (r= -0,25), F_{dex} (r= -0,441) y SAF_{dex} (r= 0,573); p \leq 0,03. El ICC de SAF₈ y SAF₂₃ fue \geq 0,70. El 11% de IRC mostró ausencia de

variación circadiana de cortisol (el 66% de los casos correspondió a S₅). SAF₂₃ en S₄ (2,0 \pm 1,35 nM) y S₅ (4,55 \pm 3,13 nM) fue significativamente mayor (p \leq 0,05) que en S₁ (1,28 \pm 0,88 nM). Según criterio a) se diagnosticó insuficiencia adrenal (IA) en 2 pacientes en S₅. Según criterio b) no hubo supresión adecuada en S₂ (n=2), S₃ (n=1), S₄ (n=2) y S₅ (n=3). Conclusión: se demostró IA subclínica en pacientes en terapia de reemplazo renal. La disminución severa del FG (< 30 ml/ min/ 1.73m²) se asoció a pérdida de la variación circadiana y deterioro del mecanismo de retroalimentación negativa de cortisol. 1. Am J Kidney Dis. 2002; 39 (2 Suppl 1):S1-266.

118. (94) EFECTO DEL INGAP-PP SOBRE LA FUNCIÓN SECRETORA INSULAR Y SU PARTICIPACIÓN EN LA CASCADA DE PI3K

Maiztegui, B. , Romn, C. , Borelli, M. , Gagliardino, J.

CENEXA Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada UNLP-CONICET, La Plata

El INGAP-PP aumenta la secreción de insulina (SI) y la masa de células B pero se desconoce el mecanismo por el cual lo hace.

Objetivo: Estudiar el efecto del INGAP-PP sobre el metabolismo de glucosa (G), la actividad y expresión proteica de glucoquinasa (GQ), en islotes de ratas cultivadas y verificar la participación de la vía PI3-K/AKT en dicho efecto. **Métodos:** se aislaron islotes de ratas Wistar normales (colagenasa) y se cultivaron 4 días en RPMI con 2 g/L NaHCO₃, 5% SFB, 1% penicilina/estreptomycin y 10 mM G, con o sin INGAP-PP (10 μ g/ml). Los islotes se preincubaron con G 3,3 mM a 37°C 45 min y luego con diferentes concentraciones de G para medir SI, metabolismo de G (producción de ¹⁴CO₂), actividad (producción de G-6-P) y expresión proteica (Western Blot [WB]) de GQ en homogenado y en fracciones subcelulares, expresión proteica (WB) del receptor de insulina (IR), de PI3K total y asociación PI3K/IRS-1 (IP y WB). Asimismo, se estudió el efecto de Wortmanina (W), inhibidor de la PI3K (150 y 300 nM), sobre la SI. **Resultados:** C vs. INGAP-PP (* p < 0,05): SI (ng/ islote/h): 3,3 mM G: 0,3 \pm 0,03 vs. 0,3 \pm 0,07; 8,3 mM G: 1,5 \pm 0,2 vs. 2,6 \pm 0,3*; 16,7 mM G: 2,9 \pm 0,2 vs. 4,7 \pm 0,4*. Oxidación de G: ¹⁴CO₂ (pmol/ islote/ 120 min): 3,3 mM G: 0,3 \pm 0,04 vs. 0,5 \pm 0,07; 8,3 mM G: 0,4 \pm 0,06 vs. 0,7 \pm 0,1*; 16,7 mM G: 0,6 \pm 0,1 vs. 1,4 \pm 0,1*. Actividad GQ (pmol/islote/h): 2,4 \pm 0,6 vs. 4,8 \pm 0,2*. Expresión proteica GQ (%): Homogenado: 100 \pm 18 vs. 191 \pm 3*; Citosol: 100 \pm 16 vs. 97 \pm 7; Pellet: 100 \pm 13 vs. 95 \pm 7. Expresión proteica IR (%): 100 \pm 3 vs. 175 \pm 15*. Expresión proteica PI3K (%): 100 \pm 21 vs. 255 \pm 25*. PI3K/IRS-1 (%): 100 \pm 15 vs. 176 \pm 5*. Efecto de la W sobre la SI inducida por G (% de inhibición): 28 \pm 5 vs. 60 \pm 11* (150 nM W) y 64 \pm 6 vs. 81 \pm 6* (300 nM W). **Conclusiones:** El INGAP-PP aumenta la función secretora de las células B, incrementando el metabolismo de G y la expresión/actividad de la GQ, a través de la activación de la cascada PI3-K/AKT.

119. (212) BISFENOL A MODIFICA LA RESPUESTA DEL EJE REPRODUCTOR EN RATAS MACHO ANTE UN EVENTO INFLAMATORIO

Lavalle, J.¹, Cardoso, N.¹, Gamez, J.¹, Penalba, R.¹, Carbone, S.¹, Ponzo, O.¹, Scacchi, P.², Reynoso, R.¹

Laboratorio de Endocrinología. Facultad de Medicina. UBA¹ Facultad de Cs. Médicas. Universidad Católica Argentina²

La respuesta del organismo a una toxina puede modificarse si este ha sido expuesto a agentes que lo sensibilizaron. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del BPA sobre los mecanismos neuroinmunoendocrinos que regulan el eje reproductor y su respuesta durante la inflamación en ratas macho adultos expuestos a BPA durante la gestación y lactancia. Se administró BPA en el agua de bebida (DAE=0,125 mg/kg/día) a la rata madre y etanol al 0.1% (control). Los grupos (n=10/grupo) fueron: 1) control, 2) animales tratados con LPS, 3) animales tratados con BPA, 4) animales tratados con BPA+LPS. LPS (250 μ g/kg) fue administrado vía IP 5 horas antes del sacrificio. Se determinó liberación de Gn-RH, IL-1 β , producción de nitritos por fragmentos de hipotálamo

medio basal (RIA pg/HMB, ELISA; ng/HMB, método de Griess μ moles/l) y niveles séricos de LH, FSH y testosterona (RIA: ng/ml, nmoles/ml). Resultados: Gn-RH:1) 5.3 ± 0.7 , 2) 3.1 ± 0.6 , 3) 3.5 ± 0.9 , 4) 2.5 ± 0.2 ; Nitritos:1) 30 ± 0.2 , 2) 75 ± 1.4 , 3) 26 ± 2.7 , 4) 18 ± 0.2 ; IL-1 β : las diferencias no fueron significativas. LH:1) 85 ± 4 , 2) 37 ± 5 , 3) 28 ± 4 , 4) 14 ± 2 ; FSH: 1) 65 ± 13 , 2) 35 ± 3 , 3) 23 ± 3 , 4) 16 ± 1.1 ; Testosterona: 1) 2.2 ± 0.2 , 2) 0.6 ± 0.2 , 3) 1.0 ± 0.3 , 4) 0.4 ± 0.1 . BPA+LPS produjo disminución significativa ($p < 0.001$) de la liberación de Gn-RH en relación al grupo control y a los tratados con BPA o con LPS. LH y FSH disminuyeron con LPS ($p < 0.001$, $p < 0.01$) y con BPA ($p < 0.001$, $p < 0.001$); el tratamiento conjunto con LPS y BPA disminuyó aún más sus niveles ($p < 0.01$, $p < 0.05$). Testosterona disminuyó significativamente con LPS ($p < 0.01$) y con el tratamiento con BPA ($p < 0.01$), efecto no modificado por el tratamiento conjunto. El tratamiento con BPA no modificó la producción de nitritos, mientras LPS la aumentó ($p < 0.001$) y el tratamiento conjunto la disminuyó significativamente ($p < 0.001$). Conclusión: La exposición a BPA podría afectar los mecanismos de regulación del eje reproductor modificando así su respuesta ante un evento inflamatorio.

120. (246) ROL DE LOS ANDRÓGENOS EN EL DESARROLLO PREPUBERAL DE LA RATA HEMBRA

Ongaro Gambino, L.¹, Rulli, S.², Giovambattista, A.¹, Calandra, R.², Spinedi, E.¹

Unidad de Neuroendocrinología. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular¹ Laboratorio de Esteroides. Instituto de Biología y Medicina Experimental²

La programación endócrino-metabólica del individuo ocurre durante etapas tempranas de la vida. Los niveles fisiológicos de andrógenos en la rata están involucrados en la función ovárica y la apertura vaginal (AV) asociada a la pubertad. Previamente demostramos en la rata hembra adulta, que el exceso de andrógeno neonatal induce una precoz AV, un incremento del peso corporal (PC), hiperleptinemia e insulinoresistencia. El objetivo del presente trabajo fue analizar el impacto del bloqueo temprano de la función androgénica sobre el desarrollo de la rata hembra, estudiada a los 30 días de edad. A ratas Sprague-Dawley de 5 días de edad se les administró (s.c.) 1,75 mg de flutamida (antagonista específico del receptor de andrógenos, RA) disuelto en aceite de maíz (F) o vehículo solamente (C). Entre los días 21 y 30 de edad se registró el PC y consumo de alimento. Luego del sacrificio, se almacenó el suero [determinación de corticosterona (B), glucosa (Glu), insulina (Ins), leptina (Lep), 5- α -androstanoediol (5 α Diol) y estradiol (E₂)] y, se diseccionaron los tejidos ovárico (TOV; análisis de la expresión de ARNm de P450osc, P450c17 y aromatasas) y adiposo parametrial (TAP; cuantificación de su masa). Los animales F presentaron una disminución ($p < 0,05$) en el PC y en el consumo de alimento, sin diferencias en la masa de TAP. Los niveles séricos de Ins fueron menores en F ($p < 0,05$ vs. C) y, no se hallaron diferencias en los de B, Glu y Lep; contrariamente, aquellos de 5 α Diol y E₂ fueron mayores ($p < 0,05$ vs. C). Finalmente, no se detectaron diferencias en el análisis de las expresiones (ARNms) de las enzimas evaluadas en TOV. Nuestros resultados sugieren que el bloqueo temprano del RA indujo hipofagia, retardo en la ganancia de PC y disfunción metabolo-reproductiva. Este estudio resalta la importancia de la interacción entre el medio endógeno androgénico neonatal y la programación endócrino-metabólica en la rata hembra. (PIPs 2009-0704 y -0183)

121. (294) CARACTERIZACIÓN DE DOS MUTACIONES (R313H Y S303R) EN EL GEN NR5A1 (SF1) EN DOS PACIENTES CON DESORDENES DEL DESARROLLO SEXUAL (DSD) FAMILIAR 46,XY.

Pérez Garrido, N., Saraco, N., Marino, R., Ramírez, P., Ciaccio, M., Costanzo, M., Guercio, G., Warman, D., De Dona, V., Rivarola, M., Belgorosky, A.
Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan

El Factor Esteroidogénico 1 (SF1/NR5A1) juega un rol clave en la regulación del desarrollo reproductivo y adrenal. En humanos, las mutaciones en el gen NR5A1 se asocian a un amplio

espectro fenotípico. Evaluamos dos pacientes con DSD 46 XY familiar. Ambos presentaban hipospadias severa al nacer, niveles séricos elevados de FSH, bajos niveles de AMH, buena respuesta esteroidogénica al estímulo con hCG y evidencia de estructuras müllerianas. El estudio molecular del gen NR5A1 detectó una mutación c.938G>A (R313H) en la primer familia y una mutación no descrita, c.909G>A (S303R) en la segunda familia. Ambas mutaciones están localizadas en la hélice 5, altamente conservada, del dominio de unión al ligando de la proteína. Los análisis *in silico* (SIFT; Polyphen) indican que ambos cambios aminoácidos afectarían la función de la proteína. El objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar funcionalmente las dos mutaciones (R313H Y S303R) en el gen NR5A1. Se construyeron vectores de expresión con el cDNA del SF1 humano (WT) en el vector pcDNA3. Por mutagenesis dirigida se obtuvieron las construcciones con el cDNA del SF1 humano con cada mutación en estudio. Se co-transfectaron en la línea celular Y1 cada una de las construcciones (WT o mutadas) y una conteniendo el gen de la luciferasa (vector PGL3) bajo regulación del promotor de la h3 β HSDII, el cual tiene un sitio de respuesta al SF1. Se evaluó la respuesta al SF1 midiendo la actividad luciferasa con el sistema Dual Luciferasa (Promega), utilizando la Renilla luciferasa como control de transfección. Se observó un aumento significativo en la actividad luciferasa en presencia del SF1 WT comparada con pcDNA3 vacío (actividad basal) ($p < 0.05$). Las mutaciones R313H y S303R disminuyeron significativamente la actividad luciferasa comparada con el WT ($p < 0.05$). Estos resultados confirmarían que ambas mutaciones producen una disminución de la acción del SF1 y podrían explicar los fenotipos hallados en los pacientes.

122. (510) MASA ADRENAL CLÍNICAMENTE INAPARENTE: PREVALENCIA DE FEOCROMOCITOMA EN PACIENTES EVALUADOS ENTRE LOS AÑOS 2000-2011.

Terranova, N., Barontini, M., Levin, G.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CO-NICET

Se define como Incidentaloma Adrenal a una masa adrenal asintomática descubierta casualmente en estudios por imágenes, sin sospechar una enfermedad suprarrenal. El feocromocitoma es una causa frecuente de masas adrenales clínicamente inaparentes, numerosas publicaciones consideran entre 1.5 – 23% dicho hallazgo. El objetivo fue evaluar la prevalencia de feocromocitoma en pacientes con diagnóstico de IA derivados a nuestro laboratorio del CEDIE para confirmar o descartar dicha patología. Entre los años 2000 y 2011, estudiamos 618 pacientes con Incidentaloma Adrenal, 409 mujeres, mediana 58 años (rango 15-93 años) y 209 hombres, mediana 63 años (17-88 años). A todos se les determinó catecolaminas (CA), adrenalina y noradrenalina y ácido vainillinmandélico (AVM) urinarios. Las consultas fueron realizadas por distintos motivos no relacionados con feocromocitoma: dolor lumbar, control ginecológico, de próstata, gastritis, etc. La detección de la masa adrenal, derecha o izquierda, principalmente se realizó por ecografía y tomografía. Obtuvimos niveles de CA y/o AVM elevados en 35 pacientes. 15 de ellos no regresaron a consulta. En los 20 restantes, 12 mujeres, mediana 53 años (rango 32-79 años) y 8 hombres, mediana 59 años (rango 28-73 años), se pudo confirmar la presencia de feocromocitomas (3.2 %) por anatomía patológica. La sintomatología característica del feocromocitoma es la triada: hipertensión, cefalea y sudoración. Encontramos que 9/20 eran normotensos y 11/20 hipertensos; 16/20 no presentaron cefaleas ni sudoración y ambas se presentaron en 4/20. La triada la observamos en 2 pacientes, el motivo de consulta fue en un caso un control ginecológico y en el otro dolor lumbar. Presentaron 5 pacientes, diabetes tipo 2. En la población estudiada la prevalencia de feocromocitoma fue de al menos 3.2%, cifra que se encuentra dentro de los rangos publicados en la bibliografía internacional.

123. (378) VARIACIONES EN EL FUNCIONAMIENTO HIPOFISARIO EN LA VIZCACHA (LAGOSTOMUS MAXIMUS) DURANTE LA GESTACIÓN

Villarreal, F.¹, Inserra, P.^{1,2}, Di Giorgio, N.^{2,3}, Charif, S.¹, Lux-Lantos, V.^{2,3}, Vitullo, A.^{1,2}, Dorfman, V.^{1,2}

Universidad Maimonides¹ CONICET² IByME – CONICET, CABA, Argentina.³

La hipófisis constituye el punto de regulación del funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG). La vizcacha presenta características reproductivas únicas como poliovulación natural y pseudo-ovulación durante la gestación. Recientemente hemos descrito diferencias en la expresión de progesterona y su receptor, y de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo durante la gestación. El objetivo fue investigar el funcionamiento hipofisario durante la gestación focalizando el estudio del receptor de GnRH (R-GnRH) como posible regulador del eje. Se estudió la expresión de la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), y del R-GnRH, en suero e hipófisis de hembras adultas preñadas ovulando (PO) y sin ovular (PNO), y no preñadas ovulando (NPO) y sin ovular (NPNO), (n=5 / grupo). Mediante la técnica de RIA se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles séricos de LH en NPO vs NPNO (12 veces) y en PO vs PNO (3 veces). La expresión de LH determinada directamente en la hipófisis mediante Western Blot en las no preñadas se correlacionó con los niveles séricos, sin embargo, resultó casi nula durante la gestación. La expresión de FSH en hipófisis varió durante la preñez de acuerdo al estado de ovulación siendo nula en las PO. Además, la expresión del R-GnRH mostró una disminución significativa ($p < 0.05$) en PO vs PNO, sin variaciones significativas en las no preñadas. Mediante inmunohistoquímica se determinó la localización de LH y FSH, y de R-GnRH en citoplasma de células gonadotropas de la hipófisis anterior con variaciones significativas durante la gestación y ligadas al estado ovulatorio. Mediante inmunofluorescencia y análisis con microscopía confocal se determinó la co-localización de LH y FSH, con R-GnRH en el citoplasma de células gonadotropas. Estos resultados indican un activo funcionamiento de la hipófisis en la preñez, siendo el R-GnRH un factor clave en la regulación del eje. (PIP-CONICET 0225/2011).

124. (568) ALTERACIONES EN LA FUNCIONALIDAD UTERINA, ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTADO PRO-INFLAMATORIO, INDUCIDAS POR LA HIPERANDROGENIZACIÓN PRENATAL

Ferreira, S., Heber, F., Vlez, L., Motta, A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFYBO.

La etiología del Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) no se conoce pero la hipótesis actual propone que proviene de una reprogramación fetal debido a hiperandrogenismo (HA) intrauterino durante la gestación. Las mujeres con SOP tienen bajas tasas de implantación aún cuando la funcionalidad ovárica normal. **Objetivo:** establecer el estado oxidante/antioxidante (sistémico y local) e inflamatorio (síntesis de prostaglandina (PG) E) en la etapa prepupal (21 días) y puberal (60 días) en ratas HA prenatalmente. Ratas preñadas Sprague-Dawley se inyectaron con testosterona (HA) ó aceite (control: C) entre los días 16 a 19 de gestación, se utilizaron las crías hembras (N= 10 animales/grupo) que se sacrificaron a los 21 y 60 días de edad. HA indujo un ambiente intrauterino desfavorable que se compensó luego del nacimiento ya que la pendiente de crecimiento de HA fue mayor ($3,98 \pm 0,01$; $P < 0,05$) que la de C ($3,72 \pm 0,01$). En animales HA se observaron dos fenotipos de SOP: ovulatorio y anovulatorio. El estrés oxidativo lo evaluamos por cuantificación de peroxidación lipídica (LP) y concentración de glutatión total (GSH) como antioxidante. A nivel sistémico, la LP no varió ni a los 21 ni a los 60 días de edad mientras que el GSH disminuyó a los 21 días (C: $6,9 \pm 0,9$ vs HA: $4,9 \pm 0,6$ μM /mg proteína) y no varió a los 60 días. En cuanto al estrés del tejido uterino, LP a los 21 y 60 días no varió mientras que GSH a los 21 días aumentó (C: $0,0012 \pm 0,0002$; HA: $0,225 \pm 0,009$ μM /mg proteína; $P < 0,0001$) y a los 60 días no varió. En ratas de 60 días, en el grupo HA se induce un estado pro-inflamatorio caracterizado por aumento de PGE ($1,20 \pm 0,50$ pg/mg tejido) con respecto a C ($0,54 \pm 0,08$ pg/mg tejido) $p < 0,007$. La HA induce un estado pro-oxidante sistémico y local en el tejido uterino que se evidencia en la etapa prepupal y un estado

pro-inflamatorio en la etapa puberal. Estas alteraciones condicionarían la función uterina.

125. (566) LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA DISMINUYE LA SÍNTESIS DE PROLACTINA EN LA ADENOHIPÓFISIS DE LA RATA: CORRELACIÓN CON EL ESTADO REDOX Y MECANISMOS DEL RELOJ CIRCADIANO.

Pagano, E.¹, Jimenez-Ortega, V.², Cano Barquilla, P.², Fernandez-Mateos, P.³, Esquifino, A.², Cardinali, D.¹
Depto de Docencia e Investigación. Facultad de Ciencias Médicas. Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA)¹ Depto de Bioquímica y Biología Molecular III, Fac. de Medicina, Univ. Complutense, Madrid, España² Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España³

En la rata, un número de parámetros fisiológicos muestran cambios estacionales aún en condiciones constantes de temperatura, luz, y disponibilidad de comida. Dado que la prolactina (PRL) es un mediador principal de las adaptaciones estacionales, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la administración de melatonina (MEL), semejando en longitud la exposición al fotoperíodo de invierno, podía afectar el patrón de síntesis y liberación de PRL. Se examinaron también algunos de los mecanismos moduladores del reloj circadiano y del estado redox de la hipófisis anterior. Se administró MEL (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el agua de bebida) o vehículo por un mes, antes de sacrificar los animales a intervalos de 4 hs durante un ciclo de 24 hs. Se detectaron altos niveles de MEL (> 2000 pg/mL) en las ratas tratadas, desde el comienzo de la escotofase (21 hs) hasta la fotofase temprana (9 hs), mientras que en los controles esta fase fue más estrecha. Por análisis cosinor, las tratadas tuvieron un MESOR (promedio de las series de 24 hs) significativamente menor en la expresión del gen de la PRL y la PRL circulante, con acrofases localizadas en la mitad de la escotofase. MEL perturbó el patrón de expresión de 24 hs de óxido nítrico sintetasa -1 and -2, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, Cu/Zn- y Mn-superóxido dismutasa, y catalasa, mudando sus acrofases a la escotofase temprana/media o amplificando su máximo. Sólo el efecto inhibitorio de la MEL sobre la expresión de NOS-2 se correlacionó temporalmente con la inhibición de la producción de PRL. El patrón de 24 hs de peroxidación lipídica no varió luego del tratamiento. La MEL aumentó la expresión media de Per2, Cry1, y Cry2 y retrasó significativamente la fase de expresión de Per1, Per2, y Cry1. También retrasó la fase del ritmo circadiano plasmático de corticosterona e incrementó la amplitud de los ritmos plasmáticos de corticosterona y tirotrófina. Los resultados indican que bajo una duración prolongada de la señal diaria de MEL, la síntesis y liberación de PRL en la hipófisis anterior de la rata están deprimidas.

126. (555) EFECTO BENEFICIOSO DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EN UN FENOTIPO DE SÍNDROME METABÓLICO EXPERIMENTAL: ROL DEL TEJIDO ADIPOSE ABDOMINAL

Zubiría, M¹; Pagano, E²; Giovambattista, A¹; Scacchi, P²; Spinedi, E¹; Cardinali, D²
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular CONICET-CICPBA¹ Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, UCA²

Existe creciente interés en el efecto terapéutico de la melatonina (Mel) en el síndrome metabólico humano y experimental (SME). En este trabajo evaluamos: a) el efecto del tratamiento con Mel (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el agua de bebida) en ratas macho con SME, inducido por la administración de una dieta rica en fructosa (10% en el agua de bebida por 8 semanas), sometida a un test de sobrecarga con glucosa, y b) el efecto directo de Mel (1 nM) sobre la función endocrina del tejido adiposo abdominal (TAA) normal in vitro. Para el experimento in vivo se utilizaron ratas macho adultas, ayunadas durante 2 h. Se tomó bajo anestesia una muestra basal de sangre de la vena safena antes de administrar ip una solución de glucosa

(2 g/kg). Se determinó la glucemia basal y 30, 60 y 120 min postinyección de glucosa, midiéndose el área bajo la curva de las glucemias (ABCG) expresada en % del control (media \pm ES, $n=8$ por grupo). La sobrecarga de glucosa en ratas con SME produjo un aumento de ABCG a $196 \pm 30\%$ del control ($p < 0,05$), el que fue revertido en forma parcial por la melatonina ($134 \pm 32\%$, $p < 0,05$) sin efectos significativos de la melatonina per se en los controles. En los experimentos *in vitro* encontramos (expresado en % respecto a la liberación espontánea de Lep) un aumento significativo ($p < 0,05$) en la secreción de leptina (Lep) por adipocitos aislados de TAA normal (200.000/tubo) incubados (30 min en condiciones metabólicas) en presencia de 1 nM Mel ($28,4 + 12,5\%$), 1 nM insulina (INS) ($30,4 + 4,9\%$) o 1 nM Mel + 1 nM INS ($68,9 + 16,1\%$); resultando aditivos los efectos ejercidos por Mel e INS sobre la secreción de Lep. En conjunto, nuestro estudio sugiere que el efecto directo de Mel sobre la insulino-sensibilidad del TAA podría cooperar en la mejora metabólica observada en individuos con SME tratados con Mel. (PIP 2009-0704, PICT 2007-1051, PICT 1045 y ME 048)

127. (532) POSIBLE PARTICIPACIÓN DE GALACTOSA 3-O-SULFOTRANSFERASA-2 EN PROCESOS RELACIONADOS CON LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE ADIPOCITOS

Schiappacasse, A.¹, Peral, B.², Suárez, C.³, Marshall, G.³, Calvo, J.⁴, Guerra, L.¹

Departamento de Química Biológica- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- UBA¹ IIB Alberto Sols - Universidad Autónoma de Madrid² Departamento de Computación - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA³ IBYME - CONICET⁴

La enzima galactosa 3-O-sulfotransferasa-2 (GAL3ST2) ha sido relacionada con el incremento metastásico tumoral. En la glándula mamaria, la involución que se produce al terminar la lactancia es un importante cambio durante el cual podría aparecer el cáncer. Con el objetivo de evaluar la posible participación de GAL3ST2 en la tumorigénesis mamaria, estamos estudiando la interacción entre epitelio y estroma. Previamente mostramos que proteínas producidas por células epiteliales de mama (NMuMG) provocarían la inhibición de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos en un modelo *in vitro* (3T3-L1), entre ellas la GAL3ST2. Estudios con la proteína recombinante disminuyeron en adipocitos la acumulación de triglicéridos un 31% y la expresión del factor de transcripción adipogénico C/EBP beta un 50%. Aquí estudiamos la expresión de GAL3ST2 en células epiteliales de mama y su efecto sobre la diferenciación de preadipocitos. Se realizaron western blot para determinar la expresión proteica, relativizada por GAPDH. Los preadipocitos se diferenciaron a adipocitos con agentes inductores en presencia o ausencia de GAL3ST2 recombinante. Se evaluó expresión de GAL3ST2 en dos líneas de tumor mamario humano con diferente capacidad metastásica (MCF-7 y MDA-MB-468), utilizando como controles positivos líneas de tumor de colon humano (SW480 y SPRY2). Se observó una expresión significativamente mayor en MDA-MB-468 respecto de MCF-7 ($1.45 + 0.03$ UA vs $1.23 + 0.05$ UA, respectivamente, $p=0.003$). Se evaluó expresión de AP2 como marcador de diferenciación de adipocitos. Al quinto día de la diferenciación se vio una significativa inhibición de la expresión de AP2 en las células tratadas con la enzima (células no tratadas: $13.09 + 1.02$ vs células tratadas: $6.77 + 0.99$; $p=0.002$). Estos resultados indicarían que la GAL3ST2 estaría afectando la diferenciación celular del preadipocito y establecerían una posible relación entre expresión de la enzima y la capacidad metastásica tumoral.

128. (237) INCREMENTO DE LA CAPACIDAD ADIPOGÉNICA IN VITRO DE PRECURSORES DEL TEJIDO ADIPOSITIVO ABDOMINAL EN LA RATA MACHO JOVEN CON OBESIDAD HIPOTALÁMICA

Zubira, M., Spinedi, E., Giovambattista, A.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular CONICET-CICPBA

La inapropiada expansión del tejido adiposo (TA) resulta en el desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas. Sin embargo, no es claro si durante la expansión del TA se generan nuevos adipocitos y en qué etapa ocurre. Hemos ya demostrado el modelo de obesidad hipotalámica que la adipogénesis se encuentra inhibida en etapas avanzadas de la expansión del TA (edad adulta). En este trabajo evaluamos la capacidad adipogénica en un estadio precoz de la expansión del TA en este modelo. Utilizamos ratas macho, de 30 días de vida, tratadas neonatalmente con monosodio glutamato (MSG) o vehículo (CTR). En el día experimental recolectamos sangre troncal para dosar las concentraciones de leptina (LEP), insulina (INS) y corticosterona (CORT). Disecamos el TA retroperitoneal (TARP) para aislar células precursoras contenidas en la fracción estroma vascular (FEV), las que se cultivaron hasta confluencia. En ese día se cuantificó la expresión de ARNm Pref-1 (PCR TR) y se indujo la diferenciación. Las células se mantuvieron en cultivo hasta el día 10 post-diferenciación (Pd), determinándose LEP en el medio. Al finalizar el cultivo cuantificamos la acumulación intracelular lipídica (Oil-Red O), la expresión de diversos genes (LEP, PPARg y Adiponectina) y el porcentaje de diferenciación celular. Los resultados indican un aumento ($p < 0,05$ vs. CTR) en los niveles circulantes de LEP y en la masa de TARP de animales MSG. Los niveles de Pref-1 fueron menores ($p < 0,05$ vs. CTR) en la FEV de los animales MSG. Contrariamente, las expresiones de LEP y PPARg, aunque no de Adiponectina, incrementaron ($p < 0,05$ vs. CTR) al Pd 10. La concentración de LEP liberada y el contenido lipídico celular fueron mayores ($p < 0,05$ vs. CTR) en MSG. Estos resultados indican que la capacidad adipogénica *in vitro* estaría aumentada en precursores adipogénicos de ratas MSG. Nuestro estudio sugiere que la hiperplasia contribuiría a la expansión de la masa de TARP en este fenotipo hiperadiposo. (PIP0704-PICT1051)

129. (386) EFECTOS DEL SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR FRUCTOSA SOBRE LA REPARACIÓN ÓSEA EN RATAS

Felice, J., Mccarthy, A., Cortizo, A.

Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral

El Síndrome Metabólico (SM) se asocia con riesgo cardiovascular aumentado. Varios estudios clínicos han evaluado los efectos del SM sobre el tejido y/o metabolismo óseo, la mayoría de los cuales encontró una mayor prevalencia de osteopenia y osteoporosis, así como una mayor incidencia de fracturas osteoporóticas no vertebrales. En el proceso de reparación de fracturas es necesario un acoplamiento preciso entre la resorción ósea mediada por osteoclastos y la formación ósea osteoblástica. En este trabajo se evaluaron los posibles efectos del SM inducido por una dieta rica en fructosa sobre la reparación de una lesión ósea. Ratas Sprague-Dawley macho jóvenes (200g de peso) se dividieron en dos grupos: C (Control; sin tratamiento) y F (Fructosa; solución de fructosa al 10% en el agua de bebida *ad libitum*). Luego de 15 días de iniciado el tratamiento se les practicó un defecto circular de 1 mm de diámetro en el hueso parietal derecho. El tratamiento con o sin fructosa continuó por 15 días subsiguientes, luego de lo cual los animales se sacrificaron bajo anestesia. Previo al sacrificio, se tomaron muestras de sangre posprandial para evaluar su estado metabólico. Se diseccionaron los riñones para realizar un análisis histomorfométrico mediante tinción con Hematoxilina y Eosina, e histoquímica para fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) como medida de la actividad de osteoclastos. Los parámetros sanguíneos del grupo F mostraron una elevación en la glucemia (152% de C, $p < 0.002$), trigliceridemia (208% de C, $p < 0.0001$), fructosaminemia (156% de C, $p < 0.05$) e insulinemia (414% de C, $p < 0.05$), lo cual es compatible con la inducción de SM. El análisis histomorfométrico de las lesiones parietales del grupo F reveló una disminución en el área de hueso regenerado (43% de C, $p < 0.01$), en la densidad osteocítica (90% de C, $p < 0.005$) y en la actividad TRAP (40% de C, $p < 0.05$). En conclusión, el SM inducido por fructosa en ratas genera una menor capacidad de regeneración de lesiones óseas.

FARMACOLOGÍA

130. (93) EFECTO DE LAS LIPOPROTEÍNAS HDL, LDL Y VLDL SOBRE LA ESTRUCTURA DE UN SURFACTANTE PULMONAR EXÓGENO BOVINO.

Martínez Sarrasague, M.¹; Cimato, A.¹; Piehl, L.¹; Meroño, T.²; Facorro, G.¹

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA¹ Lab. de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto. Bioq. Clínica, FFyB. UBA²

En numerosas patologías, la terapia con surfactante pulmonar exógeno (SPE) resulta ineficaz debido a la presencia de componentes séricos. En trabajos previos demostramos que la presencia de suero desagrega la macro-estructura (menor fracción activa pesada), rigidiza la zona hidrofóbica y aumenta el orden en la zona polar de la bicapa lo cual correlaciona con la pérdida de la actividad biológica. Estos cambios no pudieron ser atribuidos a gamma globulinas ni colesterol. La desagregación y los cambios estructurales en la zona hidrofóbica fueron atribuidos a la albúmina. El objetivo de este trabajo es estudiar cambios estructurales y de fluidez en un SPE producidos por las lipoproteínas séricas. SPE bovino adicionado con suero o con las distintas lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL separadas por ultracentrifugación) en concentraciones equivalentes a las séricas, fue marcado con 5 y 16 doxil-esteárico y de los espectros obtenidos por Resonancia de Espín Electrónico (ESR) se obtuvieron: tiempo de correlación t , parámetro de orden S, relación S/W y doble integral DI. La adición de suero produce incremento del S (mayor rigidez en la zona polar), aumento del t (menor fluidez en la zona hidrofóbica), menor fracción pesada activa (menor DI), pero no altera la relación S/W (relación fase ordenada/fase fluida). La adición de LDL no produjo cambios significativos en ninguno de los parámetros espectrales. La HDL aumentó el S ($p < 0.01$) y la relación S/W ($p < 0.01$), pero no produjo cambios significativos en t . La VLDL solo produjo incremento en el t ($p < 0.05$). La fracción pesada obtenida por centrifugación solo disminuyó significativamente en presencia de VLDL ($p < 0.05$). En Conclusión: VLDL tiene un comportamiento similar a la albúmina. Se atribuye a la HDL el aumento de rigidez en la zona polar, responsable de la pérdida de actividad tensoactiva. Futuros estudios de otras propiedades biofísicas podrán dar mayor información del efecto de HDL y VLDL sobre el SPE.

131. (157) DETECCIÓN DE FACTORES PREDISPONENTES Y FÁRMACOS CAUSALES DE LA PROLONGACIÓN DEL INTERVALO QTc EN LA PRÁCTICA CLÍNICA COTIDIANA

Keller, G.^{1,2}; Alvarez, P.³; Ponte, M.⁴; Beloso, W.⁵; Bagnes, C.⁶; Campos, A.¹; Di Girolamo, G.¹

Unidad de Farmacovigilancia, Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA.¹ Departamento de Emergencias, Hospital General de Agudos Donación Francisco Santojanni.² División Cardiología, Hospital de Clínicas José de San Martín.³ Departamento de Medicina Interna, Hospital General de Agudos Cosme Argerich.⁴ Sección Farmacología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires.⁵ Unidad de Oncología, Hospital General de Agudos Dr Enrique Tornú⁶

Introducción: La prolongación del intervalo QT por fármacos es una reacción adversa de alto riesgo para pacientes y la causa más frecuente de retiro de fármacos del mercado. El objetivo de este estudio fue determinar los fármacos y factores de riesgo más frecuentes en la práctica clínica cotidiana. **Métodos:** se incluyeron pacientes admitidos consecutivamente en los centros participantes, recabándose antecedentes del paciente de las historias clínicas. Se realizaron electrocardiogramas antes, durante y luego de los tratamientos farmacológicos indicados. El intervalo QT fue medido en ms y corregido por fórmula de Bazett (QTc). Se midió la diferencia de QTc Basal vs Tratamiento (Δ QTc). **Resultados:** Se evaluaron 965 pacientes (49,9% varones) con una edad media (rango) de 58 (18-98). El QTc (ms) promedio (SD) basal fue 429 (28), durante el tratamiento 433 (30), y luego del tratamiento 429 (23). El Δ QTc promedio fue de +4 ms (31).

Del total de pacientes, 337 (34,9%) prolongaron el QTc en valor absoluto (> 450 en hombres o 430 en mujeres), incluyendo 47 casos de > 500 ms. 171 pacientes (17,7%) presentaron Δ QTc > 20 ms, siendo 61 > 50 ms. Se encontró un riesgo relativo elevado de presentar QTc > 430 ms en hombres o 450 en mujeres para los antecedentes de insuficiencia renal (1,62) y diabetes (1,38) y de presentar Δ QTc > 20 ms para los antecedentes de insuficiencia cardíaca (1,68), cardiomiopatía isquémica (1,57), insuficiencia renal (1,88), y diabetes (1,98). El análisis de los fármacos, mostró un elevado riesgo de prolongación del intervalo QTc para midazolam, levofloxacina, propofol, anfotericina B, carvedilol, diltiazem, dobutamina, bleomicina, y bromazepam entre otros. **Discusión:** La prolongación del intervalo QTc por fármacos es frecuente en la práctica clínica habitual. Los factores predisponentes y fármacos implicados pueden ser reconocidos y utilizados para determinar y controlar que pacientes se encuentren en riesgo de este evento.

132. (391) EVALUACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD POR ENDOSULFAN: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE ALERTA AUDITIVA Y SU MODULACIÓN POR PRE-PULSOS EN RATAS JÓVENES Y ADULTAS

Tardivo, A.¹; Yodice, A.¹; Hess, L.¹; Scremin, O.^{1,2,3}; Chialvo, D.^{1,2}

Profisio, Facultad de Medicina UNR¹ CONICET² School of Medicine, UCLA, USA³

Introducción: En ausencia de convulsiones, la intoxicación por endosulfan (ES) y análogos resulta difícil de detectar. Un biomarcador no-invasivo que permita la detección objetiva de la intoxicación por endosulfan sería extremadamente útil. La respuesta motora de alerta auditiva (RAA) inducida por un pulso intenso de sonido y su modulación por pre-pulsos (PP) de baja intensidad es sencilla y puede adaptarse a uso en humanos. **Objetivo:** Este trabajo intenta determinar si la RAA, o su modulación por PP se altera a dosis pre-convulsivas de ES, administrado intra-gástricamente, en ratas jóvenes (37-45 días) y adultas (118 días). **Diseño:** Los animales se colocaron en un módulo provisto de un acelerómetro dentro de una caja oscura aislada de sonido y se los expuso a tres clases de estímulos: Un pulso de alerta acústico de 40 mseg, 92 dB solo (AA) o precedido por 100 mseg por un pre-pulso de 20 mseg y 73dB (PP73) o 84 dB (PP84). Cada sujeto recibió 20 estímulos de cada clase en el mismo orden pseudo-random con intervalo variable. La dosis convulsiva 50% (DC50) determinada con el método de "up and down" de Dixon fue de 30 mg/kg. Se trataron 4 grupos de ratas con endosulfan 0.25, 0.5 o 1 DL50 y vehículo (V). **Resultados:** El significado de ES vs. V (t-test $P < 0.05$) se indica con (*). Las ratas jóvenes tratadas con ES a 0.25x (n=10) y 0.5x (n=10) DL50 no mostraron diferencias con controles (n=10). A 1x DC50 (n=9) todas las respuestas se incrementaron. AA fue de (media±error standard) 27.1±1.9*, V=14.6±1.0. Las ratas adultas tratadas con 0.25 DC50 (n=12) no mostraron ninguna diferencia significativa con controles (n=12). A 0.5 DC50 sin embargo, para AA, ES (n=8): 22.9±1.0*, V (n=8)= 11.5±0.4; PP73, ES= 16.7±0.8*, V= 10.6±0.3; PP84, ES =10.5±0.4*, V=7.2±0.4. **Conclusiones:** La RAA no sería útil como biomarcador de la intoxicación aguda por ES en animales jóvenes. Resta determinar como se conduce este test en la exposición crónica al tóxico.

133. (427) PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS COMBINADAS DE DERMATÁN SULFATO Y QUITOSÁN CON POTENCIAL APLICACIÓN TERAPEUTICA Y/O DE DIAGNOSTICO PRODUCCION DE NANOPARTICULAS COMBINADAS DE DERMATAN SULFATO Y QUITOSAN CON POTENCIAL APLICACIÓN TERAPEUTICA Y/O DIAGNÓSTICO.

Gualco, L.¹; Rasente, R.¹; Imperiale, J.²; Sosnik, A.²; Calabrese, G.¹

Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Cátedra de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA²

La injuria endotelial activa un programa inflamatorio, angiogénico y trombótico con consecuencias en el remodelado de la matriz extracelular vascular. Las nanopartículas (NPs) con dermatán sulfato (DS) podrían diferenciar el endotelio normal del injuriado. Nuestro objetivo fue producir NPs combinadas de DS y quitosán (QT) con potencial aplicación terapéutica y/o de diagnóstico. Para lo cual se empleó DS (Syntex, Argentina) de 5 KDa, altamente sulfatado ($27.7 \pm 1.9 \mu\text{g}\%$) con una potencia anticoagulante de 1 U/mg; y una solución de QT (Sigma). 10 ml de la solución de QT (0.05%, pH: 5.0) fueron inyectados (flujo de 40 ml/hora) sobre 40 ml de la solución de DS (0.15%, pH 5.0) con agitación constante durante 15 min. Sobre las dispersiones se evaluó la concentración de DS por metacromasia, el diámetro promedio, la distribución de tamaños y el potencial Z (ZP) por DLS (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK), en el momento de la obtención y a lo largo de 28 días. Los pellets obtenidos por centrifugación de las dispersiones a 5000 rpm durante 20 min ($12-16^\circ\text{C}$) fueron resuspendidos en: solución fisiológica (NPs1), buffer fosfato (NPs2), o DEMEM con (NPs3) y sin (NPs4) suero fetal bovino (SFB) al 10% para la determinación de la concentración de DS y su diámetro promedio. El tamaño promedio de las dispersiones recién obtenidas fue 149-156 (nm) ($n=3$) a lo largo del período de estudio; siendo el ZP de -31.81 ± 5.67 ($n=14$). El porcentaje de recuperación de DS en el pellet fue NP4 > NP3 > NP1 y NP2 (10, 0.45, no significativo; respectivamente), siendo el diámetro promedio de NP4 de 263-296 nm y de NP3 97-110 nm. Las principales conclusiones de nuestro trabajo son: 1) este procedimiento permite obtener NPs de DS/QT de bajos diámetros promedio y estables; 2) la centrifugación posibilita el aislamiento de las NPs y 3) La resuspensión de las NPs en el medio de cultivo celular DEMEM con suero permitió el aislamiento de NPs más pequeñas aunque con bajo porcentaje de recuperación.

134. (456) NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR: POTENCIACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO Y MODIFICACIÓN DE LA TOLERANCIA DE MORFINA POR LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 EN RATAS

Laino, C.; Escudero, G.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de La Rioja

El tratamiento del dolor severo agudo y crónico sigue siendo un desafío importante y común en la clínica médica. Los efectos secundarios y el desarrollo de la tolerancia al efecto analgésico de la morfina son las mayores complicaciones durante el tratamiento crónico, limitando la utilidad de la morfina en el tratamiento del dolor. Recientes evidencias han asociado a los ácidos grasos omega-3 (AG ω -3) con la reducción del dolor. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto analgésico de los AG ω -3 en monoterapia o en combinación con morfina, después de su administración aguda y crónica en la prueba de la plancha caliente en ratas. Los animales fueron alimentados con una dieta regular o una dieta suplementada con AG ω -3. Después de 16 días, los AG ω -3 aumentaron la latencia de la respuesta analgésica en comparación con el grupo control. El cotratamiento agudo de morfina con AG ω -3, después de 16 días de tratamiento con estos ácidos grasos, produjo un efecto analgésico aditivo. Además, el tratamiento combinado de morfina crónica con AG ω -3, después de 16 o 30 días de tratamiento con estos ácidos grasos, disminuyó o bloqueó el desarrollo de tolerancia del efecto analgésico de morfina, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que el efecto analgésico aditivo del tratamiento combinado de morfina y AG ω -3, y la disminución de la tolerancia de este opioide por este cotratamiento, podrían representar una estrategia de tratamiento del dolor severo agudo y crónico para reducir la aparición de los efectos adversos.

135. (484) TIOSEMICARBAZONA DE LA 4,4'-DIMETOXIBENZOFENONA: UN COMPUESTO LIDER CON ACTIVIDAD PROAPOPTICA SOBRE MODELOS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS.

Cabrera, M.1; Gómez, N.1; Moglioni, A.1; Shayo, C.2; Fernández, N.1; Davio, C.1

Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, FFyB, UBA.1 Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, FFyB, UBA.2

El tratamiento de las leucemias humanas, en particular de las leucemias agudas (LA), continúa siendo un desafío al presente. La gran versatilidad tanto a nivel estructural como a nivel de la variedad de actividades biológicas observadas en compuestos pertenecientes a la familia de las tiosemicarbazonas (TSC), los hace atractivos para el desarrollo de nuevos fármacos. Resultados previos del laboratorio mostraron que la tiosemicarbazona de la 4,4'-dimetoxibenzofenona (T44Bf) es un compuesto capaz de inhibir la proliferación de la línea celular U937. El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad de dicha molécula de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en un panel de líneas celulares utilizadas como modelos de LA (LMA: KG1a, HL60, U937 y LLA: Jurkat) e iniciar la descripción de su mecanismo de acción. Al evaluar la inhibición de la proliferación por reducción de MTS y conteo celular, observamos que 48h de tratamiento con T44Bf induce una inhibición de la proliferación concentración dependiente con una CI50 de 5 μM . La inhibición máxima alcanzada para HL60 y U937 fue del 90% mientras que para KG1a y Jurkat fue del 70%. Como indicadores de apoptosis evaluamos mediante western blot los niveles de caspasa 3 y PARP clivados, así como la actividad enzimática de caspasa 3 utilizando un kit colorimétrico y la marcación con AnexinaV/IP en ensayos de citometría de flujo. Los resultados obtenidos en estos ensayos correlacionaron con la inhibición de la proliferación previamente observada. Finalmente, en ensayos de western blot observamos que T44Bf modula en forma tiempo dependiente los niveles de Bcl-2 y pERK1/2 por un mecanismo independiente de la generación de especies reactivas del oxígeno (determinado por la capacidad de oxidar la sonda fluorescente DCF-DA). Estos resultados nos permitieron postular a T44Bf como compuesto líder con actividad proapoptótica capaz de modular a la proteína antiapoptótica Bcl-2 en diferentes modelos de LA humana.

136. (488) GLIBENCLAMIDE, A BLOCKER OF KATP CHANNELS, SHOWS ANTHELMINTIC ACTIVITY IN ECHINOCOCCUS GRANULOSUS LARVAL STAGE INVOLVING AN AUTOPHAGY MECHANISM.

Loos, J. ; Cumino, A.

Dpto Biología, Facultad de Cs Ex y Nat, Universidad Nacional de Mar del Plata

ATP-sensitive potassium (KATP) channels serve as a vital link between cellular metabolism and membrane electrical activity in cells of vertebrate and invertebrate. The pharmacologic characteristics of KATP channels include blockade by sulfonylureas such as glibenclamide (GBC), that cause the closure of the ATP-modulated K⁺ channels through binding to regulatory subunit SUR (sulfonylurea receptor), altering the membrane potential and triggering a variety of downstream events. This inhibition of KATP channels may cause membrane depolarization and a release of calcium via voltage-dependent channels. In this work we tested GBC as a new antiechinococcal compound against the larval stages of *Echinococcus granulosus* (Eg), the causative agent of human hydatid disease. GBC inhibited viability in protoscoleces and cysts, in a dose-dependent manner. After 15 days of incubation with 200 μM GBC the viability of treated protoscoleces was reduced to $45 \pm 5\%$ whereas after 2 days of treatment, the *in vitro* culture of cysts resulted in detachment of the germinal layers. Ultrastructural damages, determined by SEM, appeared earlier than the viability inhibition, and with lower drug concentrations. In addition, on treated protoscoleces with GBC an increase in intracellular Ca²⁺ concentration (labeling with Fluo-3 AM) was observed. GBC also increased the level of acidic vesicles (detected by staining with acridine orange and confocal microscopy), upregulated the LC3II expression (confirmed by immunoblot) and the key genes of the autophagic pathway (*atg6*, *atg8*, *atg12* and *atg18*) in treated protoscoleces. As GLB sensitivity is the major criterion used to detect SUR, we identified *in silico* one putative E-SUR ortholog in *Echinococcus* genome (pathogen_EMU_scaffold_007728) that showed 38% of

identity with *H. sapiens* ortholog. Our data reveal conservation of a possible GBC-sensitive K⁺ channel in *Echinococcus* and suggest that it may play an important role in the survival of larval stage.

137. (492) EFECTO PROAPOPTOTICO DE UN NUEVO INHIBIDOR DE LA GTPASA RAC1 SOBRE MODELOS DE LEUCEMIA AGUDA HUMANA

Echeverría, E.¹; Gomez, D.²; Davio, C.¹; Fernández, N.¹; Lorenzano-Menna, P.²

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cat. Qca Medicinal, FFyB, UBA¹ Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes²

Las Rho GTPasas son una familia de proteínas pequeñas de unión a GTP implicadas en la transcripción de genes, reorganización del citoesqueleto y progresión del ciclo celular. Entre los 22 miembros de la familia se encuentra Rac1, cuya sobreactivación en células leucémicas está asociada a migración e invasión. El objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos de un novel inhibidor de Rac1/GEF, ZINC69391, sobre distintos modelos de células leucémicas. Al evaluar sus efectos sobre la inhibición de la proliferación por reducción de MTS, observamos una inhibición máxima de la proliferación del 100%, tiempo y concentración dependiente con valores depCI50 de 4,57±0,02 en HL60, 4,44 ±0,03 en U937 y 4,56±0,02 en KG1A. Esto fue corroborado por conteo de células viables. Para evaluar apoptosis medimos la actividad enzimática de caspasa 3 a las 12h de tratamiento con 120 mM del inhibidor, esta fue de 18±1 veces respecto al control para HL60 y de 2,9±0,7 y 2,6±0,2 para KG1A y U937 respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos a las 24h de tratamiento con 50mM de ZINC69391. Estos resultados fueron confirmados por Western Blot de caspasa 3 y PARP clivados. Ensayos de citometría de flujo mostraron que mientras que en células HL60 la marcación con AnexinaV fue positiva en el 52,9% de la población celular tratada con 50mM del inhibidor, en U937 fue del 16,5%. Para explicar el mecanismo por el cual el inhibidor provoca apoptosis en estos sistemas, medimos la producción de especies reactivas de oxígeno y observamos en todos los modelos, un incremento del 40% (p<0,05) luego de 5h de tratamiento. La expresión de Bcl2, evaluada mediante western blot, mostró ser mayor en U937 y KG1A que en las células HL60, lo que podría explicar las diferencias de susceptibilidad observadas en las distintas líneas. Estos resultados señalan a ZINC69391 como un compuesto con actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en modelos de leucemias agudas humanas.

138. (524) ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL MICROARN (MIR) 122 EN UN MODELO DE HEPATOTOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR TETRACLORURO DE CARBONO (TC) EN RATAS

Lardizábal, M.¹; Nocito, A.²; Daniele, S.³; Rodríguez, R.⁴; Palatnik, J.⁴; Veggi, L.¹

Instituto de Fisiología Experimental IFISE - CONICET¹ Facultad de Ciencias Médicas (UNR)² Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR)³ IBR (CONICET-UNR)⁴

La hepatotoxicidad es una patología que involucra un daño al hígado asociado a la producción de muerte celular y/o alguna alteración de la función del órgano debido a la exposición a un xenobiótico. El TC es un hepatotóxico reconocido utilizado como modelo en la rata. Los miRs son moléculas de ARN de 21-23 nt que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. El miR-122 es específico y mayoritario en el hígado, conocido por su rol en el metabolismo de lípidos y por su expresión disminuida en hepatocarcinomas. Su transcripción puede ser regulada específicamente por los factores de transcripción CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPα) y Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha (HNF4α). También, su estabilidad puede ser regulada por adenilación mediante la enzima poli (A) polimerasa *Germ-line Development 2* (GLD-2). Previamente observamos una disminución del miR-122 junto con un aumento en los niveles de su gen target, Ciclina G1, en un modelo de hepatotoxicidad aguda

inducida por TC. Nos propusimos entonces evaluar sobre este modelo los factores que pueden explicar su expresión alterada. Se inyectaron ratas Wistar macho adultas con TC (i.p., 1 mL/kg rata) y aceite de maíz (vehículo TC, i.p.) y se sacrificaron a las 24 hs. El daño establecido se corroboró mediante determinación de los niveles séricos de ALT y AST, y mediante estudios anatomopatológicos sobre cortes histológicos. Se determinó la expresión hepática de: el precursor de miR-122 (pri-miR-122), C/EBPα, HNF4α y GLD-2 mediante RT-qPCR. Observamos una disminución estadísticamente significativa (p<0,05, n=4) en los niveles de expresión de pri-miR-122 y C/EBPα, mientras que los niveles de HNF4α no se vieron alterados y la expresión de GLD-2 se vio aumentada. Nuestros resultados sugieren que la disminución del miR-122 en un modelo de hepatotoxicidad aguda inducida por TC está asociada a una disminución de la expresión del factor de transcripción C/EBPα.

139. (549) CARACTERIZACIÓN DE DOS MUTANTES EN F243 DEL RECEPTOR H2 A HISTAMINA. EFECTO SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE AGONISTAS INVERSOS.

Granja-Galeano, G.¹; Echeverría, E.¹; Fabian, L.¹; Fazzari, E.¹; Shayo, C.²; Davio, C.¹; Fernández, N.¹; Monczor, F.¹

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA¹ Laboratorio de Patología Molecular, IByME, CONICET²

Previamente describimos que el receptor H2 a histamina (rH2), perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), puede adquirir una conformación inactiva que secuestra proteína Gs interfiriendo en la señalización de GPCRs que utilizan la misma vía. A su vez, mutaciones de la F424 del rH1 inducen espontáneamente una conformación del receptor capaz de secuestrar Gq. Mediante estudios de alineación determinamos que el homólogo en el rH2 es la F243. Por ello decidimos estudiar el efecto de mutar F243 sobre la funcionalidad del rH2. Mediante modelado por homología observamos que las interacciones que presenta este residuo son del tipo C-C, por lo que lo mutamos por A, provocando la pérdida de las mismas, o por S ganando una interacción del tipo puente de H. Mediante ensayos de unión, en células HEK293T transfectadas, verificamos la correcta expresión en membrana de las mutantes. Al medir los niveles de AMPc, observamos que si bien las mutantes presentaron una menor actividad constitutiva, su capacidad de respuesta a agonistas o agonistas inversos no se vio disminuida. Para evaluar la capacidad de las mutantes de interferir sobre la señalización de otro GPCR, las variantes fueron cotransfectadas con el receptor β2adrenérgico. Sólo la coexpresión con la mutante F243S provocó una reducción en la respuesta a isoproterenol (30% vs rH2wt) indicando que dicha mutación induce espontáneamente una conformación capaz de secuestrar Gs. A su vez, cimetidina, ligando específico de rH2, incapaz de promover el secuestro de Gs al interactuar con el rH2wt, disminuyó un 45% la respuesta del β2A al actuar sobre las mutantes. Mediante el modelo del complejo cúbico ternario pudimos explicar el efecto de las mutaciones como una disminución en la capacidad de activación del receptor cuando se encuentra unido a la proteína G. Estos resultados indican la importancia de la F243 sobre el mecanismo de acción de agonistas inversos del rH2 y el secuestro de la proteína G.

140. (551) MODULACIÓN MUSCARÍNICA DE LA ANGIOGÉNESIS INFLAMATORIA Y TUMORAL

Español, A.; Dmytrenko, G.; Sales, M.

CEFYO-CONICET

La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos y es crucial tanto en la inflamación como en la progresión tumoral. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es el principal promotor de este proceso. Demostramos que los receptores muscarínicos (RM) regulan la tumorigénesis y se postula que este proceso tiene aspectos comunes con la inflamación. Estudiamos el efecto de la estimulación muscarínica en células NIH3T3 tratadas con lipolisacárido (LPS) de E.coli (10ng/ml+IFNg 0,5ng/

ml) (NIH3T3*) en comparación con células tumorales SCA-9. Por Western blot (Wb) observamos que las células NIH3T3* expresan los subtipos $M_2 > M_1 > M_2$ de RM, mientras que las SCA-9 expresan $M_5 > M_1 > M_2 > M_3 > M_4$. También demostramos una expresión basal de VEGF-A similar para ambos tipos celulares, que se incrementó diferencialmente en presencia del agonista colinérgico carbacol (Carb) (10^{-8} M) (NIH3T3*: $38 \pm 1\%$; SCA-9: 134 ± 2) ($p < 0,001$ vs. control). El efecto se revirtió en presencia de atropina (AT) (10^{-8} M). En ensayos de angiogénesis in vivo observamos que tanto las células NIH3T3* como las SCA-9 estimulan la neovascularización medida por TIA (N° . vasos sanguíneos/mm²) (control (piel normal): $1,2 \pm 0,2$; NIH3T3*: $2,0 \pm 0,2$; SCA-9: $2,1 \pm 0,3$) ($p < 0,001$ vs. control) y el tratamiento con Carb (10^{-8} M) potenció dicha respuesta (NIH3T3*: $2,9 \pm 0,3$; SCA-9: $2,8 \pm 0,1$) ($p < 0,05$). Por Wb determinamos la expresión de VEGF-A en la piel del sitio de inoculación de células NIH3T3* y SCA-9. Los valores de densidad óptica (D.O.) de las bandas proteicas se correlacionaron con la respuesta neovascular observada in vivo (NIH3T3*: $21,2 \pm 1,1$; NIH3T3*+Carb: $35,8 \pm 1,3$; SCA-9: $45,7 \pm 2,5$; SCA-9+Carb: $68,4 \pm 2,1$). Concluimos que la activación muscarínica modula diferencialmente la respuesta angiogénica de los dos tipos de células estudiadas.

141. (561) ROL DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN EL EFECTO DE DENATONIO Y CICLOHEXIMIDA SOBRE LA SECRECIÓN DE AMILASA EN GLÁNDULA SUBMAXILAR MURINA

Rossi, C.¹; Dasso, M.²; Pignataro, O.³; Diez, R.²; Sales, M.¹
 CEFYBO - CONICET¹ 2^a Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA² IBYME - CONICET³

La transducción de la percepción amarga en tejido gustativo murino está mediada por la activación de receptores acoplados a proteína G, llamados T2R. Hemos demostrado previamente por Western blot e inmunohistoquímica que la glándula submaxilar (GSM) murina expresa el subtipo de receptor T2R6. Dos compuestos amargos, denatonio (DEN 10^{-5} M) y cicloheximida (CICLO 10^{-5} M), inhiben la secreción de amilasa en GSM murina (DEN: $48,0 \pm 2,9\%$; CICLO: $50,1 \pm 8,8\%$) con respecto al control (100%, GSM no tratada). Es bien sabido que el óxido nítrico sintasa (NOS) se encuentra involucrada en mecanismos de secreción de glándulas exócrinas, de manera que quisimos estudiar su rol en el efecto de los dos compuestos amargos. Por Western blot e inmunohistoquímica observamos la expresión de las isoformas calcio-dependientes NOS1 y NOS3, que se localizan respectivamente en células ductales y serosas y en el endotelio vascular. Mediante la técnica de Griess observamos que tanto DEN como CICLO inhiben la actividad de la NOS de manera concentración-dependiente con respecto al control ($54,7 \pm 1,7$ μ M/g tej.húm.) siendo 10^{-5} M la concentración efectiva máxima para ambos compuestos (DEN: $55,5 \pm 5,0\%$ y CICLO: $59,7 \pm 4,5\%$). Al pretratar la GSM con un inhibidor no selectivo de la NOS (L-NMMA 10^{-3} M) observamos que el efecto inhibitorio de DEN sobre la secreción de amilasa se ve reducido ($32,5 \pm 4,0\%$; $p < 0,05$) mientras que el de CICLO es revertido totalmente ($p < 0,001$). Ambos compuestos 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: $58,1 \pm 7,9$). Concluimos que en GSM murina DEN y CICLO inhiben la actividad de la NOS e incrementan los niveles de AMPc lo que aumentaría la actividad de proteína quinasa A (PKA).

142. (578) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VEGF-A POR RECEPTORES DE GUSTO AMARGO EN CÉLULAS SCA-9.

Dmytrenko, G.; Español, A.; Castro, M.; Sales, M.
 Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

Para el crecimiento de tumores sólidos es necesario el desarrollo de vasos sanguíneos (angiogénesis) y el factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A) es crucial en este proceso. El mismo también puede ser modulado por el óxido nítrico (NO). Previamente demostramos que las células tumorales SCA-9 expresan el receptor de gusto amargo (T2R) de subtipo 6 y las 3

isoformas de óxido nítrico sintasas (NOS). El denatonio (D), un agonista amargo de los T2R, incrementa su proliferación celular en un 42% ($p < 0,001$). Decidimos estudiar el efecto de este compuesto amargo sobre la expresión de VEGF-A y su modulación por la NOS. La determinación de NO se realizó por el método de Griess y la expresión de NOS y VEGF-A se determinó por Western Blot. Los resultados se expresaron como porcentajes respecto del control. Observamos que el tratamiento de las células con D produce una disminución del $36 \pm 4\%$ en la producción de NO ($p < 0,001$) que se correlacionó con una disminución del $66 \pm 8\%$ de la expresión de la NOS2. Al realizar ensayos de proliferación con D, la preincubación con el inhibidor específico de NOS1 (A5727) o de NOS3 (1134) produjo un aumento de la misma ($84 \pm 9\%$ y $72 \pm 11\%$ respectivamente, $p < 0,001$ vs. control o D) mientras que la preincubación con el inhibidor específico de la NOS2 (aminoguanidina) no modificó el efecto del D. Demostramos que las células SCA-9 expresan VEGF-A y que el tratamiento con D aumentó su expresión en un $70 \pm 6\%$ y la respuesta neovascular in vivo ($35 \pm 8\%$; $p < 0,05$ vs. basal) mientras que la expresión de VEGF-A en el sitio de inoculación aumentó en un $139 \pm 14\%$ ($p < 0,001$ vs. basal). La preincubación con LNMMA (inhibidor no selectivo de las NOS) aumento en un 44,5% la expresión de VEGF-A respecto al D. Concluimos que el D modula la expresión de VEGF-A por un mecanismo NOS dependiente.

143. (583) LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL MÚSCULO CILIAR DEL CERDO

Benozzi, G.; Quinteros Villarruel, E.; Benozzi, J.; Borda, E.; Orman, B.
 Cátedra de Farmacología-Facultad de Odontología, UBA

El músculo ciliar (MC) es un músculo liso en forma de anillo que al contraerse permite la acomodación provocando un cambio de la forma y la ubicación del cristalino. El óxido nítrico (ON) producido en el MC modula el proceso de acomodación permitiendo una correcta visión. En este trabajo nosotros evaluamos la capacidad del MC del cerdo para promover la producción de ON en presencia y ausencia de un agonista colinérgico y sus antagonistas. Mediante la técnica de ELISA valoramos la producción de ON en presencia de pilocarpina y de antagonistas colinérgicos de los subtipos M_1 (1×10^{-6} M pirenzepina) y M_3 ($4,5 \times 10^{-8}$ M J104129). Se observó que la pilocarpina a concentraciones crecientes (1×10^{-10} a 1×10^{-6} M) incrementa la producción de ON un $47\% \pm 3,8$ $n=6$, alcanzando un efecto máximo a 1×10^{-7} M. Este efecto fue inhibido en presencia de 1×10^{-8} M atropina y $7,5 \times 10^{-4}$ M L-NMMA un $54\% \pm 4,4$ $n=8$ y $52\% \pm 4,6$ $n=8$, respectivamente. Asimismo, los ensayos con los inhibidores de las isoformas de la ONS mostraron que la producción de ON disminuyó un $31\% \pm 2,9$ $n=6$ en presencia de 1×10^{-5} M L-NIO y $49\% \pm 3,9$ $n=6$ con 1×10^{-5} M NZ mientras que la m-UREA no tuvo efecto. Además, el efecto estimulante de la pilocarpina involucra la movilización del calcio, ya que en presencia de verapamilo y trifluoperazina fueron bloqueados los efectos estimulantes de la pilocarpina sobre la ONS. Los antagonistas colinérgicos muscarínicos específicos de los subtipos M_1 y M_3 disminuyeron significativamente ($p < 0,001$) la producción de ON por pilocarpina en un $39\% \pm 2,6$ $n=8$ y $53\% \pm 4,1$ $n=6$, respectivamente. Conclusión: Estos resultados muestran que el ON es producido en el MC del cerdo a través de la estimulación colinérgica y es participe directo del proceso de acomodación ocular. Esta modulación se produce a través de la unión y estimulación de los receptores muscarínicos M_1 y M_3 y se realiza a través de los subtipos constitutivos de la ONS neuronal y endotelial en un proceso que involucra la movilización del calcio.

144. (597) AVANCES EN LA EVALUACIÓN IN VITRO DE NUEVOS COMPUESTOS ANTIANDROGENICOS COMO POSIBLE TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Vecchione, M.³; Eiras, J.²; Erlejman, A.³; Bruttomesso, A.²
 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales¹ Departamento de Química Orgánica, UMYMFOR, FCEyN, UBA² Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA³

Introducción: Existe una relación causal entre los andrógenos y el cáncer de próstata, ya que responde en forma positiva a terapias de inhibición hormonal. En el desarrollo futuro de nuevas terapias efectivas contra esta enfermedad, es importante el estudio de compuestos capaces de suprimir la producción de andrógenos y/o que sean capaces de bloquear al AR. El Objetivo del presente trabajo es la evaluación de los compuestos previamente sintetizados, inhibidores de CYP17² con respecto a la modulación de la actividad transcripcional del AR y el efecto citotóxico en una línea celular de cáncer de próstata andrógeno dependientes. Metodología: Medición de la actividad transcripcional de AR: Células HEK 293T se cotransfectaron por el método de fosfato de calcio con pcDNA3-AR, pPSA-LUC y pRSV- β -galactosidasa. Tras la incubación, se reemplazó el medio por DMEM con SFA delipidado. Se estimuló con DHT y flutamida o el compuesto sintético. Se midió la actividad transcripcional mediante la actividad de luciferasa. Efecto citotóxico en células LNCaP: Células LNCaP cultivadas en medio RPMI, se sembraron en placas de 96 pocillos. Se arrestaron y se cambió el medio de cultivo por RPMI sin rojo fenol suplementado con DHT. Se trataron con flutamida o el compuesto sintético. La citotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de MTT. Resultados: Se encontró que 6 compuestos sintéticos inhibidores de CYP17², también disminuyen la actividad transcripcional del AR. Las curvas dosis-respuesta mostraron un comportamiento similar a flutamida para la inhibición del AR y citotoxicidad. Conclusiones: Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de una acción dual de algunos de los compuestos estudiados como inhibidores en los dos sistemas: la función de CYP17 en la biosíntesis de andrógenos y la actividad del AR. ¹ Eiras J., Vecchione B. y Bruttomesso A. XVIII SINAQO, 2011. ² Vecchione B. Tesis de Grado, 2011.

145. (662) DESARROLLO FARMACÉUTICO TEMPRANO DE UNA NUEVA FORMULACIÓN DE TERIPARATIDA

Farias, J.¹; Keller GA²; Parodi F.²; Papouchado M.¹; Silva M.¹; Tavernese V.¹; Bello R.¹; Lucini A.²; Di Girolamo G.²; Diez R A.¹

Biosidus SA¹ Microquim S.A.² Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires³

Introducción: La teriparatida es un análogo de la hormona paratiroidea empleada para tratar la osteoporosis. Para desarrollar un nuevo producto farmacéutico de teriparatida, y siguiendo la Guía EMEA/CPMP/SWP/1042/99, se comparó la toxicidad de dosis repetida (TDR) y la biodisponibilidad (BR) del producto en desarrollo, Osteofortil® (Biosidus S.A., Buenos Aires, Argentina) y el de referencia, Forteo® (Eli-Lilly, Indianapolis, IN, EEUU). Materiales y métodos, para la TDR se administró teriparatida (3 niveles de dosis, 28 d) en 72 ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa WKAH/hok (36 machos), evaluando efecto sobre histopatología y química clínica, tolerancia local, inmunogenicidad y exposición sistémica con la mayor dosis; otras 12 ratas recibieron placebo. En BR, 24 voluntarios sanos (10 mujeres) recibieron teriparatida (20 μ g SC), midiendo en plasma con el equipo HS-Human PTH(1-34) ELISA, Immunotopics International, (San Clemente, California, 92673 EEUU) y anticuerpos antiteriparatida por ELISA. Resultados: La teriparatida aumentó el peso de los machos, aumentó moderadamente los niveles de FAL, proteínas totales, CK, calcio, respecto del placebo, en mayor nivel en machos, pero sin diferencias entre los productos. La evaluación de inmunotoxicología no arrojó diferencia en linfocitos B, T y efectores citotóxicos en sangre o bazo. La tolerancia local fue similar. La inmunogenicidad de teriparatida en ambos productos, en las ratas, fue muy baja, sin diferencias entre productos. La evaluación de exposición sistémica mostró un pico de 93 pg/ml a los 15 minutos post-inyección, y muy rápida eliminación (indetectable en suero a las 4 h post-inyección) En la BR los cocientes Osteofortil/Forteo (expresados como porcentaje promedio e IC90%) fueron: Cmax 94,58%; 85,29-104,87, área bajo la curva (ABC)_{0-4h} 105,5%; 97,77-113,84 y ABC_{0- ∞} 104,40% 96,97-112,39. Concluimos que la toxicidad de dosis repetida de Osteofortil® y Forteo® es similar y que ambos productos son bioequivalentes.

146. (813) VQ-I PROTEASA OBTENIDA A PARTIR DEL LÁTEX DE VASCONCELLEA QUERCIFOLIA CON POTENCIAL ACTIVIDAD CICATRIZANTE

Torres, M.¹; Araujo E Silva, A.²; Lopes, M.²; Salas Bravo, C.²; Natalucci, C.¹; Lopez, L.¹
LIPROVE¹ Lab. de Biología Molecular de Produtos Naturais e Substâncias Antitumorais. UFGM²

Los productos naturales constituyen una de las mayores fuentes de compuestos cabeza de serie para el desarrollo de medicamentos. La etnofarmacología ha proporcionado abundante información sobre el uso de plantas medicinales cuyos principios activos son enzimas proteolíticas. Las propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes de algunas peptidasas cisteínicas de origen vegetal han sido bien documentadas. A partir del látex de frutos inmaduros de *Vasconcellea quercifolia* (Caricaceae) se ha obtenido una preparación enzimática que presenta una actividad proteolítica específica mayor que la detectada en el látex *Carica papaya* (Caricaceae), fuente de la enzima papaína. El extracto de *V. quercifolia* contiene siete peptidasas cisteínicas que fueron purificadas por métodos cromatográficos y caracterizadas empleando herramientas de proteómica. La peptidasa de menor punto isoeléctrico (VQ-I) fue evaluada en la proliferación de fibroblastos, ensayo que se utiliza como un indicador que permite inferir el potencial cicatrizante de la enzima. Para los ensayos se emplearon fibroblastos L929 de ratón en un medio depletado en suero fetal bovino y para establecer el índice de proliferación se midió la cantidad de timidina tritiada incorporada después de 24 y 48 hs de incubación a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de la peptidasa en estudio. Los ensayos se realizaron por triplicado para concentraciones de proteínas entre 0 y 1000 ng/ml y se emplearon controles de suero fetal bovino al 0,5% y 5%. Los resultados obtenidos indican que la peptidasa VQ-I ejerce un efecto proliferativo estadísticamente significativo cuando se emplea en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL, permitiendo concluir que dicha enzima proteolítica es un buen candidato molecular para ser probado como agente estimulante de la cicatrización.

MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR I

147. (42) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

Maymó, J.¹; Pérez Pérez, A.²; Magatti, M.³; Maskin, B.⁴; Parolini, O.³; Sanchez Margalet, V.²; Varone, C.¹

Depto. de Química Biológica, Facultad De Ciencias Exactas y Naturales, Universidad De Buenos Aires- Iquibicen-Conicet, Buenos Aires, Argentina.¹ Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Universidad de Sevilla, Sevilla, España² Centro Di Ricerca E. Menni- Fondazione Poliambulanza- Istituto Ospedaliero, Brescia, Italia.³ Hospital Nacional Alejandro Posadas⁴

La placenta reviste un gran interés como fuente de células para la medicina regenerativa dada la plasticidad fenotípica de muchos de los tipos celulares aislados de este tejido. Los tejidos placentarios son fáciles de obtener sin necesidad de procedimientos invasivos, proliferan rápidamente, se obtienen en gran masa y su uso no genera debates éticos. Dos tipos de células madre pueden ser aisladas del amnios de las placentas a término: las células epiteliales del amnios (hAECs) y las células amnióticas mesenquimales (hAMCs). Ambas expresan marcadores de células madre y poseen la capacidad de diferenciarse en los tres tipos de capas germinales. Las hAMSCs poseen una morfología de fibroblastos, forman colonias, pueden ser subcultivadas varias veces y presentan características inmunomoduladoras. Las hAECs no expresan telomerasa y no son tumorigénicas. Estas propiedades, el aislamiento sencillo y la fácil disponibilidad de la placenta, vuelven al amnios una fuente útil y no controversial de células para el trasplante y la medicina regenerativa. En el presente trabajo nos hemos planteado como objetivo el aislamiento y caracterización de células epiteliales de membrana amniótica humana. Mediante un protocolo de separación específico logramos aislar células amnióticas con un 70% de vitalidad y un 90% de pureza, medido por análisis de citometría de flujo. Observamos también, dicha pureza por microscopía, así como la morfología de las células en cultivo

durante dos semanas. Analizamos por Western blot la activación de las vías de señalización de MAPK y PI3K, relacionadas con el crecimiento, la proliferación y la diferenciación. Determinamos que luego de 24 h de privación de suero se estimula la fosforilación de ERK 1/2 y de Akt. En resumen, hemos logrado el aislamiento eficiente y el cultivo prolongado de células madre placentarias, y en número suficiente, como para comenzar con los subsiguientes estudios moleculares, celulares y preclínicos.

148. (132) EVALUACIÓN DE UN SUSTITUTO DE PIEL COMPUESTA CON CÉLULAS DE LA PAPIA DÉRMICA Y CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO PILOSO HUMANAS EN RATONES INMUNOCOMPETENTES

Kusinsky, A.^{1,2}; Stella, I.³; Drago, H.²; Sturla, F.²; Bossi, S.²; Castellanos, M.^{1,2}; Leirós, G.^{1,2}; Balañá, M.¹

Instituto de Ciencia y Tecnología César Milstein - CO-NICET¹ Banco de Tejidos-Hospital de Quemados de la Ciudad de Buenos Aires, Buenos Aires-Argentina² Centro de Estudios Biomédicos, Ambientales y Diagnóstico-Universidad Maimónides, Buenos Aires³ Fundación Cassará⁴

Los sustitutos de piel compuesta o dermo-epidérmicos podrían ser una herramienta útil para tratar lesiones profundas y/o extensas de la piel. Hemos demostrado anteriormente que la presencia de células humanas de la papila dérmica (DPC) en un sustituto de piel compuesta con células madre de folículo piloso (HFSC), usando una dermis acelular porcina (APD) como andamiaje, contribuyó a una epidermis más estratificada y ordenada con mayor número de células precursoras y mejor asimilación del injerto en ratones nude. En este trabajo, se comparó el efecto de las DPC y los fibroblastos dérmicos humanos (DF) como componente dérmico en un sustituto dermo-epidérmico utilizando HFSC humanas como componente epidérmico con el objetivo de analizar la arquitectura tisular y su asimilación en ratones inmunocompetentes. Para ello se injertaron ratones Balb/c con APD, y APD previamente sembrada con HFSC y DF o con HFSC y DPC. En todos los casos, 14 días después de injertar a los animales, se observaron lesiones ulcerativas con intentos de epitelización desde los bordes. El análisis histológico reveló que en los casos de piel compuesta se observó epidermolísis del injerto asociada a un proceso de rechazo. A los 21 días, la piel compuesta con DF mostró una reacción inflamatoria intensa por debajo de la epidermis con epidermolísis, evidencia macroscópica de lesión ulcerosa residual y epitelización incompleta desde los bordes. En la piel compuesta con DPC se observó una APD ampliamente remodelada casi completamente integrada al tejido, con sellado total de la lesión y ausencia macroscópica de lesiones ulcerativas. En resumen, los sustitutos de piel compuesta que contienen componentes celulares xenogénicos actuarían de manera similar a los injertos de piel cadavérica, permitiendo la cobertura transitoria de la lesión dando tiempo a la epitelización desde los bordes. Curiosamente, sólo la presencia de DPC favoreció la integración del andamiaje y una epitelización completa.

149. (249) EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE TGF- β SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS HEMATOPOYÉTICAS EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSEO HUMANO (HASC)

Rodríguez, T.¹; Alejandra, C.¹; Milagros, P.¹; Alejandro, S.²; Marcelo, I.²; Raúl, G.²; Marcelo, P.³; Ricardo, D.¹

Laboratorio de Terapia Génica y Células Madre Instituto de Investigaciones IIB INTECH Chascomús¹ Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reparadora, Hospital Italiano de La Plata² Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA³

La expansión *ex vivo* de las células madre y progenitores hematopoyéticos (HSPCs) requiere citoquinas que favorezcan su proliferación. Una estrategia se basa en el cocultivo con células madre mesenquimales. Éstas, secretan citoquinas hematopoyéticas (CH) que contribuyen a la multiplicación de las HSPCs y TGF- β , entre otros factores. Se sabe que TGF- β es un

inhibidor de la proliferación de HSPCs. Nuestros estudios previos demostraron que en hASCs TGF- β 1 disminuye la expresión de TPO, SCFa y b, IL-6 e IL-3, por otra parte aumenta la expresión de G-CSF, y LIF, mientras que Flt3L y GM-CSF no se ven afectadas. Ahora, evaluamos los perfiles de expresión de CH por qPCR en hASCs insensibles a TGF- β . Para ello, las células fueron transducidas con un vector lentiviral bicistrónico que codifica un mutante dominante negativo del receptor tipo II de TGF- β (T β RII) y eGFP (Lt-T β RII-DN). Luego de la transducción y para trabajar con poblaciones altamente enriquecidas (90%), las hASC fueron purificadas utilizando un cell sorter. Inicialmente, en estudios de diferenciación *in vitro*, pudimos establecer que la inhibición de la cascada de TGF- β en hASC no afecta su multipotencialidad. Posteriormente, se analizaron los perfiles de expresión de un panel 9 CH (TPO, SCFa y b, FL, IL-6, IL-3, G-CSF, LIF y GM-CSF). De esta manera pudimos documentar que en ASC insensibles a TGF- β con respecto a células sensibles hay un expresión incrementada de FL ($p < 0.01$), G-CSF ($p < 0.01$), y GM-CSF ($p < 0.01$); una disminución en la expresión de SCFb ($p < 0.05$), IL-6 ($p < 0.01$) y LIF ($p < 0.01$), mientras que TPO, SCFa e IL-3 permanecen sin cambios detectables. Si bien es necesario una confirmación de estos resultados mediante cuantificación de citoquinas y estudios de cocultivo con HSPCs, nuestros resultados sugieren que la inhibición de la cascada de TGF- β en hASCs permitiría una mayor producción de CHs fundamentales para la expansión hematopoyética *ex vivo*.

150. (390) DIFERENCIACIÓN CARDIACA A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIA HUMANAS: OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO CLÁSICO

Bluguermann, C.¹; Romorini, L.¹; Videla Richardson, G.¹; Questa Maria, .¹; Fernández Espinosa, D.¹; Scassa, M.¹; Evseenko, D.²; Miriuka, S.¹

FLENI¹ Laboratory of Connective Tissue Regeneration. Orthopaedic Hospital Research Center, UCLA. Los Angeles²

La metodología más usada para obtener células cardíacas a partir de células madres embrionarias humanas (hESC por su sigla en inglés), comprende la formación de agregados celulares tridimensionales (cuerpos embrioides, CEs) a partir de colonias de hESCs y el posterior aislamiento de las zonas contráctiles que se desarrollan en los mismos. Dicho método de diferenciación se basa en el uso de suero fetal bovino, el cual contiene diversos factores que inducen la diferenciación de las células a los tres tejidos embrionarios, ectodermo, mesodermo y endodermo. Con el fin de optimizar el protocolo de diferenciación cardíaca, decidimos implementar un protocolo que incluya un medio de composición definida; mediante el agregado de factores específicos que dirijan la diferenciación hacia tejido mesodérmico en primera instancia y a mesodermo cardíaco en un segundo paso. Este protocolo se basa en el agregado de moléculas específicas en ventanas temporales acotadas. La línea celular utilizada fue WA09 y las moléculas cardioinductivas empleadas fueron: Proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4) y Activina A como inductores de progenitores de la línea primitiva y del mesodermo; el compuesto IWR-1 como inhibidor de la vía canónica de Wnt, que promueve la diferenciación a mesodermo cardíaco y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueve la expansión y maduración de dicha población. Resultados: Al comparar el número de áreas contráctiles obtenidas en este protocolo versus el método clásico de diferenciación pudimos comprobar que el nuevo protocolo denominado de Spin Ces más eficiente en la generación de las mismas. Las células obtenidas por el mismo fueron caracterizadas mediante: 1) Citometría de flujo: 50 % de las células en áreas contráctiles fueron MF-20(+) y el 30% cTnT(+). 2) Inmunohistoquímica: detectamos áreas positivas para MF-20 y cTnT en cortes histológicos de Ces completos. 3) RT PCR de tiempo real: Observamos el aumento en la expresión de los mRNA codificantes para MF-20, cTnT, TBX5, GATA4 y NKX 2.5. Conclusiones: El protocolo de Spin-Ces resultó más eficiente en la generación de Ces que presentan áreas contráctiles. La presencia de moléculas cardioinductivas incrementa la población de células cardíacas derivadas de hESCs.

- 151. (396) DESARROLLO Y BIOCOPATIBILIDAD DE MATRICES ORDENADAS DE COLÁGENO-VANADIO(IV) PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO**
Cortizo, A.¹; Mazzini, F.¹; Ruderman, G.²; Mogilner, I.²; Tolosa, E.²; Molinuevo, S.¹
LIO MM, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP¹ IFLYSIS (CONICET-UNLP)²

La ingeniería del tejido óseo requiere matrices biocompatibles y sin efectos tóxicos, para la adecuada regeneración del hueso. En este trabajo desarrollamos membranas de colágeno bovino con un grado de ordenamiento a nivel molecular, según patentes. Las mismas incluyeron 20 µg/cm² de un complejo de vanadio(IV)-ascorbato (VOAsc), con propiedades osteogénicas previamente reportadas. Se investigó la biocompatibilidad comparándola con membranas de colágeno ordenado sin vanadio (control). Se cortaron membranas de 1 o 2 cm² que se colocaron en platos de 24 o 12 pocillos respectivamente. Se plaquearon células progenitoras de médula ósea de rata o de la línea preosteoblástica MC-3T3E1. Se evaluó la biocompatibilidad de células osteoblásticas crecidas sobre las matrices, estudiando la adhesión, (numero de células teñidas con Giemsa / campo) y diferenciación al fenotipo osteoblástico a través de la expresión de fosfatasa alcalina (FAL) y la formación de nódulos de mineralización (NM, coloración de Rojo de Alizarina). Se encontró que en las matrices ordenadas conteniendo VOAsc las células se adhieren mejor (186 ± 20% control) y producen inducción osteogénica, expresando mayores niveles de FAL (180 ± 30% control) y NM (130 ± 9% control) que las matrices ordenadas sin VOAsc. Nuestros resultados preliminares sugieren que la incorporación de un compuesto osteogénico a las matrices preparadas en base a colágeno natural ha mejorado su osteoinducción y podrían ser aplicadas en la regeneración del tejido óseo

- 152. (517) ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE MATERIAL POLIMÉRICO PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO CARTILAGINOSO**
Fernández, J.¹; Vikingson, L.²; Cortizo, A.¹; Gómez Ribelles, J.^{2,3}
Laboratorio de Investigación en Osteopatía y Metabolismo Mineral, Facultad de Cis. Exactas, U.N.L.P.¹ Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, Universitat Politècnica de València, 46022 Val, Spain.² Ciber en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Valencia, Spain.³

Ingeniería de tejido óseo-cartilaginoso (ITO-C) nace por la necesidad de sustituir a las terapias actuales en la reparación de estos tejidos, utilizando distintos tipos de materiales como los polímeros, guiando la reparación de los tejidos al mismo tiempo que son degradados y eliminados del cuerpo. Por ello, una condición necesaria para la utilización de estos materiales es que posean una tasa de degradación óptima, acorde con los tiempos de reparación de los tejidos, entre otros requisitos. En este trabajo se presentan los resultados sobre el estudio de degradación de una red de los polímeros poli epsilon caprolactona (PCL) y poli 2-hidroxietil acrilato (PHEA) la cual hemos caracterizado previamente. La degradación se estudio en buffer fosfato, en medio de cultivo DMEN con enzima lipasa (25 UI/ml), ambas condiciones durante 42 días y DMEN suplementado con 1% de suero fetal bovino (SFB) con y sin células RAW264.7 durante 14 días. Todas las condiciones se llevaron a 37 °C en atmosfera humificada conteniendo 5% CO₂. Las muestras fueron cortadas, secadas en vacío, pesadas (W₀) e incubadas a distintos tiempos y condiciones. Luego del tiempo, las matrices se lavaron en forma exhaustiva con agua destilada, se secaron en vacío y se pesaron (W_t). Las muestras se colocaron en recipiente cerrado con acetona durante 24 hs para conocer la hinchabilidad. Luego se sacaron las muestras del recipiente y se pesaron (W_{ht}). La degradación se evaluó calculando el porcentaje de pérdida de peso (%W = (W₀-W_t) x 100/W₀) y porcentaje de hinchamiento (%Hinc = (W_{ht}-W₀) x 100/W₀). Estos ensayos demostraron que la degradación mediante las RAW (14 días) produce una mayor pérdida de peso (12 +/- 0,5 vs 8 ± 1,5) respecto a la degradación enzimática (42

días). Sin embargo, la degradación enzimática produce una mayor hinchabilidad (316 ± 8) vs con RAW (252 ± 3). Nuestros resultados demuestran que la red desarrollada para uso en ITO-C es capaz de ser degradada por diferentes mecanismos.

- 153. (520) CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL INSULADOR DE CROMATINA DE LA ARILSULFATASA (ARSI) DE ERIZO DE MAR EN VECTORES GAMARETROVIRALES AUTOINACTIVADOS (SIN)**
Pena, M.¹; Rodríguez, T.¹; Carrea, A.¹; Perone, M.²; Dewey, R.¹
Laboratorio de Terapia Génica y células Madre, IIBINTECH CHASCOMÚ- CONICET UNSAM¹ Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA²

Los gamaretrovirus son ampliamente utilizados en terapia génica por su capacidad de integrarse al genoma de la célula huésped, generando una expresión estable del transgen terapéutico. Sin embargo una vez integrado puede producir mutagénesis insercional, o la expresión puede silenciarse. Por este motivo se están investigando insuladores de cromatina, uno de ellos es el de la arilsulfatasa de erizo de mar. En este trabajo estudiamos el efecto de Arsl sobre el silenciamiento génico en vectores gamaretrovirales SIN. Para ello clonamos Arsl en orientación sentido (R-EFS-W/A+) o antisentido (R-EFS-W/A-) en la región U3 del LTR3' del vector parental bicistrónico pSRS11.EFS.WASP. ireseGFP.pre (R-EFS-W). Se detectó la presencia de Arsl en el LTR5' del provirus mediante PCR de células HT1080 transducidas con los vectores recombinantes. Además, se determinó por FACS que la inclusión del insulador no va en detrimento del título viral. Para evaluar el efecto de Arsl sobre el silenciamiento transgénico, se transdujeron células HT1080 a MOI 10 que fueron purificadas utilizando un cell sorter hasta obtener una pureza de 80%. El porcentaje de células expresando GFP y la proteína WASP fue monitoreado por FACS y western blot respectivamente, a intervalos de 15 días durante 15 semanas. Así observamos que en el vector R-EFS-W/A+, la expresión génica disminuye dramáticamente a los pocos días de cultivo, mientras que, tanto el vector R-EFS-W/A- como R-EFS-W mantienen los niveles de expresión transgénica. Por lo tanto, nuestros resultados indican que en vectores gamaretrovirales SIN la orientación sentido del Arsl acelera el silenciamiento génico. Además, comprobamos que con Arsl en orientación antisentido los niveles de expresión son similares a los obtenidos con el vector parental, y que a diferencia de otros vectores retrovirales no hay una rápida disminución de la expresión génica. Esta información inicial contribuye para el desarrollo de vectores virales más seguro y efectivos.

- 154. (521) EFECTO DE LAS CME EN LA RESPUESTA INMUNE EN UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN CRÓNICA PRODUCIDA POR LA IMPLANTACIÓN DE UN CUERPO EXTRAÑO**
Rodríguez Vida, J.; Maggini, J.; Camerano, G.; Costa, H.; Machuca, D.; Geffner, J.; Nepomnaschy, I.; Piazzon, I.
Academia Nacional de Medicina

Las células mesenquimales estromales (CME) presentan marcadas actividades inmunomodulatorias. Anteriormente estudiamos el efecto que producen en macrófagos. Se encontró que, tanto *in vitro* como *in vivo*, aumentan la producción de IL-10 y estimulan la fagocitosis de células apoptóticas, llevando a sugerir que producen un cambio en los macrófagos llevándolos desde un fenotipo M1 (proinflamatorio) a uno M2 (regulatorio). En el presente proyecto se generó un proceso de inflamación crónica por implantación subcutánea de un cilindro de vidrio en ratones de la cepa BALB/c con el objetivo de estudiar la influencia de las CME sobre los linfocitos presentes en el sitio de inflamación. La mitad de los cilindros fueron inoculados a los 2 y 7 días con 2x10⁵ CME cada vez. A los 15 días se analizó el contenido de todos los cilindros. A través de FACS se vio que en los cilindros inoculados con CME aumentó el número absoluto de células TCD4⁺ [media del N°abs±DS (x10³): 214±78,9 wt vs. 686,7±60,2 con CME; p<0,005; n=10] y TCD8⁺ [media del N°abs±DS (x10³):

139,9±59,4 wt vs. 1081±187,3 con CME; $p < 0,004$; $n = 10$]. No se encontraron diferencias significativas en el número absoluto de los LB220*. Se observó un aumento significativo en el número absoluto de células TCD8+ capaces de producir IL-10 [media IL-10*/TCD8+±DS ($\times 10^3$): 3,95±0,35 wt vs. 10,6±1,0 con CME; $p < 0,03$; $n = 10$]. No se detectaron niveles de IFN- γ /TCD8+. No se observaron cambios en la producción de IL-10 ni de IFN- γ por parte de las células TCD4*. Se observó un aumento significativo en el número absoluto de linfocitos Tregulatorios [media±DS ($\times 10^3$): 5,97±2,38 wt vs. 26,55±2,84 con CME; $p < 0,002$; $n = 10$]. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados sugieren que las CME crearían un ambiente inmunosupresor debido no sólo a la inducción de macrófagos M2 y al aumento en su capacidad fagocítica, sino también a aumentos en el número de Treg y en el número de células CD8 productoras de IL-10.

155. (526) CIRCONIO, UN NUEVO CANDIDATO PARA IMPLANTES INTRACORPÓREOS. ESTUDIO PRELIMINAR IN VIVO.

Katunar, M.¹; Gomez-Sanchez, A.¹; Balllarre, J.¹; Bacca, M.²; Haddad, K.²; Vottola, C.²; Vico, T.²; Orellano, J.²; Ceré, S.¹

Division Corrosion-INTEMA-Universidad Nacional de Mar del Plata¹ Hospital Interzonal General de Agudos-(HIGA)-Oscar Alende²

El estudio de los biomateriales se ha enfocado en el desarrollo de modificaciones a nivel superficial para mejorar la integración entre los dispositivos biomédicos y el tejido circundante minimizando la formación de tejido fibroso y el potencial rechazo del material. Es sabido que las células óseas reaccionan en forma diferencial dependiendo de la topografía de la superficie con la que están en contacto. El circonio es un material prometedor para implantes intra-óseos debido a su buena resistencia al desgaste, capacidad de oseointegración y baja velocidad de liberación de iones al medio. En este trabajo se evalúan las interacciones a nivel célula-substrato sobre implantes de circonio sometidos a tratamiento de anodizado para beneficiar la oseointegración y resistencia a la corrosión. Se realiza el estudio *in vivo* de implantes de circonio sin (Zr0) y con un tratamiento de anodizado a 30V(Zr30). Las muestras fueron implantadas durante 63 días en tibia de rata adulto Wistar y el tejido óseo formado fue analizado mediante técnicas histológicas clásicas y se estudió el perfil de mineralización ósea mediante marcación con fluorocromos. Los resultados obtenidos revelan un tejido óseo mineralizado neoformado en torno al implante, para ambos acabados superficiales y se observa que en los implantes de Zr30 el tejido nuevo es más rico en osteocitos de forma elipsoidal indicando la presencia de un tejido más maduro. La marcación con fluorocromos reveló una mayor velocidad de mineralización en los implantes de Zr30. Tanto en los implantes Zr0 como Zr30 se encuentra tejido óseo mineralizado en torno a los mismos, sin embargo para el Zr30 el tejido es más maduro y organizado que para el Zr0. El análisis de parámetros de histomorfometría dinámica revela mayor velocidad de mineralización en los implantes de Zr30. Por lo tanto la relevancia de los resultados hallados radica en una oseointegración mayor y más rápida en los implantes de circonio modificados superficialmente

156. (673) EFECTO DE ANTIBIÓTICOS ANTI-MICOPLASMA SP. SOBRE EL MANTENIMIENTO DEL ESTADO INDIFERENCIADO, PLURIPOTENCIA, SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS

Romorini, L.; Riva, D.; Bluguermann, C.; Videla Richardson, G.; Fernández Espinosa, D.; Questa, M.; Sevlever, G.; Miriuka, S.

FLENI

Las células madre embrionarias humanas (CMEH) se definen por dos características fundamentales: auto-renovación y pluripotencia. Su cultivo es complejo y costoso, por ende es indispensable extremar las condiciones de asepsia. Las CMEHs

son muy susceptibles a la contaminación por *Mycoplasma sp.*, y esta infección altera sus propiedades. Antibióticos, como Plasmocin™ (Plasmo) y Ciprofloxacina (Cipro), se utilizan para proteger (profilaxis) o para erradicar la infección por *Mycoplasma sp.* Sin embargo, aún se desconocen los posibles efectos citotóxicos de éstos sobre las CMEHs. Es por ello que el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de Plasmo y Cipro sobre el mantenimiento del estado indiferenciado, pluripotencia, supervivencia y proliferación de CMEHs. Las líneas HES5 (H5) y WA09 fueron tratadas con Plasmo 25 ug/ml y Cipro 10 ug/ml durante 14 días (desinfección) o durante 5 pasajes con Plasmo 5 ug/ml (profilaxis). Post-tratamiento, el mantenimiento del estado indiferenciado fue verificado por inmunofluorescencia y RT-qPCR de marcadores de indiferenciación: TRA1-60, TRA1-81, SSEA-4, Oct-4 y Nanog. Para evaluar la pluripotencia, las CMEHs se diferenciaron y se midieron por inmunofluorescencia y RT-qPCR los marcadores: Brachyury, Nkx2.5 y cTnT: mesodermo; AFP: endodermo; Nestina y Pax-6: ectodermo. En todos los casos Plasmo y Cipro no afectaron el mantenimiento del estado indiferenciado ni la pluripotencia. Más aún, generamos una línea H5-promotor de Brachyury-GFP y observamos al día 4 de la diferenciación en cuerpos embrionarios (control y tratados) expresión de GFP. No vimos cambios en la viabilidad celular (ensayo XTT) de las CMEHs con ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con Cipro 10 ug/ml y Plasmo 25 ug/ml enlentece el crecimiento celular (tamaño de colonias y XTT). Finalmente, podemos concluir que Plasmo y Cipro no afectan el mantenimiento del estado indiferenciado, pluripotencia o viabilidad de las CMEHs pero sí la proliferación.

INMUNOLOGÍA CLÍNICA Y AUTOINMUNIDAD 2

157. (13) ALTERACIONES EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA EN PACIENTES CON FALLA DE RESPUESTA ESPECÍFICA A ANTÍGENOS POLISACÁRIDOS (SPAD)

Otero, C.¹, Díaz, D.², Uriarte, I.², Bezrodnik, L.², Finiasz, M.¹, Fink, S.¹

IMEX - CONICET - Academia Nacional de Medicina¹ Hospital de Niños R.Gutiérrez²

Los SPAD (P) son incapaces de montar una respuesta de anticuerpos frente a antígenos polisacáridos y sufren de infecciones en especial por *Streptococcus pneumoniae* (Spn). En ellos se reportaron alteraciones en la maduración de linfocitos B y otras asociadas a la edad, en el desarrollo de las células dendríticas. Su diagnóstico se realiza evaluando la respuesta a la vacuna polivalente polisacáridica, pero últimamente se ha dificultado con el uso creciente de vacunas conjugadas con antígenos proteicos. El objetivo de este trabajo es identificar nuevos marcadores diagnósticos para los P. Se evaluó en sangre periférica la expresión de marcadores fenotípicos, de maduración y diferenciación de monocitos (Mo) y células NK, así como linfocitos T (LT) en 20 individuos sanos (H) y en 20 P, considerando dos rangos etáreos: 7 a 14 y 14 a 18 años. Se estudió la producción de citoquinas proinflamatorias en Mo, células NK y LT en cultivos con Spn a 4, 24 y 48 hs respectivamente, tanto en H como en P. Las determinaciones se hicieron por citometría de flujo. Encontramos un aumento dependiente de la edad en los Mo CD14++CD16- ($p = 0.002$) y una disminución en los Mo CD14++CD16+ ($p = 0.002$), en los H que no se vio en los P. No se observaron diferencias significativas entre H y P en la producción de TNF- α de los Mo frente al Spn. En los H se vio un aumento de LT CD45RO+CD27+ ($p < 0.05$), asociado a la edad, no observado en P. No se encontraron diferencias significativas entre H y P en la producción de IL-17 e IFN- γ de los LT CD4+ y CD8+ frente al Spn, aunque hubo una tendencia a una menor capacidad de respuesta en los P. Se observó un número elevado de células NK CD56^{dim}CD16+ ($p < 0.05$), con tendencia a una menor producción de IFN- γ frente al estímulo bacteriano, en los P. En los P no vemos los cambios asociados a la edad en los Mo y LT que ocurren en los H, y habría defectos en las NK comparando con los H. Estos datos podrían complementar el diagnóstico de los P.

158. (25) MAYOR POTENCIAL PROINFLAMATORIO EN CÉLULAS MIELOIDES PERIFÉRICAS DE PACIENTES CELÍACOS ADULTOS

Vodánovich, F.¹, Inzaugarat, M.¹, Billordo, L.¹, Bortot, G.², Hwang, H.³, Niveloni, S.³, Bai, J.³, Sordá, J.², Cherñavsky, A.¹ *INIGEM-LABORATORIO DE INMUNOGENÉTICA¹ División de Gastroenterología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA.² Sección Intestino Delgado, Hospital de Gastroenterología "Dr. C. Bonorino Udaondo"³*

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) modulan la expresión fisiológica de genes proinflamatorios en células mieloides (CM). Las CM periféricas son precursoras de las que infiltran la mucosa duodenal en el contexto de la Enfermedad Celíaca (EC); el estrés oxidativo (EO) por exceso de ERO en CM produce inflamación/daño tisular. Gliadina (Glia, antígeno dietario que dispara la EC) altera los sistemas enzimáticos antioxidantes en líneas celulares de enterocitos y en homogenatos de biopsias duodenales de celíacos activos (Ce) y celíacos tratados con dieta libre de gluten (Ce_{DLG}). Hipótesis: un mayor estallido respiratorio (ER) ante la activación *ex vivo* de monocitos (Mo) y/o neutrófilos (Ne) periféricos revelaría su potencial inflamatorio diferencial en EC. Objetivo: evaluar el efecto de la activación con *phorbol myristate acetate* (PMA), Glia y zeína (Ze, péptido dietario no antigénico) sobre la generación de ERO en Mo y Ne de Ce y Ce_{DLG}. Metodología: incubamos células mononucleares aisladas de sangre periférica (10⁶ cél/ml) de 24 Ce, 14 Ce_{DLG} y 31 Controles (Co) adultos con Glia, Ze (10 µg, 4 hs) o PMA (100 ng, 50 min). Incubamos Ne obtenidos por lisis de sangre entera con PMA. Medimos por citometría de flujo la oxidación de 2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína por ERO. Comparamos i) la intensidad media de fluorescencia (IMF) pre y post estimulación intra grupo e ii) índices individuales de estimulación (IE: IMF (Mo o Ne) estimulado/basal) entre grupos. Resultados: Los IE son mayores en Mo de Ce (p=0,05 vs. Co) y Ce_{DLG} (p=0,05 vs. Co) y en Ne de Ce (p=0,05 vs. Co) y Ce_{DLG} (p=0,01 vs. Co) [Kruskal-Wallis + post test de Dunn]. A diferencia de Ze, Glia induce ER en Mo [test pareado de Wilcoxon] aunque los IE son similares en los 3 grupos (p=ns). Conclusiones: se confirma el potencial inflamatorio diferencial de CM en el contexto de la EC. La probable contribución de Glia como inductora de EO en Mo requeriría la presencia de factores locales adicionales.

159. (84) ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA FOTOSENSIBILIDAD CUTÁNEA Y LOS ANTICUERPOS ANTI-RO/SS-A EN UN MODELO IN VIVO

Paz, M., González Maglio, D., Leoni, J. *Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Bs As. IDEHU-CONICET.*

Introducción: La fotosensibilidad cutánea (FC) se presenta en pacientes con Lupus y se postula un rol patogénico de los autoanticuerpos (aAcs) anti-Ro/SS-A 52 y 60 kDa, sin embargo, existe mucha controversia al respecto. Asimismo, este fenómeno ha sido poco estudiado en modelos animales. **Objetivos:** Generar aAcs anti-Ro52 y/o Ro60 en ratones SKH:1 e inducir FC por irradiación con luz UVB. Estudiar y comparar el aspecto macroscópico e histológico de la piel y la producción de TNF-α en extractos de epidermis. **Métodos:** Se inmunizaron 4 grupos de 10 animales cada uno con las proteínas recombinantes humanas (Prh): Ro52, Ro60, Ro52+60 o PBS. La reactividad de los Acs generados se evaluó por ELISA: anti-Ro humana (utilizando Prh) y anti-Ro murina (utilizando extracto de bazo). Luego cada grupo se dividió: 5 animales fueron irradiados (Irr) con 200 mJ/cm² de luz UV y 5 no (nlrr - control). Los animales fueron sacrificados 24 h post UV y se extrajo la piel del lomo: una porción para análisis histológico (H-E), otra para extractos de epidermis. El TNF-α se midió mediante ELISA comercial. **Resultados:** Los animales inmunizados al día 120 generaron Acs de alta reactividad contra las Prh (todos diferentes del control PBS p<0,001) así como también aAcs contra las Ro murinas (todos vs. PBS p<0,001). El aspecto macroscópico de la piel del lomo de los animales Irr no presentó diferencias entre los grupos inmunizados y PBS. Lo mismo ocurrió para las características histológicas, excepto por la

presencia de un leve infiltrado inflamatorio observado únicamente en el grupo inmunizado con Ro52 e Irr. La concentración de TNF-α es indetectable en los animales nlrr, elevándose de manera muy significativa en los grupos Irr, pero sin diferencias entre los grupos inmunizados y PBS. **Conclusiones:** Los anticuerpos anti-Ro 52 y 60 no se encuentran directamente relacionados con el fenómeno de FC, confirmando lo que ya hemos hallado previamente en modelos in vitro utilizando sueros de pacientes.

160. (96) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VARIANTES DE SPLICING DEL RECEPTOR TIPO II DE TGF-β (TβRII) EN LEUCOCITOS DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA (AR)

Carrea, A.¹, Rodríguez, T.¹, Pena, M.¹, Perone, M.², Velasco Zamora, J.³, Dewey, R.¹

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús¹ Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA² Instituto Médico CER, Quilmes³

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones con su consiguiente deterioro estructural. TGF-β es considerada de importancia en AR, con propiedades pro y antiinflamatorias. Tiene efectos regulatorios sobre distintos tipos de células sanguíneas, osteoblastos y células madre mesenquimales. La señalización de TGF-β ocurre mediante unión a los receptores de tipo I (TβRI) e II (TβRII). Se conocen dos isoformas de TβRII: TβRII-A y TβRII-B. Previamente demostramos la expresión de TβRII-B en leucocitos de individuos sanos. Esto es relevante ya que se creía que la expresión de TβRII-B estaba restringida a unos pocos tipos celulares. Debido a que la modulación de TGFβ y sus receptores podría ser una opción para el tratamiento de la AR, nos propusimos evaluar los niveles de expresión de ambas isoformas en monocitos, linfocitos y granulocitos de sangre periférica de pacientes con AR. Se compararon los valores promedios de las cantidades relativas de estos ARNm entre individuos sanos (N=9) y enfermos (N=9), observándose una disminución significativa (p<0,05) del ARNm de TβRII-A en linfocitos de pacientes con AR. Adicionalmente, se correlacionaron las cantidades relativas de los ARNm de los receptores en las distintas poblaciones con los parámetros clínicos determinados en el estudio, usando el test de correlación de Spearman. Este análisis arrojó correlaciones positivas significativas (p<0,05) entre las cantidades relativas de los ARNm de ambos TβRII en monocitos y el número de articulaciones doloridas, el número de articulaciones inflamadas y DAS 28. En resumen, demostramos una expresión específica de TβRII en subpoblaciones leucocitarias de individuos con AR. Además, detectamos correlaciones positivas con parámetros clínicos de la AR que sugieren que los niveles de ARNm de TβRII en monocitos podrían utilizarse como un marcador adicional para el diagnóstico, actividad y pronóstico de la enfermedad.

161. (147) ESTUDIO DE ANTICUERPOS EN HEPATITIS AUTOINMUNE

Moreno, J., Abraham, N., Rossi, M., Racca, A., Racca, L., García Borrás, S.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR

La Hepatitis Autoinmune (HAI) es una hepatopatía inflamatoria fibrosante, que puede progresar a cirrosis y falla hepática. Se caracteriza por una alteración de las aminotransferasas, hipergammaglobulinemia y presencia en suero de autoanticuerpos (aAc) no-órgano específico. Es de etiología desconocida y su patogenia se atribuye a una reacción inmune frente a autoantígenos hepatocelulares. El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de los aAc: anti-Fibronectina (a-Fn) y anti-Histonas (a-His), en 46 pacientes con diagnóstico de HAI, que concurren al Hospital Provincial del Centenario de la ciudad de Rosario. El estudio de los aAc se realizó por una técnica de ELISA indirecta. Para la determinación de a-Fn se utilizaron policubetas de PVC sensibilizadas con 10 µg/ml de Fn, obtenida en nuestro laboratorio a partir de plasma humano fresco. En la determinación de a-His,

las policubetas fueron sensibilizadas con 10 µg/ml de His (Sigma). Se sembraron 10 µl de cada muestra con 50 µl de diluyente y luego de la incubación, se agregó 50 µl IgG de cabra anti-inmuno-globulinas humanas conjugada con peroxidasa. La reacción se reveló con H₂O₂ y TMB y se detuvo con H₂SO₄. Una muestra de sueros normales fue procesada para determinar el valor de corte para las variables estudiadas. Se consideraron positivas aquellas muestras que presentaron un valor de Abs superior a 0.140 para a-Fn y superior a 0.071 para a-His. En los pacientes estudiados se observaron 19(41.3%) resultados positivos para anti-Fn, 10(21.7%) para anti-His y 8(17.4%) para ambos aAc. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de McNemar. Los resultados obtenidos confirman la presencia de uno o ambos aAc: a-Fn y a-His en 29 pacientes con diagnóstico de HAI. En estos pacientes, la proporción de resultados positivos no es la misma para los aAc estudiados (p<0.05). En trabajos posteriores analizaremos la asociación entre grado de lesión hepática y la presencia de a-Fn y a-His.

162. (253) LINFOCITOS B DE MEMORIA (LBm) EN INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE (IDCV) Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA

Díaz, G., Ferreyra Mufarregue, L., Guevara, R., Novoa, V., Núñez, N., Carballo, O., Lessa, C.
Hospital General de Agudos Dr. Carlos G. Durand

Introducción: La IDCV es un síndrome caracterizado por hipogamaglobulinemia, infecciones recurrentes y otras anomalías inmunológicas. En nuestra Institución, la IDCV es predominante (43%). **Objetivo:** Agrupar los pacientes según LBm en sangre periférica utilizando la clasificación de Paris, dividiéndolos en 3 grupos: BM0 (ausencia de LBm), BM1 (LBm totales normales y LBm postswitch con valores inferiores al normal) y BM2 (LBm totales y LBm postswitch en una proporción igual a la población general sana); y relacionar los diferentes grupos con la clínica.

Materiales y métodos: Se incluyeron pacientes con diagnóstico de IDCV establecido por los criterios del grupo de Inmunodeficiencia primaria de la IUIS y con seguimiento clínico. De 55 pacientes, se analizaron 21 (9 mujeres y 12 hombres) entre 20 y 59 años (media: 33). Edad de diagnóstico entre 4 y 57 años (media: 25) con una diferencia promedio de 11 años entre diagnóstico e inicio de síntomas (2 a 39 años). Para el análisis de subpoblaciones de LB por citometría de flujo se utilizó IgDFITC/CD27PE/CD19PerCP. La adquisición se realizó en un citómetro FACSCalibur BD (software CELLQuest) y el análisis con software PaintAGate. Los Linfocitos B se dividieron en LB naïve (CD27-IgD+), LBm preswitch (CD27+IgD+) y LBm postswitch (CD27-IgD-). Los valores de corte fueron establecidos por nuestro servicio. **Conclusiones:** La población predominante fue BM0 (62%) con: 92% bronquiectasias y compromiso pulmonar, 77% compromiso rinosinusal, 69% compromiso gastrointestinal (GI), 38% autoinmunidad (AI), 23% compromiso hematológico y 15% infección por Giardia. Los grupos BM1 y BM2 se hallaron en menor porcentaje, 10% y 14% respectivamente, con presencia de AI, compromiso GI, rinosinusal y bronquiectasias en BM1 y AI, esplenomegalia, Granulomatosis, bronquiectasias y compromiso GI, rinosinusal y hematológico en BM2. Esta clasificación nos permite optimizar el manejo de estos pacientes previniendo complicaciones clínicas graves.

163. (256) COMPROMISO GASTROINTESTINAL EN INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE. REPORTE DE CASOS DE UN CENTRO DE ADULTOS

Vijoditz, G., Ferreyra Mufarregue, L., Fernández Romero, D., Lessa, C.
Unidad de Inmunología e Histocompatibilidad, Hospital de Agudos Dr Carlos G. Durand

Introducción: La inmunodeficiencia común variable (IDCV) es una de las principales inmunodeficiencias primarias del adulto, caracterizándose por hipogamaglobulinemia e infecciones bacterianas recurrentes del tracto respiratorio y gastrointestinal (GI). Se asocia a autoinmunidad, enfermedad granulomatosa y neoplasias. **Objetivo:** Presentación de un reporte de casos de

pacientes con diagnóstico de IDCV y compromiso gastrointestinal en un centro Inmunología de adultos, y su comparación con las series publicadas en la bibliografía. **Diseño del estudio:** Se incluyeron pacientes con diagnóstico de IDCV establecido por los criterios del grupo de Inmunodeficiencia primaria de la IUIS que se encuentran en seguimiento en el servicio. Se analizaron pacientes que presentaron sintomatología gastrointestinal (infecciosa o no infecciosa) y a quienes se les realizó estudio del tracto GI mediante Video endoscopia alta (VEDA) y video colonoscopia (VCC), con toma de biopsia. **Resultados:** Se reportaron 55 pacientes con diagnóstico de IDCV, 32 en seguimiento, de los cuales 12 (37.5%) presentaron compromiso GI. Se logró realizar VEDA a 10 pacientes y VCC a 8, observándose diferentes compromisos concordantes con los descritos en la literatura. Cuatro (12.5%) presentaron infección por Giardia lamblia intestinal, dos (6.2%) por Helicobacter pylori gástrico y uno (3.1%) presentó Strongiloidiasis. Seis (18.7%) presentaron compromiso GI asociado a autoinmunidad, uno (3.1%) presentó granulomas en pulmón e intestino y uno (3.1%) desarrollo enfermedad neoplásica GI. **Conclusión:** El compromiso GI en IDCV es heterogéneo, infeccioso e inflamatorio, de alta morbilidad y presenta un peor pronóstico. Se debe monitorizar a los pacientes con estudios microbiológicos y endoscópicos de rutina, a fin de optimizar manejo clínico y evitar las complicaciones secundarias. Se continúa realizando evaluación endoscópica en forma de screening en estos pacientes a fin de evaluar la totalidad de la población.

164. (313) DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-GLUTAMATO DECARBOXILASA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EL APOYO DIAGNÓSTICO EN DIABETES MELLITUS AUTOINMUNE

Guerra, L., Trabucchi, A., Faccinetti, N., Iacono, R., Poskus, E., Valdez, S.
Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof Dr Ricardo a Margni IDEHU UBA- Conicet

En Diabetes Mellitus (DM) tipo 1, la detección de autoanticuerpos (marcadores) es utilizada en el apoyo diagnóstico y predicción de la enfermedad. El método de referencia para su dosaje es el ensayo de unión de radioligando (RBA). En búsqueda del desarrollo de un método de menor complejidad y alta sensibilidad, en este trabajo se propuso el uso de la Citometría de Flujo (CF) para la determinación de los autoanticuerpos anti-Glutamato Decarboxilasa (GADA) en sueros de pacientes diabéticos. Se utilizaron 27 sueros de pacientes diabéticos GADA positivos por RBA y 16 sueros humanos normales. Para la CF se incubaron los sueros con microesferas de poliestireno de 4 µm adsorbidas con GAD humana fusionada con Tiorredoxina (TrxGAD) expresada en *E. coli*. Los inmunocomplejos fueron reportados usando un Ac conjugado con AlexaFluor 488 y la detección por CF se realizó a $\lambda_{excitación} = 488$ nm. Las señales fueron obtenidas en unidades de Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) y los resultados fueron expresados en *Standard Deviation scores* (SDs= $(IFM_{suero\ analizado} - IFM_{media\ controles\ normales}) / Desv\ Estándar_{controles\ normales}$). La CF permitió detectar como GADA (+) al 48,2% de las muestras positivas por RBA. La mediana de la población de sueros normales resultó significativamente diferente a la de los sueros de pacientes con DM (p = 0,0005). Asimismo, los pares de datos obtenidos entre RBA y CF mostraron un apareamiento efectivo (rs = 0,4794 y p = 0,0032). En conclusión, se pudo desarrollar un inmunoensayo por CF capaz de detectar autoanticuerpos, siendo este el primer reporte de la técnica aplicada a la DM. Este método podría ser útil en la detección simultánea de varios marcadores de autoinmunidad en la misma muestra utilizando microesferas de diferente tamaño.

165. (400) CAPACIDAD ALERGÉNICA DEL POLEN DE CORTADERIA SELLOANA (POACEAE)

Galvez, M.¹, Bianchimano, A.¹, Zappa, S.¹, Murray, M.^{1,2}, Montes, B.^{1,2}, Avila, B.³, Prat, M.¹
Universidad Nacional del Sur¹ CONICET² Hospital Interzonal de Agudos Dr. José Penna³

Cortaderia selloana, perteneciente a la tribu Arundineae, es una herbácea de amplia distribución en Sudamérica, Nueva Ze-

landa y Nueva Guinea. En nuestro país es muy utilizada como ornamental. Su potencial alergénico ha sido poco estudiado. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar inmunológicamente el extracto de polen de *C. selloana*, determinar su relación antigénica con otras gramíneas y evaluar su capacidad alergénica. El perfil antigénico se determinó mediante western blot empleando un antisuero policlonal de conejo. El grado de reactividad cruzada con otras gramíneas se estudió por western blot y ensayos de inhibición mediante ELISA indirecto. El perfil alergénico se estableció por western blot utilizando un pool de sueros de individuos con sintomatología alérgica, test cutáneos positivos para gramíneas y presencia de IgE específica para *C. selloana* por ELISA indirecto. El perfil antigénico mostró 15 componentes reconocidos por IgG de conejo, en el que destacaron bandas entre 20-24, 33-35, 50-80 kDa. En orden decreciente de reactividad cruzada *C. selloana*, se relaciona con *L. perenne*, *L. multiflorum*, *H. murinum* subsp. *leporinum* y *C. dactylon*. Las concentraciones inhibitorias medias se correlacionan con estas observaciones. Entre los antígenos compartidos destacaron aquellos entre 33-35 y 50-80 kDa. El perfil alergénico mostró como principales bandas las detectadas en la zona de 33-35 kDa que se corresponden con los alérgenos del Grupo 1 caracterizados para otras gramíneas. La existencia de componentes de *C. selloana* reconocidos por IgE de individuos sensibilizados comprueba su capacidad alergénica. Esta especie pertenece a una tribu que no se incluye dentro de la mezcla de gramíneas usada en el diagnóstico clínico. Ensayos complementarios permitirán demostrar la presencia de alérgenos propios de *C. selloana* y justificar así su inclusión en dicha mezcla, lo que contribuirá a un mejor diagnóstico del agente causal de la alergia.

166. (448) EFECTO SINÉRGICO DE UN GEN HLA DE CLASE II Y LA FORMA FUNCIONAL DEL GEN ACTIVADOR KIR2DS4 EN LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR UNA HEPATITIS AUTOINMUNE DE TIPO I

Podhorzer, A.¹, Theiler, G.¹, Paladino, N.¹, Pandolfi, J.¹, Paz, S.², Cuarterolo, M.³, Fainboim, H.², Fainboim, L.¹
Hospital de Clínicas, Laboratorio de inmunogenética¹ Hospital F.J. Muñiz, Hepatopatías Infecciosas² Hospital Nacional de Pediatría J.P. Garrahan³

Antecedentes y objetivos. En estudios previos demostramos el papel diferencial de genes HLA de clase II en la susceptibilidad a desarrollar hepatitis autoinmune de tipo I en niños (HAIP) y en adultos (HAIA). Debido a que genes KIR activadores han sido asociados con autoinmunidad, este trabajo investigó en forma conjunta el papel de ambos sistemas polimórficos en estas patologías. **Métodos.** Se comparó a 233 controles normales con 81 HAIP y 44 HAIA. La tipificación de los 16 genes KIR se realizó mediante la amplificación de los dominios D1 y D2 combinados y una segunda PCR de la región transmembrana/citoplasmica. Al igual que para los genes HLA de clase I y II se utilizó la técnica SSOP y sondas específicas. KIR2DS4 fue amplificado con cebadores que permiten identificar a la forma funcional de las formas truncadas que solo presentan el D1 soluble. **Resultados y conclusiones.** No se hallaron diferencias entre controles y enfermos en las frecuencias de los 16 genes KIR. En cambio, en contraste con los controles donde la frecuencia génica de la forma funcional del KIR2DS4 es de 28.8%, en las HAIP representa el 51.2% (p<0.0001). En esta cohorte la frecuencia fenotípica del gen HLA-DRB1*1301 es de 50.6% Vs 11.6% en controles (p<0.0001), con un Odds Ratio (OR) para este gen de 7.8 y 3.6 para el KIR2DS4 funcional. En el análisis combinado de ambos factores de riesgo, el OR es de 40.3, mayor que el producto de ambos genes por separado, que permite concluir que existe un efecto sinérgico entre ambos genes para la susceptibilidad a desarrollar la HAIP. Si bien se desconoce el efecto de las formas solubles de KIR2DS4, el análisis del mismo mostró un efecto protector sobre la susceptibilidad a desarrollar HAIP. En las HAIA, donde HLA-DRB1*1301 representa un factor de bajo riesgo, este se transforma significativamente alto cuando se asocia con el gen funcional KIR2DS4, confirmando el sinergismo entre estos genes de clase II y los genes KIR.

167. (460) ESTUDIO DE AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES DE MENDOZA CON INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (HCV)

Navarta, L.¹, Espul, C.³, Acosta-Rivero, N.³, Rivero, V.²
Hospital Central¹ CIBICL CONICET. Fac de Ciencias Químicas. UNC² Laboratorio de Virología. Hospital Central. Mendoza³

Introducción. El HCV, virus hepatotrópico y linfotrópico, puede inducir manifestaciones extrahepáticas autoinmunes o presencia de autoanticuerpos, dependiendo de factores tanto del huésped como del virus. La respuesta autoinmune se desencadenaría en un individuo genéticamente susceptible o por mimética molecular entre epitopes virales y autoantígenos liberados por daño hepatocelular. **Objetivos.** Determinar prevalencia de anticuerpos característicos de enfermedades autoinmunes en muestras séricas de pacientes de Mendoza infectados con HCV. Evaluar la relación entre presencia de autoanticuerpos y niveles de enzimas hepáticas y analizar si existe correlación con la carga viral. **Métodos.** Se estudiaron 44 varones y 29 mujeres (n=73) de 22 a 63 años, con HCV diagnosticado por serología (ELISA). Se excluyeron coinfectados con HIV o HBV. Como grupo control sano: 27 varones y 17 mujeres, de 18 a 65 años. Se determinó por IFI anticuerpos antinúcleo (ANA), antimusculo liso (ASMA), anticélulas parietales, antimitocondriales, anti KLM, anti ADNc y ANCA. Por aglutinación: antitiroglobulina (ATG) y Factor reumatoideo (FR). **Resultados.** Se halló una asociación estadísticamente significativa entre infección con HCV y presencia de FR (75,34%); ASMA (42,46%); ANA (15,07%) y ATG (12,33%). Ninguno presentó anti KLM. No se detectó diferencia significativa en niveles de enzimas entre pacientes con y sin FR y ASMA. Se observó que los títulos de HCV fueron mayores en muestras negativas para FR que en las positivas, pero fueron similares en las positivas y negativas para ASMA y ANA. **Conclusión.** Se halló una elevada prevalencia de autoanticuerpos en pacientes con infección por HCV, siendo el FR el más prevalente. Dada la frecuente coexistencia de esta infección y manifestaciones reumatológicas, los datos obtenidos refuerzan la importancia de investigar HCV en pacientes con estas manifestaciones. El espectro de anticuerpos encontrados evidencia la influencia de factores genéticos y ambientales locales.

168. (575) SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO CON AUTOINMUNIDAD POR DEFECTO DE FAS CON CÉLULAS DOBLES NEGATIVAS NORMALES: DESCRIPCIÓN DE UN CASO

Mitchell, R.¹, Prieto, E.¹, Danielian, S.¹, Galicchio, M.², Pérez, L.¹
Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P Garrahan Servicio de Inmunología¹ Hospital de Niños Víctor J. Vilela, Rosario²

La expansión (>2.5%) de una subpoblación linfocitaria CD3+TCR α beta+ CD4-CD8- (DNs) constituye un criterio diagnóstico requerido para el síndrome linfoproliferativo con autoinmunidad (ALPS) en el contexto de linfoproliferación crónica no maligna y no infecciosa. Su sola constatación constituiría la primera etapa del estudio de laboratorio de pacientes clínicamente sospechosos según el algoritmo sugerido por el reporte del Workshop Internacional del NIH del 2009. Presentamos un caso con manifestaciones clínicas compatibles con ALPS, apoptosis inducida por Fas disminuida y defecto molecular en el gen FAS, que mostró repetidamente valores normales de DNs en ausencia de tratamiento inmunosupresor. Se trata de una paciente de 9 años que presentó linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, citopenias hemáticas e hiper gammaglobulinemia de los tres isotipos. Las células DNs fueron evaluadas por citometría de flujo, por análisis de TCR α beta vs CD4+CD8 (mismo fluorocromo). sFasL fue determinado por ELISA (VN <200 pg/ml). La expresión de Fas y Apoptosis inducida por Fas (ApFas) fueron evaluadas por citometría de flujo en células activadas con PHA/IL-2. ApFas se analizó como porcentaje de núcleos hipodiploides en relación al control sano del día (VN > 50%). Los estudios moleculares fueron realizados por PCR y secuenciación directa del gen FAS. Resultados: DNs 1,72% y 1,46%, sFasL 2159 pg/ml, expresión de Fas normal, ApFas 35% y mutación R250X del gen FAS (exón 9). Conclusiones: La paciente

no presentó un criterio requerido para el diagnóstico de ALPS. Los resultados destacan la necesidad de realizar un screening ampliado en el estudio de rutina de pacientes con sospecha de ALPS incluyendo el biomarcador sFasL en la primera etapa de evaluación con el fin de evitar el subdiagnóstico del síndrome.

169. (584) UN NUEVO HAPLOTIPO DEL GEN FAS LIGADO A UNA MUTACIÓN FUNDADORA EN SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO AUTOINMUNE EN ARGENTINA ESTÁ PRESENTE EN POBLACIONES CON ANCESTRALIDAD ABORIGEN

Simesen De Bielke, M.¹, Yancoski, J.¹, Rocco, C.¹, Bravi, C.², Bailliet, G.², Danielian, S.¹

Hospital de Pediatría J.P. Garrahan¹ Laboratorio de Genética Molecular Poblacional, IMBICE²

Mutaciones en el gen *FAS* son la causa más común de Síndrome Linfoproliferativo y Autoinmune (ALPS). En 4 familias no relacionadas ALPS-FAS con mutación C107Y demostramos, mediante análisis de 10 sitios polimórficos, un evento fundador generado hace aproximadamente 350 años. Seis polimorfismos (SNPs) intragénicos revelaron un haplotipo distintivo (GTATCC) que se segrega con C107Y, no detectado en nuestro grupo control ni en un reporte internacional, en 200 y 300 cromosomas respectivamente. La sobrerrepresentación de C107Y en Argentina, asociada con este haplotipo único, nos llevó a evaluar la presencia del mismo en comunidades de ancestralidad nativa. Estudiamos 324 muestras de poblaciones del norte argentino que poseen más del 80% de haplogrupos amerindios en ADN mitocondrial. Se utilizaron análisis con enzimas de restricción, PCR, secuenciación y clonado en bacterias de los productos de amplificación. El único SNP, c.528(+46)c>t, que presenta en el haplotipo el alelo minoritario se estudió como screening y permitió descartar 176 de las 324 muestras. El alelo t de este SNP fue hallado en alta frecuencia en amerindios (media: 26.54%) en comparación con caucásicos (media: 10.3%). El análisis completo en las 148 muestras restantes, realizado en forma secuencial, arrojó la probabilidad de que 78 muestras puedan contener GTATCC. De ellas, 36 fueron descartadas mediante clonado quedando un 13% del total de muestras, heterocigotas en el SNP 528, con probabilidad de contenerlo (haplotipos desapareados debido a la gran extensión del mismo, 22.6Kb). En una muestra, homocigota t/t en SNP 528, fue posible confirmar la presencia del alelo GTATCC, en ausencia de la mutación C107Y. Este individuo presenta además ancestralidad aborígen a nivel de haplogrupos en cromosoma Y. Nuestro trabajo demuestra que el SNP 528 refleja diferencias étnicas en población americana, y asocia el evento fundador de C107Y de nuestros pacientes ALPS a población argentina nativa.

170. (705) SÍNDROME DE HIPER IGM: EXPERIENCIA DE UN CENTRO PEDIÁTRICO

Aquiri Gómez, S., Nievas, E., Roy, A., Danielian, S., Rossi, J., Oleastro, M.

Hospital Garrahan

El síndrome de hiper IgM (HIGM) comprende una serie de defectos génicos (*CD40L*, *CD40*, *AID* Y *UNG*) caracterizado por la ausencia o disminución de IgG e IgA, niveles normales o aumentados de IgM, deficiente formación de anticuerpos y principalmente, infecciones bacterianas recurrentes. Describimos las características clínico inmunológicas de pacientes con HIGM seguidos en nuestro centro desde 1987 a julio de 2012. Quince paciente de 12 familias fueron diagnosticados (13 varones, 2 mujeres). La edad media a la primera manifestación clínica fue de 0,75 años (r0,08-2,16) la primera manifestación fue infección respiratoria baja en 9/15 pacientes. La edad media al diagnóstico 4,31 años (r0,25-18). Ocho de 15 desarrollaron infección intestinal (*Microsporidium*, *Histoplasmosis* y *Giardiasis*), 8/14 infección respiratoria alta. Un paciente presentó infección por *Pneumocistis jirovecii*, *Parvovirus B19*, AHA combs positiva y artritis, al igual que su hermano desarrolló infección por *Histoplasma capsulatum*. Encefalopatía progresiva sin aislamiento

microbiológico se presentó en un caso. En 5 pacientes el nivel de IgA sérica se encontró dentro de rangos normales. Neutropenia episódica fue observada en 5 casos. Ningún paciente desarrolló enfermedad biliar por *Cryptosporidium ni* neoplasias. En 8 familias se documentó mutaciones en *CD40L* y en 4 mutaciones *AID*. Trece reciben regularmente suplemento con gammaglobulina endovenosa, ningún paciente recibió trasplante de células hematopoyéticas alogénicas. De 13 pacientes que fueron seguidos, sólo falleció el que presentó encefalopatía progresiva. En nuestra casuística se observa una baja incidencia de las manifestaciones comúnmente referidas en este síndrome como son la enfermedad biliar, la infección por *Cryptosporidium* o por *Parvovirus B19*. El hallazgo de valores normales de IgA sérica puede desorientar la presunción diagnóstica. A pesar de encontrarse sin tratamiento supletorio 2 pacientes (hermanos) no desarrollan infecciones.

171. (720) ENCEFALOPATÍA AGUDA PROGRESIVA EN PACIENTE CON DIAGNÓSTICO DE AGAMAGLOBULINEMIA LIGADA AL X E INFECCIÓN POR VIH: REPORTE DE UN CASO

Longoni, N., Mecikovsky, D., Czornyj, L., Favale, A., Nievas, E., Oleastro, M.

Hospital J. P. Garrahan

Agamaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX) es una inmunodeficiencia primaria que afecta la diferenciación del linfocito B (LB) y condiciona disminución de inmunoglobulinas séricas y LB circulantes generando infecciones purulentas y en ocasiones compromiso crónico del SNC por enterovirus. El virus HIV puede afectar SNC inicialmente por su carácter neurotrópico. El tratamiento de alta eficacia reduce 50% el riesgo de tal complicación. Reportamos un paciente con ALX y SIDA que desarrolla encefalopatía aguda progresiva de etiología no definida. Varón con diagnóstico a los 2 años de ALX y SIDA C1 (transmisión transfusional sin compromiso neurológico) por lo que recibe gammaglobulina EV mensual, profilaxis antibiótica y antirretrovirales, manteniendo dosajes adecuados de IgG residual y recuentos de CD4 superiores a 25% con cargas virales indetectables. A los 9 años presenta cambios de conducta, fracaso escolar y convulsiones. En LCR evidenció ligera pleocitosis mononuclear con microbiología ampliada (incluyendo neurovirus) negativa; la RMN cerebral mostró lesiones hipointensas en T1 e hiperintensas en T2 en sustancia blanca bifronto-temporal. A los 13 años presenta progresión de deterioro neurológico. LCR no muestra alteraciones citofísicoquímicas. Búsqueda de enterovirus, JC, BK, herpes, varicela, CMV, EBV, gérmenes comunes y hongos: negativa. RMN cerebral: progresión de lesiones y biopsia cerebral: signos de encefalitis por infiltración linfocítica T, de probable etiología viral no vinculable a HIV. La microscopía electrónica no detectó partículas virales. Ante sospecha de etiología viral realizó tratamiento con GGEV 900mg/kg/día por 21 días consecutivos sin mejoría. Actualmente presenta retraso mental moderado (test de WISCIII) y conductas agresivas. Es el primer caso en nuestro centro de asociación de ALX y HIV, manifestado con leucodistrofia, y que pese a búsqueda microbiológica exhaustiva no pudo demostrar etiología, con progresión del cuadro a pesar del tratamiento instaurado.

172. (755) LA DEPLECIÓN DE CÉLULAS T REGULADORIAS IN VIVO INCREMENTA LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE PROSTATITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL EN DIFERENTES CEPAS DE ANIMALES

Breser, M.¹, Lino, A.², Mohr, E.², Motrich, R.¹, Sanchez, L.¹, Demengeot, J.², Rivero, V.¹

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. CIBICI-CONICET¹ Instituto Gulbenkian de Ciência. Oeiras, Portugal²

La Prostatitis Autoinmune Experimental (PAE) es un modelo válido para el estudio de la Prostatitis Crónica No Bacteriana. Previamente, reportamos diferencias de susceptibilidad a PAE entre las cepas NOD, C57/BL6 y Balb/c. Dado que los linfocitos T regulatorios Foxp3⁺ (Treg) tienen un rol central en el mantenimiento de la tolerancia, en el presente trabajo se analizó si la

diferencia en susceptibilidades se relaciona con la frecuencia de Treg. Se encontró que ratones no inmunizados de las tres cepas presentaban cantidades similares de Treg en órganos linfáticos secundarios. Luego de la inmunización con antígenos prostáticos, no se encontraron diferencias entre la cantidad de Treg aunque sí entre la cantidad de células T efectoras (Tef, CD4⁺CD44⁺CD62L⁻) y la susceptibilidad a PAE. Al analizar la relación de Treg/Tef, la misma fue mayor en ratones Balb/c comparados con ratones NOD ($p \leq 0,005$). Para evaluar si la relación Treg/Tef en el momento de inducción era importante para conferir resistencia a PAE, se realizó un tratamiento *in vivo* un día previo a la inmunización utilizando el anticuerpo monoclonal (PC61) que depleta Treg. En el día 24, los animales fueron sacrificados y se evaluó cantidad de Treg, Tef, expresión de receptores de quimiocinas, citoquinas secretadas e infiltración prostática. Se observó un incremento significativo de células Tef principalmente productoras de IFN γ e IL17 expresando los receptores de migración asociados a Th1 (CXCR3 y CCR5) en las 3 cepas de animales depletadas de Treg, lo que correlacionó directamente con una mayor infiltración en el órgano blanco ($P \leq 0,001$). Estos resultados demuestran que la relación Treg/Tef es fundamental en el desarrollo de prostatitis autoinmune y que niveles disminuidos de Treg en la fase inductora de la enfermedad hacen que una cepa resistente a PAE como la Balb/c logre desarrollar una cantidad suficiente de Tef Th1 capaces de infiltrar y dañar la glándula prostática.

173. (763) REGISTRO DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS EN UN HOSPITAL DE NIÑOS RICARDO GUTIÉRREZ

Seminario, A.¹, Moreira, I.², Diaz Balve, D.², Gomez Raccio, A.², Di Giovanni, D.², Bezrodnik, L.²
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez¹ Laboratorios Hemoderivados UNC²

Introducción: Las Inmunodeficiencias Primarias (IDP) son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas, donde esta afectado 1 ó más componentes del sistema inmune. Con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio. Se han reportado más de 180 de IDP. **Objetivo:** Reportar la prevalencia de IDP, en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (HNRG). **Población y Métodos:** Se incluyeron los pacientes con IDP seguidos en el HNRG, desde 1990 hasta la fecha. Se realizó el análisis retrospectivo de sus Historias clínicas. Los datos son registrados en el registro de la sociedad latinoamericana de inmunodeficiencias (LASID) y en Registro para la Fundación Jeffrey Modell. **Resultados:** En el año 1990 se creó el grupo de Inmunología en el HNRG. Hasta 2007 se habían registrado 443 pacientes con IDP. En el año 2010 el número de diagnosticados llegó a 777. Actualmente tenemos registrados 974 pacientes con IDP. Para la clasificación de las IDP utilizamos la última clasificación de la Unión Internacional de la Sociedad de Inmunología del año 2011. El 8% corresponden a Inmunodeficiencias Combinadas, el 5,6% síndromes con Inmunodeficiencias bien definidas, el 74% Deficiencias de Anticuerpos (DA), 2,6% Síndromes con Disregulación, 2% Defectos del Fagocito, 1,4% Defectos de la Inmunidad Innata, 3,5% Síndromes Autoinflamatorios y 2,5% Defectos del Complemento. Tal como reportan otros centros, las DA son las más frecuentes dentro de las IDP. **Conclusiones:** El aumento en el número de casos diagnosticados, demuestra que estas enfermedades no son tan raras como se creía. El registro de las IDP permite conocer la prevalencia de IDP en nuestra región y aumentar la difusión de estas para fomentar el diagnóstico temprano y mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes.

174. (772) CARACTERIZACION DE LINEAS CELULARES ESPECIFICAS CONTRA EL AUTOANTIGENO PSBP EN UN MODELO DE PROSTATITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

Altamirano, A., Breser, M., Sánchez, L., Motrich, R., Rivero, V.
CIBICI-CONICET

El modelo experimental de prostatitis Autoinmune (PAE), puede ser considerado válido para la enfermedad humana

Prostatitis Crónica No Bacteriana. Distintas cepas de ratones inmunizados con antígenos prostáticos en CFA son capaces de desarrollar respuesta de LT específicos contra el principal autoantígeno descrito Prostataína (PSBP); pero sólo algunas cepas muestran infiltración y daño en próstata. Hemos reportado además que ratones deficientes en IFN γ son resistentes a PAE. En este trabajo desarrollamos líneas celulares específicas para PSBP derivadas de ratones NOD, Balb/c y NOD-IFN γ ^{-/-} previamente inmunizados con antígenos prostáticos en CFA. Para obtener dichas líneas se realizaron cultivos de esplenocitos con ciclos alternados de estimulación con células *feeder* y PSBP o PSBP/IL2. Al finalizar los ciclos el análisis de citoquinas producidas por la línea NOD mostró niveles elevados de IFN γ , que aumentaron a lo largo de los ciclos de estimulación (ELISA), mientras que los niveles de IL17, IL10, IL5 y TGF β mostraron una tendencia opuesta. Sobrenadantes de cultivo de la línea NOD-IFN γ ^{-/-} mostraron elevados niveles de IL17, IL5 y disminuidos de TGF β e IL10. En la línea Balb/c se observaron niveles reducidos de todas estas citoquinas y sostenidos a lo largo de los ciclos. Por citometría de flujo, se observó que las células de las tres líneas presentaron un fenotipo efector CD62L^{low}CD44^{hi}. En la línea NOD se encontraron importantes cantidades de células CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺ y menor frecuencia de CD3⁺CD4⁺IL17⁺. Las células de la línea NOD-IFN γ ^{-/-} fueron principalmente CD3⁺CD4⁺IL17⁺, mientras que las células de la línea Balb/c presentaron bajas frecuencias de células CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺ e IL17⁺. Nuestros resultados demuestran que el perfil de células específicas es diferente en las líneas provenientes de ratones con distinta susceptibilidad a PAE., asociándose con un fenotipo Th1 la cepa susceptible NOD, mientras que la cepa no susceptible NOD-IFN γ ^{-/-} genera un fenotipo Th17.

175. (775) FALLA DE RESPUESTA ANTICORPORA FRENTE A ANTIGENOS POLISACARIDOS (FRPS): REPORTE DE 14 PACIENTES DE CENTRO ÚNICO

Cabanillas, D., Regairaz, L., Lasarte, P., Pérez, N.
Hospital de Niños Sor María Ludovica

Introducción: La FRPS es una inmunodeficiencia primaria (IDP) humoral reportada en pacientes con infecciones respiratorias recurrentes. Su prevalencia en niños y jóvenes es poco conocida. **Objetivo:** describir una cohorte de pacientes (p) con FRPS diagnosticados y seguidos en nuestro centro entre 1998 y 2012. **Materiales y Métodos:** trabajo retrospectivo basado en la revisión de historias clínicas. Se definió FRPS a pacientes mayores de 2 años con infecciones recurrentes, dosaje de Inmunoglobulinas GAME normal, y anticuerpos antineumococo < 113 mg/l medidos 4-6 semanas luego de vacuna polisacárida de 23 serotipos, sin evidencia de otra IDP y con serología HIV negativa. **Resultados:** 14p (8 mujeres, 57%) fueron identificados. La edad media al diagnóstico fue 8,07 años (r: 2,9-20). La edad de inicio de los síntomas fue 3,08 años (r: 0,2-13). Todos presentaron infecciones recurrentes: bronquitis (n: 85 en 10p), neumonía (n: 42 en 11p), OMA (n: 9 en 3p), Infecciones cutáneas 5p, sepsis 3p, meningitis a neumococo 1p. Al momento de primera consulta 93% tenían obstrucción bronquial recurrente. 4/10p evaluados presentan bronquiectasias. 12p (86%) iniciaron antibiótico profiláctico (trimetoprima sulfametoxazol 5 mg/kg/día o amoxicilina 20 mg/kg/día). 3/12p requirieron gamaglobulina por persistir con síntomas. 2p perdieron el seguimiento. Sólo se registran eventos de bronquitis (n: 15 en 9p) y neumonía (n: 6 en 3p) a pesar del tratamiento adecuado. Actualmente todos vivos con edad media de 11,75 años (r: 3,8-33). **Conclusiones:** Infecciones severas y recurrentes fueron observadas en pacientes con FRPS, con daño de órgano blanco observado en 30% (bronquiectasias). Las infecciones más frecuentes fueron neumonía y bronquitis. Se observa una demora diagnóstica de 5 años, probablemente dada por la normalidad de las inmunoglobulinas. El tratamiento con antibióticos y/o gamaglobulina parece disminuir el número de infecciones.

176. (782) BRONQUIOLITIS FOLICULAR Y FENOTIPO ATÍPICO ASOCIADO CON DEFICIENCIA DE CD25

Caldirola, M., García, A., Moreira, I., Seminario, G., Di Giovanni, D., Gaillard, M., Bezrodnik, L.
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Introducción: La deficiencia de CD25 resulta en autoinmunidad, enteropatía, linfoproliferación y dermatitis atópica severa. **Objetivo:** Reporte de un caso: paciente de 5 años con fenotipo atípico de deficiencia de CD25. **Métodos:** Dosaje de inmunoglobulinas séricas medidas por nefelometría. Poblaciones linfocitarias en sangre periférica: linfocitos T naïvè (LTn) y LT memoria (LTm), linfocitos B naïvè (LBn) y linfocitos B memoria (LBm) y células natural killer (NK) determinadas citometría de flujo. Linfocitos T reguladores (Tregs) (CD4CD25FOXP3 +). Ensayo de linfoproliferación: estimulación de LT con fitohemaglutinina (PHA). Los linfocitos estimulados con antiCD3 en presencia de IL-2 fueron marcados con anticuerpos anti CD69, CD25, CD122 y CD132. Los anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA) fueron medidos por inmunofluorescencia. **Resultado:** Niña adoptada de cinco años de edad con dermatitis atópica severa, diarrea crónica desde el primer mes de vida, infecciones respiratorias y varicela. A los 4 años de edad: neumonía de mala evolución con necesidad de oxigenoterapia permanente. Biopsia de pulmón: bronquiolitis folicular con hiperplasia de linfocitos. Evaluación inmunológica: hipergamaglobulinemia, deficiencia de IgG4, falla de respuesta a polisacáridos, ANA positivos en título alto (patrón moteado) con ANCA-c positivo. Recuentos normales de linfocitos con LBm y Treg bajos. Los linfocitos CD4+ activados, mostraron expresión de CD69 pero la sobreexpresión de CD25. Linfoproliferación: normal. Estudio molecular: Mutación missense homocigota en la subunidad CD25 del receptor de IL-2:(c. 122 a>c; p. Y41S). Se comenzó la inmunosupresión con pulsos de solumedrol y mofetil micofenolato más profilaxis antibiótica. Su condición mejoró, por lo que se suspendió la oxígeno terapia. Actualmente a la espera de trasplante de células madre. **Conclusión:** Se ha descrito el caso de una paciente deficiente en CD25 con fenotipo inusual sin evidencia de endocrinopatías.

177. (785) ALTERACIONES DE LA VÍA DEL COMPLEMENTO: SIEMPRE C3 DISMINUIDO SIGNIFICA CONSUMO?

Rodríguez Broggi, G., Ginaca, A., Dominguez, M., Comas, D., Bezrodnik, L.
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

El C3 es el componente crucial en la activación de todas las cascadas del sistema complemento. Su deficiencia o disminución puede predisponer a infecciones por gérmenes capsulados, glomerulonefritis o enfermedades autoinmunes. **Objetivo:** Identificar alteraciones del sistema complemento en pacientes con C3 persistentemente bajo y C4 normal. **Materiales y métodos:** se evaluaron 14 niños (entre 3 y 16 años) que concurren al servicio de Inmunología con infecciones recurrentes, glomerulonefritis y/o enfermedades autoinmunes con C3 bajo persistente y C4 normal. Estrategia diagnóstica: 1°) cuantificación de C3 y C4 por nefelometría; funcionalidad de vía alterna (AH50) y clásica (CH50) por ensayos hemolíticos. 2°) investigación de actividad de factor nefrítico y productos de degradación de C3 (PDC3) por inmunofijación; determinación de factor H, factor I y factor B por inmunodifusión radial. 3°) estudio de familiares de primer grado. **Resultados:** Tres pacientes mostraron actividad de factor nefrítico y presencia de PDC3 in vivo; con una concentración sérica media de C3= 14mg/dl, CH50 y AH50 marcadamente disminuidos. Tres pacientes con deficiencia de factor I, presentando valor promedio de C3=55mg/dl, Factor B no dosable, CH50 normal y AH50 ausente. Ocho pacientes de 4 familias presentaron deficiencia parcial de C3 con una concentración media de 58mg/dl, AH50 normal y CH50 normal o ligeramente disminuido; padre o madre de cada familia mostraron el mismo perfil; todos ellos con PDC3 y factor nefrítico negativos. **Conclusión:** La disminución de la proteína C3 del complemento puede ser causada por distintas alteraciones llevando al paciente a síntomas severos. Utilizando una adecuada estrategia es posible identificar estas alteraciones y lograr un adecuado diagnóstico para instaurar la terapéutica adecuada que mejore la calidad de vida.

178. (789) ALTERACIONES DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN PACIENTES CON HIPOGAMAGLOBULINEMIA TRANSITORIA DE LA INFANCIA

Eснаоla Azcoiti, M., Caldirola, M., Seminario, A., Gaillard, M., Di Giovanni, D., Gómez Raccio, A., Bezrodnik, L., Hail, F.
Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez

Introducción: La hipogamaglobulinemia transitoria de la infancia (HTI) es una deficiencia cuantitativa de anticuerpos en niños mayores de 6 meses, siendo una de las consultas inmunológicas más frecuentes. Es conocida la utilidad de alteraciones del compartimento B (CB) en otra deficiencia humoral, como la inmunodeficiencia común variable (IDCV) para clasificar diferentes subgrupos clínicos. **Objetivo: 1)** Evaluar el CB en pacientes (pts) con HTI. **2)** Compararlo con las alteraciones del linfocito B de pts pediátricos con IDCV. **Materiales y Métodos:** Estudio observacional de 44 pts con diagnóstico de HTI (WHO-IUIS) y 21 pts con diagnóstico de IDCV (ESID) entre 6 meses y 13 años. El estudio del CB se realizó por citometría de flujo (FACScalibur BD). LB memoria totales (LBm)(CD27+), vírgenes (CD27-IgD+IgM+), memoria pre-switched (CD27+IgD+IgM+), memoria post-switched (CD27+ IgD- IgM-), LB transicional(LBT) CD24high CD38high. Los resultados fueron comparados con controles propios(C) del laboratorio para cada grupo etario, y divididos en dos grupos: **G1** (n=20) 6 meses a 4 años y **G2** (n=24) entre 4 y 13 años. Los dosajes de Igs (G,A,M) fueron realizados por nefelometría(IMMAGE Beckman Coulter). **Resultados:** El 80% de los pts presentaron un aumento de los LBT, significativo sólo en G2:[mediana (p25-p75)] **G2:**11(8,25-23,00) vs **C:**7(5,65-10,00) (p=0.02). G2 no presentó alteraciones en el subset de memoria. En G1, no se observaron alteraciones en el CB respecto de los controles. El aumento de LBT en G2 fue comparable al encontrado en los pts con IDCV 10,8 (p=0,7894). **Discusión:** En los niños menores de 4 años, no se observaron alteraciones respecto de los C. La alteración preponderante en los pacientes HTI mayores de 4 años fue el aumento de los LBT, con los LBm conservados. Siendo que los LBT representan una población de emigrantes tempranos de médula ósea, su aumento en sangre periférica en este grupo de pacientes, podría relacionarse con la inmadurez del CB más allá de los 4 años.

179. (791) SÍNDROME AUTOINFLAMATORIOS: FIEBRE MEDITERRANEA FAMILIAR ENFERMEDAD DE HERENCIA RECESIVA?

Díaz Balve, D., Seminario, A., Moreira, I., Gomez Raccio, A., Di Giovanni, D., Danelian, S., Bezrodnik, L.
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Introducción: los síndromes Autoinflamatorios (SA), se caracterizan por episodios recurrentes de inflamación generalizada de causa no infecciosa. La fiebre mediterránea familiar (fmf) es la más común de los SA. **Objetivo:** Demostrar pacientes con fmf que presentan mutaciones únicas heterocigotas y con cuadro clínico típico, es suficiente para iniciar tratamiento con colchicina. **MATERIAL Y METODOS:** Estudio retrospectivo de 36 pacientes con fiebre periódica, en un servicio de inmunología pediátrica. **RESULTADO:** 36 Pacientes (p) fueron evaluados en nuestro servicio por episodios de fiebre recurrente. 10 p fueron FMF, 1 p Síndrome de Hiper Ig D, 1 p enfermedad inflamatoria multisistémica de comienzo neonatal, 1 p con diagnóstico probable Síndrome de fiebre periódica asociada a receptor 1 del factor de necrosis tumoral y 23p Síndrome de fiebre Periódica con aftas, estomatitis, faringitis y adenitis. En los 10 p con FMF se realizaron los estudios de biología molecular en el gen MEFV, encontrándose 3 pacientes con mutaciones homocigotas o 2 mutaciones heterocigotas; sin embargo 7 de nuestros pacientes presentaban solo una mutación para el gen MEFV. Los 10 pacientes con FMF presentaban clínica compatible por lo cual todos iniciaron tratamiento con colchicina, a dosis habitual de 1mg/día. Todos presentaron buena evolución, excepto una paciente requirió por su compromiso clínico aumentar dosis diaria a 2 mg/día. **CONCLUSIONES:** En aquellos países donde la prevalencia de fmf es baja, aquellos pacientes que presenten cuadro clínico compatible con FMF, presentando solo

una mutación heterocigota es suficiente para iniciar tratamiento con colchicina.

180. (806) TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (TCHP) EN INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS (EXLUÍDAS LAS COMBINADAS SEVERAS): EVOLUCIÓN Y SEGUIMIENTO EN UN CENTRO PEDIÁTRICO

Nievas, E., Rossi, J., Bernasconi, A., Pérez, L., Roy, A., Goris, V., Prieto, E., Danielian, S., Figueroa, C., Staciuk, R., Oleastro, M.
Hospital Garrahan

El TCHP alogénico sigue siendo el único tratamiento curativo para muchas Inmunodeficiencias Primarias (IDP). Analizamos retrospectivamente la evolución de paciente (ptes) pediátricos con IDP (excluidas las ID Combinadas Severas) que recibieron TCHP alogénico entre 1995 y 2012 en nuestra institución. De 20 ptes trasplantados, se analizan los datos disponibles de 18 (7 mujeres y 11 varones) Diagnósticos: Wiskott Aldrich: 5 ptes, Inmunodeficiencias con Albinismo Parcial: 5 ptes, LHHF: 3 ptes, ALPS: 1pte, EGC: 1pte, IPEX: 1pte, XLP: 1 pte e Hipoplasia Cartílago Pelo: 1 pte. Edad media al trasplante: 40 meses (r 2-161). Previo al TCHP 6 ptes presentaron infecciones recurrentes, 3 enfermedad pulmonar crónica, 3 malnutrición y 6 compromiso del SNC. La fuente de CHP fue médula ósea: 14 ptes, sangre de cordón umbilical: 3 ptes y movilizado de sangre periférica: 1 pte. Donantes: 11 familiares y 7 no emparentados. Compatibilidad: 15 histoidénticos, 2 con disparidad HLA de 1-2 antígenos y 1 haploidéntico. Preparación mieloablata: 11 ptes y no mieloablata: 7. Complicaciones: Infecciones significativas en todos, Enfermedad injerto vs huésped aguda: 9 ptes y crónica: 5 ptes. Venoclusión hepática: 5 ptes. Catorce ptes desarrollaron preñimiento total y 3 parcial. La sobrevida fue del 78%. La media de seguimiento es de 40,87 meses (r 0,6-168). Las causas de muerte fueron: Infección viral: 2 ptes, Síndrome Linfoproliferativo: 1 pte y hemorragia pulmonar: 1 pte. Todos fallecieron antes de los 6 meses post TCHP (media de 67,2 días: r51-126). Nuestro grupo con una media de seguimiento mayor a los dos años muestra un porcentaje de sobrevida en coincidencia con la literatura. Si bien se trata de un grupo pequeño de pacientes no observamos asociación significativa entre la sobrevida, el compromiso pulmonar y malnutrición pre trasplante.

181. (812) FAS LIGANDO SOLUBLE EN SÍNDROME LINFO-PROLIFERATIVO AUTOINMUNE

Carabajal, P., Sardaños, J., Gaillard, M., García, A., Di Giovanni, D., Filardi, L., Bezrodnik, L.
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

El síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) se caracteriza por esplenomegalia, adenomegalias no malignas, autoinmunidad y expansión de linfocitos T $\alpha\beta$ Doble negativos >2% (DN). Es causado por defectos en genes de la apoptosis linfocitaria. El incremento del Fas ligando soluble (sFASL) es uno de los criterios secundarios reconocidos que contribuyen al diagnóstico de ALPS. **Objetivo:** evaluar sFASL en pacientes pediátricos con sospecha de ALPS junto a otros parámetros inmunológicos característicos. **Material y Métodos:** 30 niños, rango de edad: 2 a 19 años, 15 mujeres, con manifestaciones clínicas presuntivas de ALPS (esplenomegalia, adenomegalias, citopenias autoinmunes). Se determinó sFASL en suero de los pacientes por Enzimoimmunoensayo (R&D Systems). Se procesaron sueros de 20 niños considerados sanos según encuesta de salud que contempla criterios de exclusión para la verificación del rango de referencia (VR: 40-145 pg/ml). Inmunofenotipo con LT $\alpha\beta$ + CD4- CD8- (DN) por citometría de flujo. **Resultados:** La verificación del intervalo de referencia arrojó un 95% de los datos dentro del rango establecido como criterio de aceptación. De 30 ptes, 14 (46.6%) presentaron sFASL en valores > 145 pg/ml. De estos, 3 tuvieron sFASL entre 576- >1000 pg/ml y DN > 5%, correspondiendo a ALPS definitivos por mutaciones en gen FAS; 6 ptes con sFASL entre 165- 463 pg/ml y DN 2.4 a 5.8%, correspondieron a ALPS probables. Los 5 ptes restantes tenían sFASL entre 162- 363 pg/ml y DN 2.4 a 3.6% en 3/5 y < 2% en 2/5,

con alguna característica clínica. En 16 ptes, sFASL fue < 145 pg/ml, 4/16 con DN >2%. **Conclusiones:** En nuestra población sFASL demostró ser un biomarcador sensible para ALPS. En pacientes con criterios aún incompletos para ALPS y sFASL elevado sería aconsejable buscar el defecto molecular o funcional. El ensayo de verificación del intervalo de referencia fue aceptado, con lo cual el intervalo propuesto es adecuado para nuestra población.

182. (814) LINFOPENIA CD4 IDIOPÁTICA. TRATAMIENTO CON INTERLEUQUINA 2 RECOMBINANTE

Comas, D., Seminario, G., Gaillard, M., Bezrodnik, L.
Hospital Gutiérrez

Linfocitopenia CD4 idiopática (ICL) es un síndrome raro y heterogéneo caracterizado por una inexplicable y persistente reducción en el recuento linfocitos CD3+ CD4+ (<300 cel. / μ L ó <20% del total de células T (CD3+)) en ausencia de infección por HIV o causas conocidas de inmunodeficiencias primaria. **Objetivo:** Observar el efecto inmunomodulador del tratamiento con Interleuquina 2 recombinante (rIL2) en un paciente con ICL. **Caso clínico:** Varón heterosexual, 49 años de edad, con infecciones oportunistas (Histoplasmosis, Herpes Zoster y Papillomavirus). Serologías para HIV I/II y HTLV negativas, CD3+CD4+: 120-180 cel. /mm³, sobreexpresión de CD95, aumento del recuento de CD45RO+ CD95+ CD4+CD3+ y bajo número de CD45RA+CD4+CD3+, respuesta proliferativa alterada frente a mitógenos y antígenos específicos. El paciente recibió tratamiento con rIL2 en dos ciclos con intervalos de un año: 1er ciclo: 18 meses de duración (9 UI, 0.4 UI c/12 horas, 4 días); 2do ciclo: 6 meses seguidos, reiniciando 6 meses mas tarde, cada dos meses, igual dosis. Evaluación por citometría de flujo, del inmunofenotipo y proliferación celular, usando un citómetro FACSCalibur. Análisis de subpoblaciones celulares: T (CD3+), T helpers (CD3+CD4+), T citóxicas (CD3+CD8+). Valoración de la respuesta proliferativa mediante la incorporación CFSE. Dosaje de inmunoglobulinas por nefelometría cinética (Beckman-Coulter). Después del tratamiento con rIL2 mejoró el recuento de CD45RA+CD4+CD3+ : 39% (VN: 23+/-14%), CD45RO+ CD95+ CD4+CD3+ : 57% (VN: VN: 61+/-12%). La respuesta al segundo ciclo rIL2 ha aumentado y mantenido los recuentos de CD4: 26%, 545 cel./mm³. Los dosajes de inmunoglobulinas séricas, arrojaron valores ligeramente disminuidos: IgG: 757 mg/dl, IgA: 50 mg/dl, IgM: 102 mgr/dl. **Conclusión:** La rIL2 reduciría la expresión de CD95 sobre las células CD3+CD4+, llevando así a un aumento en el número absoluto de CD4. Después de 4 años, el paciente se encuentra en un buen estado de salud.

183. (822) ATAXIA TELANGIECTASIA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

Fortunati, D., Nievas, E., Rossi, J., Bernasconi, A., Roy, A., Danielian, S., Oleastro, M.
Hospital Garrahan

Ataxia Telangiectasia (AT) es una enfermedad autosómica recesiva causada por defectos en la proteína ATM. Se caracteriza por ataxia cerebelosa, telangiectasias oculocutáneas, inmunodeficiencia combinada y alta incidencia de neoplasias. Describiremos las características clínicas e inmunológicas de pacientes (p) pediátricos con AT (según criterios ESID) diagnosticados por nuestro servicio entre 1987 y 2012. **Resultados.** Se identificaron 46 p (41 familias). La ataxia cerebelosa fue la primera manifestación en 27 p. La edad media al diagnóstico fue de 5,86 años (r 1,83-13,58). El 89 % presentó infecciones, siendo el 65,2 % en vías aéreas inferiores. El aislamiento más común fue *Pseudomonas aeruginosa* en secreciones nasofaríngeas. Se documentó: deficiencia de IgA: 16/46, perfil Hiper IgM: 13/46, panhipogamaglobulinemia: 4/46, deficiencia de anticuerpos contra antígenos polisacáridos: 11/36, contra proteicos: 4/40, linfopenia B: 33/44, linfopenia T: 37/46, deficiente proliferación *in vitro* ante mitógenos: 21/44 y ante antígenos: 19/32. Rupturas cromosómicas inducidas por radiación fueron evidenciadas en 16 p evaluados. De los 7 p que desarrollaron neoplasias (3 casos Linfoma de Hodgkin), 6 recibieron quimioterapia adaptada y 3 de ellos remitieron. No se observaron

complicaciones post vacunales con gérmenes vivos. Recibieron GGEV supletoria 30 p y profilaxis antibiótica 39 p. Fallecieron 11 p antes de los 18 años (edad media 12,45 años) principalmente por insuficiencia respiratoria. Conclusiones: La edad al diagnóstico fue extremadamente tardía. Tuvimos un alto porcentaje de rescate de *Pseudomona* en secreciones a diferencia de otras series. Al igual que otros reportes no observamos complicaciones post vacunales. Protocolos de quimioterapia modificados son viables en estos pacientes. El suplemento con GGEV y la antibióticoterapia poco puede prevenir la enfermedad pulmonar crónica, principal causa de muerte en nuestra serie.

REPRODUCCIÓN 2

184. (165) ROL CRÍTICO DE LA PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) Y DE SU RECEPTOR TIPO 2 (EP2) EN LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULUS (ECC) EN MONAS RHESUS

Peluffo, M¹²; Murphy, M²; Zelinski, M²; Lindenthal, B³; Stouffer, R²⁴; Hennebold, J²⁴

CEDIE-CONICET¹ Division of Reproductive Sciences, Oregon National Primate Research Center (ONPRC), EE.UU.² Global Drug Discovery, Bayer Schering Pharma AG, Alemania³ Department of Obstetrics and Gynecology, Oregon Health & Science University (OHSU), EE.UU.⁴

Antes de la ovulación el pico de LH desencadena la ECC, la cual implica la pérdida de contacto entre las células del cumulus (CC) y la formación de una matriz extracelular rica en ácido hialurónico (AH), causando una expansión en el área del complejo ovocito células del cumulus (COC). Este proceso es indispensable para que el ovocito ovulado, pueda ser eventualmente penetrado por el espermatozoide. El objetivo fue determinar el rol de la PGE2 en la ECC en monas Rhesus in vitro y comparar sus efectos respecto al de las gonadotropinas (G). Se obtuvieron COCs (n=3-6/ tratamiento; c/experimento/3-4) a partir de monas adultas sometidas a tratamientos de estimulación y cultivados en medio TALP conteniendo: a) 5% suero de mono (MS); b) MS+FSH+LH (100 ng/ml, c/u); c) MS+PGE2 (500 ng/ml). Se analizó la variación en el área de los COCs a distintos tiempos, observándose que el control (-) (MS) no ocasionó ECC. Las G promovieron la ECC de manera ambigua mientras que, la PGE2 indujo la ECC de modo sólido. Luego se evaluó la ECC de forma más específica desarrollando un método inmunofluorescente para detectar AH en el COC y se agregaron 2 grupos adicionales: d) FSH y e) LH. En el grupo con MS, la marca de AH fue mínima o inexistente. Ninguno de los grupos con G arrojó resultados uniformes y la marca de AH se observó sólo en la periferia de los COCs. En cambio, PGE2 incrementó los niveles de AH en todo el COC en todos los ensayos. Asimismo, un grupo f) conteniendo un antagonista específico del EP2 (ZK888-15µM) en presencia de PGE2 fue incluido para analizar si la señalización de PGE2 era a través de EP2 y el AMPc fue evaluado para validar su inhibición. Se observó que el ZK888 bloqueó tanto la síntesis del AH como los niveles de AMPc (p<0.05) inducidos por PGE2. Estos resultados demuestran por primera vez en primates que mientras las G impactan mínimamente en la ECC, la PGE2 induce la ECC y la estimulación de AH a través del EP2, sugiriendo un rol crítico de la PGE2 en la ECC.

185. (289) PARTICIPACIÓN DEL CALCIO Y EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA EXPOSICIÓN TRANSITORIA DE FOSFADILSERINA EN OVOCITOS ACTIVADOS

Curia, C.¹; Stein, P.²; Schultz, R.²; Cuasnicu, P.¹; Cohen, D.¹ *Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Departamento de Biología, Universidad de Pensilvania, USA²*

La exposición de fosfatidilserina (PS) es un evento clave para distintos procesos celulares. Recientemente demostramos que PS también se expone transitoriamente en ovocitos de ratón activados por fertilización o partenogénesis. En este trabajo estudiamos el rol del citoesqueleto de actina y del calcio, ambos involucrados en la activación del ovocito, en la exposición de

PS. Para ello, los ovocitos fueron tratados con CCD (citocalasina D, inhibidor de polimerización de actina) y activados con SrCl₂. evaluándose la exposición de PS por incubación con ANX5-FITC y el estadio nuclear, con Hoechst. En paralelo se evaluó la exocitosis de gránulos corticales (EGC) por marcación del exudado cortical con LCA-TRITC. Los ovocitos reiniciaron la meiosis sin eliminar el 2do cuerpo polar y, al igual que aquellos incubados sin CCD, presentaron marca para LCA y ANX5. La coincidencia de ambas marcaciones sugería que la movilización de PS podría ocurrir como consecuencia de la EGC. Sin embargo, el hecho de que ovocitos activados con ionóforo de Ca²⁺ no presentaron exposición de PS pero una EGC normal, permitió descartar esta posibilidad. Para establecer el rol del Ca²⁺ en la exposición de PS, los ovocitos fueron incubados con BAPTA-AM (quelante intracelular de Ca²⁺) y activados con SrCl₂ no observándose reinicio de meiosis ni marca de ANX5. Para determinar si la falta de PS expuesta se debió a la falta de Ca²⁺ o al arresto en MII, se activaron ovocitos provenientes de ratones CaMKIIγ^{-/-}, los cuales elevan Ca²⁺ sin reiniciar meiosis, detectándose marca de ANX5 similar a los controles. Consistentemente, ovocitos activados con TPEN, quelante de Zn²⁺ que induce el reinicio de meiosis sin elevar Ca²⁺, no presentaron marca para ANX5. En conjunto, los resultados indican que la exposición de PS en ovocitos no depende de la estabilidad del citoesqueleto de actina y requiere aumento de calcio intracelular, apoyando la potencial relevancia de este fenómeno para la activación del ovocito.

186. (310) LA EXPOSICIÓN A DIETILSTILBESTROL DURANTE EL DESARROLLO ALTERA LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL DEL ÚTERO DE LA RATA ADULTA

Bosquiazzo, V.; Vigezzi, L.; Muñoz-De-Toro, M.; Luque, E. *Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. FCB. UNL*

Nuestro objetivo fue estudiar los efectos de la exposición prenatal y postnatal temprana al xenoestrógeno dietilstilbestrol (DES) sobre la histomorfología y la expresión de moléculas en el útero de ratas adultas con terapia hormonal de reemplazo. Ratas preñadas fueron expuestas a través del agua de bebida a 0.001% de etanol (control) o DES (5ug/Kg/día) desde el día 9 de gestación hasta el destete. A los 12 meses de edad las crías hembras fueron divididas en dos grupos. Un grupo de animales fue sacrificado y el otro grupo de hembras ovariectomizadas y tratadas vía sc con 17β-estradiol (E2) durante 3 meses. La histopatología uterina se estudió con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de receptores estrógeno alfa (REa), beta (REb) y progesterona (RP). A los 12 meses de edad el análisis histológico mostró una variedad de alteraciones glandulares en animales controles y con DES: glándulas quísticas, hipertróficas, con atipias nucleares (núcleos hipocrómicos) y metaplasias escamosas. En los animales expuestos a DES la incidencia de glándulas hipertróficas y con anomalías aumentó significativamente (p<0,05). En respuesta a E2 se observaron además glándulas con glándulas hijas y conglomerados de glándulas en todos los grupos experimentales. La incidencia de glándulas quísticas y con anomalías celulares aumentó en el grupo de DES+E2 sin alcanzar significancia estadística. La proporción de metaplasias escamosas aumentó en los animales DES+E2 comparado con los animales expuestos a DES sin tratamiento con E2 (p<0,05). La expresión de receptores hormonales en el estroma uterino de animales DES+E2 mostró una disminución de la expresión del RP, sin observarse cambios en la expresión del REa y REb, comparado con el grupo control+E2. Los resultados sugieren que la exposición perinatal a DES podría reprogramar el desarrollo uterino modificando el microambiente tisular y aumentando la susceptibilidad a lesiones uterinas durante la adultez en respuesta al tratamiento con E2

187. (315) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A DIETILSTILBESTROL (DES) Ó BISFENOL A (BPA) ALTERA LA RESPUESTA OVARICA A UN ESTIMULO GONADOTRÓFICO

Rivera, O.¹; Varayoud, J.²; Bosquiazzo, V.²; Osti, M.²; Belmonte, N.¹; Rodriguez, H.²; Dioguardi, G.¹; Muñoz-De-Toro, M.²; Luque, E.²

Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional de Lomas de Zamora¹ Lab. de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac. de Bioq. y Cs.Biol-Univ. Nac. del Litoral²

Previamente demostramos que la exposición postnatal temprana a Dietilstilbestrol (DES) y Bisfenol A (BPA) altera el desarrollo del ovario de la oveja. Utilizando el mismo modelo, nos propusimos determinar si estos xenoestrógenos modifican la respuesta ovárica a un estímulo gonadotrófico exógeno. Se expusieron corderas (vía sc) desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta DPN14 a dosis bajas de: DES (5 µg/kg, n= 9), BPA50 o BPA0,5 (50 µg/kg, n=11; 0,5 µg/kg, n=9), vehículo (C, n=12). Desde el DPN30 y cada 12 horas, las corderas recibieron 6 dosis iguales i.m de 1,46 mg de HFE (Hormona Foliculo Estimulante). Se tomaron muestras de sangre antes de la primera y de la última administración de HFE para determinar los niveles séricos de estradiol (E). El DPN35, por laparotomía exploratoria, se expusieron los ovarios y se contaron los folículos ≥ 2 mm. En cortes histológicos de estos ovarios se determinó: a) el número de folículos atrésicos, b) la expresión inmunohistoquímica de Ki-67 (como marcador de proliferación celular) y de receptores de estrógenos α (RE α), β (RE β), andrógenos (RA). Los animales expuestos a ambas dosis de BPA presentaron un menor número de folículos ≥ 2 mm (C=77,6 \pm 8,8 vs DES=43,5 \pm 11,9; vs BPA50=27,5 \pm 10,7, p<0.01; vs BPA0,5=28,2 \pm 9,3, p<0.05) y menores niveles de E sérico (C=44,8 \pm 18,8 pg/ml vs DES=22 \pm 12,9; vs BPA50=4,3 \pm 2,3; vs BPA0,5=9,3 \pm 2,6, p<0.05). Los animales expuestos a ambos xenoestrógenos mostraron un menor número de folículos atrésicos y menor expresión de RA en las células de la teca y granulosa. Se demuestra que la exposición postnatal temprana a dosis "ambientalmente relevantes" de DES ó BPA disminuye el desarrollo folicular y la esteroidogénesis ovárica en respuesta a un estímulo gonadotrófico exógeno. Estos resultados sugieren que la funcionalidad ovárica podría alterarse durante la vida adulta afectando la reproducción de la oveja.

188. (690) ANÁLISIS DE LA DINÁMICA FOLICULAR Y LOS NIVELES SÉRICOS E INTRAFOLICULARES DE HORMONAS ESTEROIDES EN UN MODELO DE PERSISTENCIA FOLICULAR EN BOVINOS

Ortega, H.^{1,2}; Diaz, P.¹; Stangaferro, M.³; Nareis, N.¹; Barberis, F.³; Matiller, V.¹; Rey, F.^{1,2}; Salvetti, N.^{1,2}
Lab de Biología Celular y Molecular Aplicada, Fac de Ciencias Veterinarias, Univ Nac del Litoral¹ CONICET² Cátedra de Teriogenología, Fac de Ciencias Veterinarias, Univ Nac del Litoral³

La enfermedad quística ovárica (COD) constituye una de las causas más comunes de infertilidad y subfertilidad en bovinos lecheros y la persistencia folicular es una de las etapas iniciales de su patogenia. Para estudiar este proceso desarrollamos un modelo experimental de persistencia folicular basado en el uso de dispositivos intravaginales de progesterona, aplicados el día 16 del ciclo estral en animales con el ciclo estral sincronizado (n=15), para conseguir concentraciones séricas subluteales de esta hormona (1-2 ng/ml). También, se obtuvieron muestras de animales controles en proestro (n=6) y de animales con COD espontánea (n=20). Diariamente se efectuaron ecografías para monitorear la dinámica folicular y extracciones de sangre para determinaciones hormonales. En las muestras de suero y líquido folicular se determinaron los niveles de estradiol (E2), progesterona (P4), 17-hidroxiprogesterona (17OHP), testosterona (T) y cortisol (C), mediante kits comerciales de quimioluminiscencia. Fue posible evidenciar el desarrollo de folículos con hasta 15 días de persistencia en todos los animales tratados. A nivel sérico, la P4 se mantuvo en niveles subluteales sin diferencias significativas entre los grupos analizados. El E2, en el día 15 de persistencia, fue similar a los valores de proestro y de animales con COD espontánea, pero significativamente menor a los niveles de los días 5 y 10 de persistencia (p<0,05). La T y la 17OHP tuvieron un incremento significativo en el día 15 de persistencia (p<0,05). No se observaron diferencias significativas en los niveles de C. Los niveles intrafoliculares de P4 fueron menores y los de 17OHP

significativamente mayores en los folículos persistentes (p<0,05). En función de estos resultados, podemos concluir que este modelo de inducción de folículos persistentes presenta características que lo hacen útil para el estudio de factores involucrados en los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad quística ovárica bovina.

189. (726) POSIBLES MODELOS IN VITRO E IN VIVO PARA EL ESTUDIO DE UNA PATOLOGÍA CON ANGIOGÉNESIS ALTERADA: SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)

Scotti, L.¹; Abramovich, D.¹; Haro Durand, L.¹; Pascuali, N.¹; Kopcov, L.³; Horton, M.³; De Zúñiga, I.³; Tesone, M.^{1,2}; Parborell, F.¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA² PREGNA Medicina Reproductiva³

OHSS es una complicación iatrogénica en tratamientos de infertilidad. Se caracteriza por una angiogénesis alterada, una alta permeabilidad vascular y niveles elevados de sustancias vasoactivas como ser el VEGF en suero y fluido folicular (FF). Junto al VEGF, participan otros sistemas como el de angiopoyetinas (ANGPTs) en el desarrollo de la vasculatura estable y funcional. Previamente, demostramos un aumento en los niveles de ANGPT1 en FF de pacientes con OHSS comparado a pacientes normales. En base a esto, se analizó el efecto que produce inhibir ANGPT1 en FF de pacientes normales y con OHSS sobre la migración celular, la expresión de claudina-5 y b-catenina en una línea de células endoteliales (EA.hy926). Además, se evaluó el efecto de estos FF sobre un modelo de angiogénesis in vivo (membrana corioalantoidea de embrión de codorniz, CAM). La migración en presencia de FF de OHSS fue mayor comparada a FF controles (p<0,001). El bloqueo de ANGPT1 en FF de OHSS disminuyó este parámetro (p<0,05). Se observó un aumento de claudina-5 (proteína endotelial de uniones estrechas) y una disminución de b-catenina endotelial en los cultivos incubados con FF de OHSS (p<0,001). La inhibición de ANGPT1 revirtió estos efectos (p<0,01). Los FF de OHSS causan un aumento en las ramificaciones y en el calibre vascular, analizado mediante el ensayo de CAM. La inhibición de ANGPT1 lo revirtió. Estos resultados se correlacionan con la expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ en CAM. En conclusión, se sugiere que la inhibición de ANGPT1 en los FF de pacientes con OHSS afecta la angiogénesis y disminuye la permeabilidad vascular a través de proteínas claves de uniones intercelulares endoteliales.

NEUROCIENCIAS 2

190. (197) LOS ESTRÓGENOS MODULAN POSITIVAMENTE LA MORFOLOGÍA DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA1 DEL HIPOCAMPO DE LAS RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)

Brocca, M.¹; Pietranera, L.^{1,2}; Beauquis, J.³; Roig, P.¹; De Nicola, A.^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA² Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA³

Las SHR desarrollan una importante encefalopatía caracterizada por atrofia del hipocampo, disminución de la neurogénesis y del número de neuronas en el giro dentado, disminución de la expresión de factores de crecimiento y astrogliosis. Anteriormente comprobamos la reversibilidad de estas alteraciones bajo tratamiento con estradiol. En el presente trabajo estudiamos los efectos moduladores del estradiol sobre la morfología de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas macho SHR (PA:187.7 \pm 7.6) y sus respectivos controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY) (PA:125 \pm 5.0) de 20 semanas de edad, a las cuales implantamos un pellet de 12mg de 17beta-estradiol benzoato en colesterol o solamente colesterol durante dos semanas. Utilizamos una versión modificada de la técnica de Golgi y posterior análisis

de Sholl, para determinar en las neuronas piramidales de la región CA1: 1) la longitud dendrítica total apical y basal, y a diferentes distancias del soma neuronal (de 20 a 300 μm); 2) la ramificación del árbol dendrítico; 3) la densidad de espinas dendríticas totales. Los resultados muestran que si bien la reducción observada de la longitud dendrítica apical y de la densidad de espinas dendríticas en las SHR vs WKY no fue significativa, el tratamiento con estradiol en las SHR indujo un aumento significativo de 1) la longitud dendrítica apical vs SHR (SHR+E₂:1854 \pm 140,7 μm ; SHR:1145 \pm 139,4 μm ; p<0.05) y en la región más distal desde el centro del soma (220-300 μm , p<0.05), 2) de la ramificación apical vs SHR (p<0.05); y 3) de la densidad de las espinas dendríticas totales vs SHR (SHR+E₂: 2,27 \pm 0.10/ μm ; SHR: 1,90 \pm 0.05/ μm , p<0.01). Estos datos evidencian el papel neuroprotector de los estrógenos sobre las neuronas hipocámpicas de la región CA1 de las SHR y sugieren que las alteraciones morfológicas observadas son eventos plásticos que pueden revertirse bajo tratamiento con estradiol.

191. (206) EFECTO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL SOBRE EL SISTEMA VISUAL NO FORMADOR DE IMÁGENES

Sande, P.¹; Fernández, D.¹; De Zavala, N.¹; Belforte, N.¹; Casiraghi, L.²; Golombek, D.²; Rosenstein, R.¹

Lab. NROE, Dep. Bioquímica humana, Fac Medicina, UBA¹ Laboratorio de Cronobiología Departamento de Ciencia y Tecnología Universidad Nacional de Quilmes²

La retinopatía diabética es una de las principales causas de ceguera. Las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs) que expresan el fotopigmento melanopsina, están involucradas en respuestas visuales no formadoras de imágenes como la sincronización de los ritmos circadianos y el reflejo pupilar. Se ha demostrado que la diabetes provoca una pérdida de células ganglionares retinianas. En este trabajo, examinamos el sistema visual no formador de imágenes en una etapa avanzada de diabetes experimental en ratas *Wistar* macho inducida por estreptozotocina (STZ). A las 15 semanas post-inyección de STZ, se observaron alteraciones significativas en el electroretinograma y los potenciales visuales evocados (P<0.01) y todos los animales desarrollaron cataratas maduras. Asimismo, concomitantemente con una disminución significativa en el número de células ganglionares Brn3a(+) (P<0.05 vs. control), no se observaron diferencias en el número de células que expresan melanopsina, en los niveles de melanopsina y en las proyecciones de la retina a los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), y al núcleo pretectal olivar. El reflejo pupilar aferente permaneció conservado luego de 10 semanas de diabetes. Después de 15 semanas de diabetes, se observó una disminución significativa (P<0.01) en la expresión de c-Fos en los NSQ inducida por luz. En los animales diabéticos se conservó el ritmo diario de actividad locomotora, aunque se observó un aumento en el tiempo necesario para la resincronización luego de un retraso de fase (4 h). En los animales diabéticos, la lensectomía (remoción del cristalino) revirtió significativamente (P<0.01) la reducción en la expresión de c-Fos y en la resincronización del ritmo de actividad locomotora. Estos resultados sugieren que el sustrato neuronal de sistema visual no formador de imágenes se preserva en etapas avanzadas de diabetes y que lensectomía podría restaurar las alteraciones circadianas inducidas por diabetes experimental.

192. (207) EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE EL DAÑO RETINIANO INDUCIDO POR EXCITOTOXICIDAD

Dorfman, D.; Fernández, D.; Rosenstein, R.

Laboratorio NROE, Departamento de Bioquímica Humana, Fac. Medicina, UBA- CEFyBO/CONICET

La excitotoxicidad es un mecanismo central en el daño de la retina asociado a diversas enfermedades que constituyen causas frecuentes de ceguera. Recientemente, hemos demostrado que la exposición de ratas adultas a un ambiente enriquecido (AE) protege a la retina del daño retiniano inducido por isquemia. Considerando que la excitotoxicidad por glutamato juega un rol central

en el daño isquémico retiniano, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la exposición a un AE frente al daño retiniano inducido por glutamato. Se inyectó una solución de glutamato en la cámara vítrea de un ojo de ratas *Wistar* macho adultas y vehículo en el ojo contralateral. Luego, los animales se albergaron en un ambiente estándar (AS) o AE por 7 días. 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. Luego de 7 días de exposición a AE o AS se analizó la función (por electroretinografía, ERG), la histología y la reactividad glial (inmunomarcación de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP)) retinianas, así como el transporte activo desde la retina al colículo superior (CS). En animales expuestos a un AS, el glutamato indujo una caída significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG (P<0,01 vs. vehículo), y en el número de células ganglionares retinianas (CGR) (p<0,01 vs. vehículo), un aumento en la inmunomarcación para GFAP, y una disminución en la densidad de proyecciones retinianas al CS. La exposición a AE revirtió totalmente la disfunción retiniana (p<0,01 vs. glutamato), la disminución en el número de CGR (p<0,01 vs. glutamato), el aumento en los niveles de GFAP y protegió el transporte activo entre la retina y el CS. Estos resultados sugieren que la exposición a un AE podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del daño retiniano inducido por excitotoxicidad glutamatérgica.

193. (277) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA INHIBICIÓN PRESINÁPTICA INDUCIDA POR INOSINA AL ACTIVAR RECEPTORES DE ADENOSINA A3 EN SINAPSIS MOTORAS DE MAMÍFERO

Cinalli, A.; Guarracino, J.; Losavio, A.

Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari, IDIM-CONICET

Previamente encontramos que la inosina (IN, 100 μM), metabolito de adenosina (AD), inhibe la secreción espontánea y evocada de ACh en sinapsis motoras de mamífero al activar receptores (R) AD A₃. Esta inhibición estaría vinculada a canales calcio voltaje dependiente (CCVDs) presinápticos. Nuestro objetivo fue investigar cuáles son los CCVDs involucrados y si además, tal como ocurre con los RAD A₁, un mecanismo relacionado a la maquinaria de liberación en un paso independiente al influjo de Ca²⁺ participa de la acción moduladora. La frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPPs) fue registrada en diafragmas de ratones CF1. La secreción espontánea de ACh está relacionada a CCVDs tipo L y N y la evocada a los CCVD tipo P/Q, bloqueados por nitrendipina (NIT), ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx) y ω -agatoxina IVA (ω -Aga), respectivamente. Encontramos que NIT y no ω -CgTx ocluyó el efecto de IN (NIT 52.3 \pm 3.3% de los valores controles, NIT+IN 53.8 \pm 4.8%, n=4; ω -CgTx 65.4 \pm 3.0, ω -CgTx+IN 42.9 \pm 5.4%, P<0.05, n=4). El efecto sobre los CCVD tipo P/Q fue estudiado en músculos expuestos a 12 mM K⁺. ω -Aga previno el efecto de IN (12-K⁺ 395.5 \pm 13.5%, 12-K⁺+ ω -Aga 110.5 \pm 9.5%, 12-K⁺+ ω -Aga+IN 108.1 \pm 1.7%, n=4). Luego analizamos la acción de IN sobre la respuesta hipertónica (RH), la cual produce un incremento de fMEPPs por un mecanismo independiente a la entrada de Ca²⁺ a la terminal nerviosa. IN no redujo el pico de la RH (93.8 \pm 6.7% de la RH control, n=4). Para descartar que la AD endógena generada durante la RH pudiese estar ocupando los RAD A₃, evaluamos el efecto de IN en presencia de $\alpha\beta$ -MeADP (inhibe ecto-5'-nucleotidasa que actúa en la conversión AMP a AD). En este caso, IN disminuyó el pico de la RH ($\alpha\beta$ -MeADP 98.5 \pm 10.7%, $\alpha\beta$ -MeADP+IN 67.4 \pm 8.9 %, P<0.05, n=7). Los resultados sugieren que IN inhibe la secreción espontánea y evocada de ACh por un mecanismo multimodal que involucra a los CCVD tipo L y P/Q y a la cascada del proceso de exocitosis en un paso independiente al Ca²⁺.

194. (286) LA SEÑALIZACIÓN AUTOCRINA POR EL DAMP S100B EN ASTROCITOS PROMUEVE LA GLIOSIS REACTIVA IN VITRO E IN VIVO Y FAVORECE LA SOBREVIDA GLIAL AL ESTRÉS OXIDATIVO

Villarreal, A.; Seoane, R.; Angelo, M.; Ramos, A.

IBCN Prof Eduardo De Robertis, Facultad de Medicina, UBA.

Las células de la astrogliá responden a la injuria cerebral con una respuesta genérica de gliosis reactiva, caracterizada por la hipertrofia e hiperplasia celular y la generación de un microambiente proinflamatorio. Se cree que la liberación de moléculas tipo DAMP (como S100B) por astrocitos reactivos en el foco de lesión, promovería la propagación de la neuroinflamación hacia regiones más distales. S100B en alta concentraciones produce muerte neuronal, un efecto mediado por RAGE y NF- κ B (Villarreal et al. J. Neurochem 2011). En el presente trabajo nos propusimos estudiar si S100B es capaz de inducir un fenotipo reactivo en astrocitos. Para ello expusimos cultivos primarios de astrocitos corticales de rata a distintas dosis de S100B y estudiamos los cambios en la morfología, en la proliferación, en la sobrevida a estrés oxidativo y en la activación de NF κ B. El tratamiento con S100B indujo la extensión de las prolongaciones gliales y el pasaje de la forma poligonal hacia la forma filamentosa (*stellation*), así como un aumento de la tasa de proliferación evidenciado por incorporación de BrdU. Ambos efectos fueron parcialmente bloqueados utilizando un anticuerpo neutralizante anti-RAGE. Por inmunoblot se demostró que la exposición a S100B induce un aumento en la expresión de Vimentina y GFAP, así como la activación de NF κ B en forma dosis y tiempo dependiente. La previa exposición a S100B previno la muerte astrogliá provocada por una posterior exposición a H₂O₂ (200 μ M/2 hs), efecto que resulto dependiente de Erk y parcialmente dependiente de Akt. Por último, la infusión intracortical de S100B (50 μ M) en cerebros de ratas naïve recapitulo algunas características de la gliosis reactiva inducida por la injuria. Estos resultados muestran que S100B es capaz de inducir en astrocitos varios marcadores de la conversión hacia el fenotipo reactivo y aumenta su capacidad de sobrevida al estrés oxidativo. Subsidios: PIP CONICET 1728, UBACYT, PICT 2008-1590

195. (318) ESTUDIO DE DOS MODELOS DE DESMIELINIZACIÓN TEMPRANA Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA ESQUIZOFRENIA

Valeiras, B.¹; Rosato Siri, V.¹; Codagnone, M.²; Reinés, A.²; Pasquini, J.¹
 Departamento de Química Biológica, IQUIFIB-CONICET, FFyB UBA¹ Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA), CONICET, Universidad de Buenos Aires²

La esquizofrenia, un trastorno psiquiátrico severo que afecta a un 0,5-1% de la población mundial, ha sido históricamente asociada a alteraciones neuronales y de la materia gris. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la integridad de la materia blanca también se encuentra afectada. Respecto a las causas de esta patología en el adulto, se cree que factores que afectan el desarrollo temprano del cerebro podrían jugar un papel clave en la aparición de este complejo trastorno. Teniendo en cuenta esto, junto con la nueva información sobre la materia blanca afectada, el objetivo del presente trabajo fue determinar si una desmielinización temprana puede inducir el desarrollo de un comportamiento esquizofrénico en el joven-adulto y si el momento del daño influye en dicho desarrollo. Para ello generamos dos grupos experimentales en rata alimentadas con 0,6% cuprizona antes del destete desde el día postnatal 7 (P7) al P21 o luego del destete desde P21 a P35. Luego del tratamiento los animales fueron devueltos a una dieta normal hasta P90, momento en que se realizaron estudios comportamentales. En la caracterización inmunohistoquímica pudo evidenciarse que ambos tratamientos produjeron una pronunciada desmielinización en el cuerpo calloso junto con una retracción en las fibras corticales de mielina y una marcada astrogliosis, luego de dos semanas de intoxicación. La subsiguiente dieta normal permitió una remielinización efectiva a P90. Respecto a los ensayos comportamentales, ambos tratamientos afectaron el comportamiento social con un efecto mayor en el grupo de ratas tratado luego del destete y existiendo una prevalencia mayor en machos. Estos resultados sugieren que una desmielinización temprana, particularmente posterior al destete, es capaz de afectar sustancialmente el comportamiento social de ratas joven-adultas, pudiendo correlacionarse con comportamientos esquizofrénicos.

196. (352) IMPLICANCIAS DEL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA EN LA RESPUESTA DEL RECEPTOR ET-A Y EN LA REGULACIÓN DE LA TIROSINA HIDROXILASA EN BULBO OLFATORIO DE RATAS HIPERTENSAS DOCA-SAL

Guil, M.¹; Soria, C.¹; Morales, V.¹; Hope, S.¹; Bianciotti, L.³; Gironacci, M.²; Vatta, M.¹
 IQUIMEFA-CONICET, FFyB, UBA¹ Departamento de Química Biológica (IQUIFIB-CONICET)-UBA² Cátedra de Fisiopatología (INIGEM-CONICET)-UBA³

Recientemente demostramos que el bloqueo agudo del receptor ETA disminuye los niveles y actividad de tirosina hidroxilasa (TH). En base a estos resultados se estudió el papel del sistema Ubiquitina-Proteasoma en la posible degradación de la TH producida por el bloqueo central ETA en ratas DOCA-Sal. Para este objetivo se bloqueó el receptor ETA (BQ610) en presencia del inhibidor del Proteasoma (MG132) en ratas normotensas e hipertensas DOCA-Sal. El BQ610 y el MG132 se administraron vía intracerebroventricular (1 μ l/min). En ratas DOCA-Sal, la administración previa de MG132 produjo una reversión de la disminución de la PAM producida por el BQ610 ($p < 0,05$ vs. DOCA-Sal+BQ610), mientras que la administración de MG132 aumentó la FC ($p < 0,05$ vs. DOCA-Sal). La determinación de actividad de TH en el bulbo olfatorio (BO) mostró que la administración de BQ610 precedida por MG132 en ratas hipertensas produce la reversión parcial del aumento inducido por la sola administración del antagonista ETA ($p < 0,05$ vs. DOCA-Sal y vs DOCA-Sal+BQ610). Los niveles de TH totales determinados por Western Blot presentaron valores similares a los hallados en BO de ratas DOCA-Sal al tratar los animales con MG132 y BQ610 ($p < 0,01$ vs. DOCA-Sal+BQ610). La TH fosforilada en los sitios Serina 19, 31 y 40 mostraron incrementos al tratar los animales hipertensos con MG132 ($p < 0,05$ vs. DOCA-Sal para P_{Ser19} y 40) y reversiones parciales al inyectar MG132 junto con BQ610 ($p < 0,05$ vs. DOCA-Sal+BQ610 y vs. DOCA-Sal). Los niveles de TH marcada con Ubiquitina no presenta mayores variaciones en animales controles o DOCA-Sal al ser expuestos al inhibidor de Proteasoma. Al inyectar MG132 en los animales la actividad de Proteasoma disminuyó 25% ($p < 0,05$). Los resultados muestran entonces que el sistema Ubiquitina-Proteasoma estaría parcialmente implicado en respuesta a la inhibición del receptor ETA sobre la TH en ratas DOCA-Sal.

ENDOCRINOLOGÍA 2

197. (799) EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO EN LA EXPRESION DE RECEPTORES NUCLEARES Y SUS CO-REGULADORES DURANTE LA LACTANCIA DE LA RATA

Campo Verde Arbocco, F., Hapon, M., Jahn, G.
 Laboratorio de Reproducción y Lactancia. IMBECU. CCT Mendoza

La lactancia dirige la respuesta de las células mamarias hacia la síntesis de leche. Entre las hormonas que regulan esta función están prolactina, hormonas ováricas y tiroideas. El hipotiroidismo (hipoT) altera la respuesta celular mamaria y la síntesis de leche. Por esto, estudiamos si los efectos del hipoT en el curso de la lactancia, están mediados por cambios en la expresión de receptores (R) hormonales que regulan la función mamaria o en los co-reguladores de los receptores nucleares. Usamos ratas Wistar hembras hechas hipoT por administración de PTU (0,1 g/l) en el agua de bebida, sacrificadas en los días 2, 7 y 14 de lactancia (L2, L7 y L14, n=6-8). Se diseccionaron las glándulas mamarias inguinales y se obtuvieron ARN y proteínas. Se midió por PCR en tiempo real el contenido de ARNm relativo al gen ribosomal S16, de los R de estrógeno α y β (RE₂ α y β), de progesterona (RP4A+B y B), de hormonas tiroideas a y b (RT α y β), NCor1, RXRa y ciclina D1 (CD1). Por Western Blot se determinó el contenido de RE₂ α , de RPA y B, de TRa y b a nivel de proteínas. A lo largo de la lactancia observamos aumentos en la expresión de ARNm de TRb1, TRa1 y TRa2 ($p < 0,05$) y caídas de NCor1, RXRa y CD1 ($p < 0,05$) en L7 comparados con L2 y L14, mostrando una relación

inversa entre los TRs y sus correguladores. El hipot no modificó el nivel de ARNm de ER α , RP total, RPB, CD1, NCor1 y RXRa a lo largo de la lactancia pero aumentó el ARNm de ER β en L7. A nivel de proteína el grupo control mostró aumentos en L7 de la expresión de TR α , β y RPB ($p < 0.01$) y una caída de RPA ($p < 0.05$) comparados con L2 y L14. El hipot no alteró los cambios de TR α , ER α y RPB, bloqueó la disminución de TR β en L14 y amortiguó el aumento de RPA en L14. Estos resultados muestran un efecto directo de las hormonas tiroideas en la regulación de la expresión de los receptores nucleares de hormonas ováricas y tiroideas a lo largo de la lactancia que pueden estar involucradas en las alteraciones en la síntesis de leche.

198. (771) EFECTO DE HIPOTIROIDISMO EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PROLACTINA A LO LARGO DE LA LACTANCIA DE LA RATA

Campo Verde Arbocco, F., Hapon, M., Jahn, G.
Laboratorio de Reproducción y Lactancia. IMBECU. CCT Mendoza

La lactancia es regulada por múltiples mecanismos moleculares, entre los cuales prima la activación de las vías de señalización de prolactina (PRL) y su regulación por el ambiente hormonal. El hipotiroidismo (hipoT) genera alteraciones funcionales en la glándula mamaria reflejadas en disminuciones en la calidad de la leche y en el reflejo de eyección láctea y alteraciones en el metabolismo lipídico. Resultados previos mostraron que en el día 2 (L2) y 14 de lactancia (L14) el hipot altera la expresión de miembros de la vía de señalización de PRL. Por esto, nos propusimos estudiar el efecto del hipot en la expresión de miembros de la vía de señalización de PRL en el curso de la lactancia (L2, L7 y L14) en ratas Wistar hembras hechas hipot por administración de PTU (0,1 g/l) en el agua de bebida ($n=8$). Se diseccionaron 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, del receptor de PRL (RPRL), y componentes de su vía de señalización, Stat5a, Stat5b, SOCS-1 y 3 y CIS y sus genes blanco *bcasina* (Csn2) y *alactoalbúmina* (Lalba). Por Western Blot se midió el contenido de proteína STAT5b. En L7 a nivel de ARNm se vio una marcada disminución de expresión del RPRL, Stat5b y Csn2 y un aumento de SOCS-1 y 3 respecto a L2 y L14, mostrando una relación inversa entre los efectores de la vía y sus inhibidores. El hipot no modificó el nivel de ARNm de Stat5a, SOCS-1, CIS y Lalba a lo largo de la lactancia pero generó una caída prematura ($p < 0.05$) de la expresión del RPRL, stat-5b y Socs-3 en L7 y aumentó la expresión de Csn2 en L7 ($p < 0.05$). A nivel de proteína STAT5b cayó entre L7 y L14 en los controles y el hipot generó una caída prematura ($p < 0.05$) en L7. Estos resultados demuestran un marcado efecto del hipot en L7 que afecta la expresión de algunos de los miembros de la vía de señalización de prolactina y en consecuencia modifica la expresión de genes blanco de esta vía.

199. (184) EFECTOS DE LA DIABETES MELLITUS EN OSTEOGÉNESIS: MECANISMOS MEDIADOS POR AGES Y ALENDRONATO

Chuguransky, S., Tolosa, M., McCarthy, A., Cortizo, A.
Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral

La Diabetes mellitus se asocia con alteraciones óseas y hemos demostrado efectos inhibitorios de la osteogénesis en ratas diabéticas, posiblemente mediados por productos de glicación avanzada (AGEs). Ciertos agentes anabólicos podrían prevenir los efectos deletéreos de los AGEs sobre la osteogénesis. Los bisfosfonatos (BP) son análogos estables del PPI que ejercen efectos directos sobre osteoclastos y osteoblastos. En este trabajo se estudió el efecto de la Diabetes así como el efecto directo de los AGEs y el Alendronato (Ale) sobre la capacidad osteogénica de células progenitoras de médula ósea (CPMO). Las CPMO se obtuvieron a partir del fémur de ratas Wistar controles (CPMO-C: sin tratamiento alguno) o con diabetes leve (CPMO-D: Streptozotocina-Nicotinamida), por lavado del canal diafisario. Las CPMO fueron

plaqueadas y cultivadas hasta confluencia, luego de lo cual se las incubó en un medio osteogénico (b-glicerofosfato y ácido ascórbico) por 15 días. CPMO-C se cultivaron en presencia o ausencia de AGEs y Alendronato (Ale). Se evaluó la diferenciación celular a través de la actividad de Fosfatasa alcalina [FAL] y la producción de Colágeno de tipo 1 [Col-1]. CPMO-D mostraron una disminución en la FAL (12% del control) y la producción de Col-1 (31% control). CPMO-C diferenciadas en presencia de 100 y 200 mg/ml AGEs, mostraron una menor capacidad osteogénica que CPMO-C sin AGEs, evaluada por disminución en FAL (70% de control) y Col-1 (60% de control). Por otro lado, 10^{-7} - 10^{-9} M Ale estimuló la FAL (200% control) y Col-1 (300% control). La diferenciación osteogénica de CPMO-C con 200 mg/ml AGEs y 10^{-8} M Ale, demostró que Ale es capaz de prevenir completamente el efecto inhibitorio de AGEs: FAL (150% de control) y Col-1 (150% de control). En conclusión, la Diabetes ejerce efectos deletéreos sobre la osteogénesis. El Ale favorece la diferenciación osteoblástica de CPMO, y puede revertir totalmente los efectos anti-osteogénicos de los AGEs.

200. (229) ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS DE UN MODELO MATEMÁTICO DE LA HOMEOSTASIS DEL SISTEMA GLUCOSA (G) -INSULINA (I) EN LA RATA CON DIABETES MELLITUS TIPO I (DMTI)

Lombarte, M.¹, Acciarri, O.¹, Biset, H.¹, Moreno, H.¹, Campetelli, G.², Basualdo, M.², Rigalli, A.¹
Laboratorio de Biología Ósea-Facultad de Ciencias Médicas-UNR¹ GIAIP-CIFASIS-CONICET-UNR²

La DMTI afecta a millones de personas en el mundo. El desarrollo de un páncreas artificial ha requerido del planteo de modelos matemáticos, que en su mayoría tienen un alto número de parámetros, de compleja estimación. En trabajos anteriores desarrollamos un nuevo modelo del sistema G-I para la rata normal, la estimación y optimización de sus parámetros, simulaciones y su validación. La fortaleza de este modelo es la simplicidad para la obtención de los parámetros en cada rata. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo matemático para la rata con DMTI y una estrategia para la estimación de sus parámetros. Este modelo tiene 5 ecuaciones diferenciales que representan las variaciones de G en plasma, I en plasma, D (glucosa en aparato digestivo), U (glucosa en orina) e Y (insulina en espacio subcutáneo); e incluye parámetros asociadas al funcionamiento hepático (k_a), intestinal (k_a y k_o), tisular (k_2 y k_3) y renal (k_5 y G_u) de G, desaparición plasmática (k_6) e ingreso de I desde el espacio subcutáneo al plasma (k_7 , k_8). Los parámetros se estimaron a partir de datos de glucemia, insulinemia y glucosuria luego de una ingesta de glucosa (0,3g/100g pc) y luego de una inyección subcutánea de 1 UI de insulina porcina corriente en ratas Sprague-Dawley de 70 días ($n=4$) con DMTI por estreptozotocina (60mg/kg de pc). Se estimaron los parámetros empleando una herramienta computacional para el ajuste no lineal. A modo de ejemplo se muestran los parámetros para uno de los animales: $k_a = 0.060$, $k_o = 0.025$, $k_2 = 0.0025$, $k_3 = 1.03$, $k_4 = 0.0026$, $I_{pi} = 402$, $k_5 = 0.02$, $G_u = 220$, $k_6 = 0.016$, $k_7 = 115$, $k_8 = 0.072$ (se omiten las unidades de los parámetros). Con estos valores se realizaron simulaciones empleando la herramienta simulink de MatLab, obteniéndose el comportamiento esperado de las variables. El modelo planteado reproduce el comportamiento de G e I en la rata con DMTI y la metodología planteada permite obtener todos los parámetros para cada animal.

201. (653) LA OVARIECTOMÍA ALTERA LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR RENAL D1 DE LA DOPAMINA EN RATAS WISTAR ADULTAS

Di Ciano, L.¹; Azurmendi, P.¹; Oddo, E.¹; Levin, G.²; Toledo, J.¹; De Luca Sarobe, V.¹; Arrizurieta, E.¹; Ibarra, F.¹
Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, UBA. Lab Riñón Experimental.¹ Hospital de Niños R Gutiérrez, CE-DIE-CONICET.²

En estudios anteriores mostramos que las ratas ovariectomizadas (oVx) tienen un incremento de la expresión renal y estado

de defosforilación de la bomba de Na⁺, K⁺-ATPasa (NKA) y que desarrollan hipertensión ante una dieta hipersódica, excretando menos sodio. Además, dichas ratas difieren en la fosforilación de NKA ante el bloqueo del receptor dopaminérgico D1 (D1R), aún con niveles similares de dopamina (DA) urinaria. Por ello, se evaluó la expresión del D1R y la respuesta hidroelectrolítica a la estimulación exógena con DA infundida. Se utilizaron ratas hembras de 150 días de vida, intactas (IF) y oVx a los 60 días de vida. Se evaluó la expresión renal del D1R por western blot en homogenatos de corteza (C) y médula renal (M) y la respuesta funcional del D1R mediante una infusión de DA (1 µg/kg PC/min) y se determinaron presión arterial media (PAM), volumen urinario (V) y excreción de sodio (UNa+V). La expresión renal del D1R mostró dos bandas: una de 55 kD (inmadura) y otra de 75 kD (glicosilada) tanto en C como M. La expresión de la banda de 55 kD estuvo disminuida en C y M de ratas oVx (72±5 y 67±9%) respecto de las IF (100±8 y 100±8%, p<0.05, respectivamente), sin diferencias en la banda de 75 kD. La infusión de DA en IF incrementó la UNa+V de 19.28±0.65 a 29.49±3.89 µEq/30min/100g PC, p<0.05, sin cambios en el V. Esta respuesta a la infusión de DA estuvo ausente en las ratas oVx. La infusión de DA no modificó la PAM en ninguno de los grupos estudiados. Es conocido que la DA mediante estimulación del D1R fosforila la bomba de sodio. La disminución de D1R en oVx se asocia con el incremento en la expresión y el estado de defosforilación de NKA y con una respuesta natriurética disminuida a la infusión de DA. Estos hallazgos sugieren que la ausencia de hormonas ováricas podría desregular la expresión e interacción del D1R y la NKA y por ende afectar a la capacidad de excretar el sodio en respuesta a la dopamina.

INMUNOLOGÍA INNATA E INFLAMACIÓN I

202. (26) MODULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS POR UN LIGANDO DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

Barcala Tabarozzi, A.¹, Castro, C.¹, Berguer, P.², Antunica Noguerol, M.¹, Liberman, A.¹, De Bosscher, K.³, Haegeman, G.³, Arzt, E.¹, Perone, M.¹
Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck¹ Laboratorio de Inmunología y Microbiología Molecular, IIBBA, Fundación Instituto Leloir² Department of Biochemistry, VIB Department of Med Protein Research, Cytokine Receptor Lab, Belgium³

El Compuesto A (CpdA), ligando del receptor de glucocorticoides (GC), presenta actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora sin activar genes dirigidos por elementos de respuesta a GC responsables de los efectos endocrinos indeseables. El interés en ligandos selectivos no esteroideos del receptor de GC radica en su potencial terapéutico. Hemos demostrado que el CpdA afecta la actividad de factores de transcripción clave en linfocitos Th1 y Th2 de distinta manera a lo descrito para los GC. En un modelo de artritis reumatoidea, el CpdA aumentó el número de macrófagos M2, atenuando la enfermedad. Sin embargo, el efecto del CpdA en células dendríticas (DC) es desconocido. Los GC sintéticos, como la dexametasona, modulan la diferenciación y activación de las DC. Estudiamos el efecto del CpdA sobre la activación de DC derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6. Estas fueron pretratadas con vehículo o CpdA y estimuladas con LPS. Analizamos la expresión en la membrana celular del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII), moléculas coestimuladoras, secreción de citoquinas, capacidad endocítica y función presentadora de antígeno. El CpdA inhibió la expresión inducida por LPS de MHCII, CD80, CD86, CD40, CD273, CD274 y CD54 (p<0.05 vs veh), sin afectar la de CD45RB. Además, redujo la secreción de IL12p70, IL6 y TNFα (p<0.05 vs veh) y atenuó la capacidad presentadora de las DC activadas con LPS (p<0.05 vs veh). Por otra parte, el CpdA bloqueó la capacidad endocítica de las DC (p<0.05 vs veh). Estos resultados muestran que el CpdA interfiere con la activación de las DC desafiadas con LPS, inhibiendo parcialmente su maduración fenotípica y

modulando su respuesta. Los mecanismos de acción de los efectos del CpdA sobre las DC descritos están en estudio. Estos hallazgos sugieren que las DC podrían ser un blanco de acción de la administración in vivo de CpdA para desordenes inmunes en los cuales juegan un rol clave.

203. (268) EL IFN- β PRODUCIDO POR CÉLULAS TUMORALES ACTIVADAS VÍA TLR ESTÁ IMPLICADO EN EL MEJORAMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

Núñez, N.¹, Nocera, D.¹, Gatti, G.¹, Libert, C.², Maccioni, M.¹
Facultad de Ciencias Químicas - CIBICI Conicet- UNC¹ Department of Molecular Biomedical Research, Ghent University, Belgium²

La administración de ligandos de receptores tipo Toll (TLR) es una estrategia valiosa para promover la inmunidad contra el cáncer. Recientemente, se encontraron TLRs en las células tumorales, pero su funcionalidad aún es controversial. Cuando las células de melanoma B16 fueron estimuladas in vitro con un ligando de TLR4 (B16-LPS), antes de su inoculación en ratones deficientes en TLR4, se indujo tumores de menor tamaño que los inducidos por células B16 no estimuladas. Además, los sobrenadantes de cultivo de células B16-LPS mejoraron la maduración de células dendríticas (CDs) derivadas de médula ósea de ratones TLR4^{lo/-}, induciendo la expresión de IL12 y moléculas co-estimuladoras. Este efecto se vio afectado cuando un anticuerpo neutralizante de IFN β fue agregado al medio. Cuando las células B16 fueron estimuladas in vitro con poly A:U (B16-PAU) se indujo altos niveles de IFN β comparado con las células B16 no estimuladas (B16; 108,09±12,23 vs 37,63±2,63 pg/ml, p<0,05). No hubo una modificación en el balance de proliferación/apoptosis en células B16-PAU. Una inhibición significativa del crecimiento tumoral fue observada cuando los tumores fueron inducidos por células B16-PAU en ratones TLR3 +/+ y TLR3 -/- (n=10, p<0,05) en comparación con los inducidos por células B16, excluyendo los efectos del remanente de poly A:U. Para analizar si el IFN tipo I producido por B16-PAU podría estar jugando un rol *in vivo*, se inocularon células B16 o B16-PAU en ratones carentes de la subunidad IFNAR1. La inhibición del crecimiento tumoral sólo se observó en ratones wt portadores de tumores PAU-B16 (n=10 p<0,05). Nuestros resultados indican que la señalización vía IFNAR1 es fundamental en la inhibición del crecimiento tumoral observado, sugiriendo que los IFNs tipo I producido por células B16 estimuladas con poly A:U podría modificar el entorno local en el sitio de inoculación de células tumorales, mejorando la funcionalidad de las CDs y la respuesta inmune antitumoral.

204. (500) ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DIFERENCIAL DE DOS CEPAS DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS: EFECTO EN LA INMUNIDAD ANTIVIRAL DE INTESTINO

Vizoso Pinto, M.^{1,2}, Villena, J.^{2,3}, Marranzino, G.², Rodríguez, V.², Tomosada, Y.³, Álvarez, S.², Kitazawa, H.³
INSIBIO-CONICET, Biomedical Dep., Faculty of Medicine, National University of Tucumán, Argentina¹ Laboratory of Clinical and Experimental Biochemistry, CERELA-CONICET, Argentina² Food Immunology Group, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan³

Lactobacillus rhamnosus CRL1505 (Lr5) y CRL1506 (Lr6) incrementan la resistencia contra patógenos intestinales bacterianos. En este trabajo se evaluó si Lr5 o Lr6 pueden modular beneficiosamente la inmunidad antiviral en el tracto intestinal. Se realizaron estudios *in vitro* empleando células presentadoras de antígeno (CPA) de placas de Peyer (PP) y células epiteliales intestinales (PIE) porcinas. Cultivos de PIE o CPA fueron estimulados con Lr5 o Lr6 (10⁸ céls) durante 2d y posteriormente desafiadas con poly(I:C) (60 ng/ml), análogo sintético de ARN doble catenario que induce alteraciones intestinales similares a las provocadas por rotavirus. Se estudió la expresión de diferentes citoquinas y marcadores de activación por RT-PCR y citometría de flujo. El desafío con poly(I:C) incrementó los niveles de IFN- α , IFN- β , IL-6, TNF- α y MCP-1 en las células PIE. Tanto Lr5 como Lr6 aumentaron la expresión de IFN- α , IFN- β e IL-6 en las células PIE, siendo Lr6 más eficiente para

estimular la producción de interferones de tipo I en estas células ($P < 0,05$). Por otro lado, tres grupos de CPA fueron definidas por citometría de flujo: células CD172a+CD11R1-, CD172a-CD11R1low y CD172a+CD11R1high. El desafío con poly(I:C) incrementó los niveles de MHCII, CD80/86, IL-12, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en las CPA. Tanto Lr5 como Lr6 incrementaron la expresión de MHCII, CD80/86, IL-1 β , IL-6, IL-12 e IFN- γ en las células CD172a-CD11R1low, así como MHCII e IL-10 en las células CD172a+CD11R1- y CD172a+CD11R1high. Lr5 fue más eficiente que Lr6 para estimular las CPA ($P < 0,05$). Los resultados muestran que, si bien Lr5 y Lr6 son capaces de incrementar la respuesta de células epiteliales y presentadoras de antígeno de intestino frente al desafío con poly(I:C), cada una de ellas tiene una actividad inmunomoduladora específica. Estudios *in vivo* son necesarios para evaluar cual de los microorganismos estudiados es más eficiente para proteger contra infecciones virales intestinales.

205. (570) CONDICIONAMIENTO DEL PERFIL DE MONOCITOS MATERNOS LUEGO DE LA INTERACCIÓN CON CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS: RECLUTAMIENTO DIFERENCIAL FRENTE A ESTÍMULOS PATOLÓGICOS

Grasso, E., Fraccaroli, L., Hauk, V., Calo, G., Pérez Leiros, C., Ramhorst, R.

Laboratorio de Inmunofarmacología, dpto. de Química Biológica, FCEN-UBA

Los macrófagos constituyen un 20% de las células inmunes decíduales y coordinan las defensas contra patógenos, la reparación de heridas y la inducción de tolerancia. Aquí estudiamos cómo las células trofoblásticas condicionan (educan) el perfil de activación y la capacidad migratoria de monocitos maternos (MO). Utilizamos un modelo *in vitro* de interacción entre células trofoblásticas (línea celular Swan71) y MO purificados a partir de sangre periférica de mujeres fértiles por adherencia o perlas magnéticas CD14 (en todos los casos >80% de pureza). Luego de 24hs de cocultivo observamos un aumento en la producción IL-10 intracitoplasmática en CD14+. Más aún, los MO que interaccionaron con células trofoblásticas aumentaron significativamente su capacidad fagocítica de células Swan71 apoptóticas con respecto a los MO no educados ($p < 0.05$ M. Whitney). Seguidamente evaluamos la capacidad migratoria de los MO educados o no hacia células Swan71 en ensayos de transwells en presencia o ausencia de estímulos patológicos (LPS 10ug/ml; Poli:IC 10ug/ml). La educación de los MO disminuyó la migración aún con estímulos patológicos. Para profundizar en los mecanismos involucrados estudiamos la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR3 y CCR5 y las quimioquinas IL-8, RANTES y MCP1. La educación indujo un incremento significativo en la expresión de CCR1 y una tendencia a disminuir las quimioquinas. Bajo estímulos patológicos, el LPS disminuyó la expresión de CCR1, CCR5, IL-8 y RANTES de forma significativa ($p < 0.05$ M Whitney), mientras que el poli:IC mostró una disminución significativa solo de IL-8. Por otra parte, evaluamos la expresión de MCP1, IL-8 y RANTES en células Swan71. El diálogo indujo un aumento de IL-8 y MCP1 que fue revertido por los estímulos patológicos. Concluimos que la interacción con células trofoblásticas induce un perfil tolerogénico en los MO y modula la red de quimioquinas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

ONCOLOGÍA 3

206. (9) PH COMO CONTROL DE CALIDAD DE LA DESVITALIZACIÓN TISULAR

Denninghoff, V.¹; Uceda, A.³; Ossani, G.³; García, A.¹; Avagnina, A.¹; Martins, V.²; Carraro, D.²; Soares, F.²; Campos, A.²

Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas CEMIC¹ Hospital A C Camargo - Fundação Antonio Prudente² Centro de Patología Experimental y Aplicada (CPEA)³

Introducción: El impacto de la devitalización en el proceso de congelamiento es incierto. Si los cambios en la expresión

génica derivadas de isquemia introdujesen suficiente variabilidad en los datos de microarreglos, la sensibilidad y especificidad clínica del ensayo podrían verse afectados negativamente. El objetivo general del trabajo es evaluar el impacto que tiene el tiempo de devitalización tisular de muestras biológicas, bajo un estricto protocolo estandarizado con altos criterios de control de calidad. **Diseño del estudio:** Cincuenta y seis ratones (*Mus musculus*) C57Bl/6 SPF del Bioterio del (CIPE) del Hospital A.C. Camargo SP Brasil, fueron divididos en 5 grupos de acuerdo al tiempo de criopreservación del tejido (0, 15, 30, 45, 60 minutos). El procedimiento de extracción de órganos fue realizado bajo flujo laminar bajo condiciones de asepsia quirúrgica. Se extrajeron y pesaron ambos pulmones, ambos riñones, e hígado (anterior y posterior). Al completarse el tiempo de criopreservación se midió el pH por duplicado a temperatura ambiente con un *Dual Channel pH-Ion-meter Accumet Excel XL25*. Se estudió la histología (HE). Las diferencias globales entre los diferentes órganos y entre los diferentes tiempos se analizaron con el test de Kruskal-Wallis; la comparación posterior de cada uno de los grupos se realizó con el test de Mann Whitney con corrección de Bonferroni. **Resultados:** Se hallaron diferencias significativas para los valores del pH entre los órganos para un mismo tiempo y entre los tiempos para un mismo órgano. Se observó un aumento del pH para los tres órganos con un máximo a los 30 minutos. Los pH del pulmón fueron mayores. En la evaluación de la histología, no se hallaron diferencias entre los tiempos en la histoarquitectura de los órganos. **CONCLUSION:** La determinación del pH podría ser considerado un parámetro para medir la desvitalización tisular, entre tiempos y entre órganos. Estas variaciones del pH tisular tejido y tiempo específicos podrían estar induciendo diferentes cambios en la expresión génica de los tejido-temporo-espaciales.

207. (193) MAGEB2 COLABORA EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR C-MYC Y E2F

Toledo, M.¹; Ladelfa, M.¹; Peche, L.²; Laiseca, J.¹; Schneider, C.²; Monte, M.¹

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, F.C.E.N., U.B.A.¹ Laboratorio Nazionale del Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie, Area Science Park, Italia²

MageB2 es una proteína con expresión específica tumoral, miembro de la familia MAGE. Nuestro objetivo general es comprender qué ventajas pueden conferir estas proteínas a las células tumorales. Nuestros estudios indican que la expresión de MageB2 aumenta la proliferación celular e induce la actividad de los factores de transcripción E2F. Dependiendo del contexto celular, E2F1 puede comportarse como un inductor de la proliferación celular o de la apoptosis. Aquí demostramos que la expresión de MageB2 aumenta con el agregado de factores de crecimiento y que protege de la apoptosis inducida por E2F1, sugiriendo que su actividad sobre E2F1 lleva a un balance proliferativo. Esta misma actividad fue demostrada para el oncogén c-myc, quien estimula a los factores E2F para inducir proliferación. Cuando analizamos el efecto de la expresión de c-myc y MageB2 en la proliferación celular, observamos que MageB2 potencia el efecto proliferativo de c-myc. Este resultado nos llevó a investigar si c-myc y MageB2 podían estar co-expresados mediante una regulación directa. Como se desconocen los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes MAGE, nos focalizamos en el análisis de su región promotora. Encontramos en la región 5' del gen MageB2 potenciales sitios para c-myc y E2F. Con el fin de estudiar si estos sitios podrían ser funcionales, aislamos y clonamos la región de interés. Estudios mediante genes reporteros corroboraron que factores de crecimiento activan a este promotor. Más importante aún, c-myc se mostró como un potente inductor del promotor de MageB2, mientras que E2F1 reprime su actividad. Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de MageB2 podría estar inducida por el oncogén c-myc para potenciar su efecto proliferativo. Siendo MageB2 un eficaz inhibidor de la apoptosis inducida por E2F1, la represión de E2F1 sobre MageB2 podría ser necesaria para la inducción de la apoptosis mediada por E2F1.

208. (280) ANÁLISIS MORFOMÉTRICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE MUESTRAS DE MELANOMA PARA LA OPTIMIZACIÓN INDIVIDUAL DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEURÓNICA EN BORO (BNCT)

Carpano, M.¹; Dagrosa, A.^{1,2}; Brandizzi, D.^{1,4}; Nievas, S.¹; Olivera, M.¹; Perona, M.¹; Rodríguez, C.¹; Cabrini, R.¹; Juvenal, G.^{1,2}; Pisarev, M.^{1,2,3}

Comisión Nacional de Energía Atómica¹ CONICET² Facultad de Medicina, UBA³ Facultad de Odontología, UBA⁴

Estudios clínicos publicados muestran para un mismo diagnóstico histopatológico y una misma aplicación de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT), diferentes respuestas tumorales. En estudios previos con ratones atímicos xenotransplantados con melanoma humano observamos un rango amplio de valores tumorales de captación de borofenilalanina (BPA) los cuales fueron correlacionados con la temperatura tumoral medida para cada animal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la correlación entre la captación de BPA y las características morfométricas e inmunohistoquímicas de muestras tumorales obtenidas en el mismo modelo animal. Ratones NIH *nude* implantados (s.c) con 3.10^6 de células de la línea de melanoma humano (IIB-MEL- J) fueron inyectados con BPA de forma ip en una dosis de 350 mg/Kg (p.c). A las 2 h post administración se evaluó contenido de boro en tumor y tejidos sanos (ICP-AES) y se fijaron muestras en formol 10% para estudios inmuno-histológicos. La captación de BPA en el tumor mostró una concentración máxima promedio de boro de 21.47 ± 5.4 ppm. El análisis individual mostró una correlación entre el contenido de boro y la viabilidad tumoral. El caso de mayor captación de boro (25.91 ppm de B) mostró una mayor área de viabilidad tumoral (AVT) (60%). Además también se observó una correlación directa con la cuantificación densitométrica del Ki-67, indicador de proliferación que fue de 0.34 OD/píxel (densidad óptica/píxel) para el caso tumoral de mayor contenido de boro. Los mismos tumores también presentaron un mayor área de vasos medida por CD 31 (indicador de vascularización) ($p < 0.05$). Estos resultados indicarían una correlación directa entre la captación de boro, la viabilidad, el estado proliferativo y la vascularización de los tumores. La obtención de indicadores indirectos de contenido de boro tumoral permitirán ajustar la dosis de neutrones a aplicar para la optimización individual de la terapia.

209. (300) MODULACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DE TUMORES DE PULMÓN POR TRATAMIENTO CON EL PÉPTIDO SINTÉTICO CIGB-300

Cirigliano, S.¹; Díaz Bessone, M.¹; Flumián, C.¹; Berardi, D.¹; Bal De Kier Joffé, E.¹; Farina, H.²; Todaro, L.¹; Urtreger, A.¹

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo¹ Universidad Nacional de Quilmes, Laboratorio de Oncología Molecular.²

La CK2 es una quinasa involucrada en crecimiento celular, supervivencia y apoptosis. El CIGB-300 es un péptido sintético capaz de unirse al dominio fosfoceptor de sustratos de CK2 inhibiendo su actividad. En este trabajo estudiamos el efecto del CIGB-300 sobre vías de señalización implicadas en progresión tumoral, ciclo celular y apoptosis. Además, analizamos efectos biológicos asociados a diseminación metastásica, empleando como modelo líneas celulares humanas (H125) y murinas (3LL) de cáncer de pulmón. El CIGB-300 presentó una dosis letal 50 (DL50) de 119 ± 2.4 μ M en células H125 y $138,3 \pm 9.9$ μ M en células 3LL. Mediante un ensayo con Anexina V-Fitc, observamos por fluorescencia que el tratamiento con CIGB-300 induce apoptosis en niveles comparables a otros inductores como Etopósido (10 μ M). Además, en forma concomitante con la inducción de muerte celular, se observó por Western blot (WB) la activación de caspasas y la disminución en la expresión de c-myc y las ciclinas D1 y D2. Los componentes de las vías de sobrevida de Wnt y NF κ B se determinaron mediante WB luego del tratamiento con CIGB-300. En la vía Wnt, observamos una importante disminución en los niveles de β -catenina nucleares mientras que en vía NF κ B se observó una disminución en los niveles nucleares de p65, fenómenos compatibles con la reducción de la sobrevida. Mediante

ensayos de "wound healing" pudimos determinar que el CIGB-300 induce una importante reducción en el potencial migratorio en forma dependiente de la dosis tanto para las células 3LL ($18,86 \pm 2,2\%$ vs $32,99 \pm 2,7\%$ para $1/4$ y $1/2$ DL50 resp. $p < 0,05$) como para H125 ($31,73 \pm 20,08\%$ vs $51,12 \pm 28,8\%$ para $1/4$ y $1/2$ DL50 resp. $p < 0,05$). Nuestros resultados indicarían que el tratamiento con CIGB-300 induce apoptosis y modula negativamente vías de señalización implicadas en la progresión maligna además de afectar la migración. Esta droga podría constituir en el futuro una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer de pulmón.

210. (303) EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA QUINASA C Y EL TRATAMIENTO RETINOIDE SOBRE RESPUESTAS BIOLÓGICAS ASOCIADAS AL CRECIMIENTO Y PROGRESIÓN TUMORAL DE CÉLULAS MAMARIAS MURINAS NMUMG

Díaz Bessone, M.; Berardi, D.; Cirigliano, S.; Flumian, C.; Bal De Kier Joffé, E.; Todaro, L.; Urtreger, A.

Instituto de Oncología Ángel H Roffo

La vía dependiente de la Proteína Quinasa C (PKC), se asocia con procesos de proliferación, apoptosis y transformación maligna mientras que, el sistema retinoideo está ampliamente implicado en diferenciación. En trabajos previos desarrollamos un modelo de células tumorales mamarias murinas que sobreexpresan PKC α ó PKC δ . Con este modelo se demostró que PKC α confiere un fenotipo más agresivo pero sensible al tratamiento retinoide (ATRA). Sin embargo la sobreexpresión de PKC δ no alteró los parámetros antes mencionados. En este trabajo nos propusimos determinar el efecto de la sobreexpresión de estas isoformas de PKC en un contexto celular normal. Para ello se transfectaron células NMuMG con las isoformas α y δ de PKC y se analizó la capacidad proliferativa, motilidad y producción de enzimas proteolíticas. La sobreexpresión de estas isoformas de PKC no indujo alteraciones morfológicas, ni causó variaciones en la capacidad proliferativa de las células NMuMG (tiempo de duplicación poblacional: $14,8 \pm 0,8$ hs). No se observaron diferencias en el potencial migratorio, entre los transfectantes y las células control (% de cubrimiento de la herida: $37,8 \pm 1,6$). El tratamiento con ATRA no afectó los parámetros antes mencionados. La sobreexpresión de PKC α incrementó la actividad de metaloproteasas (MMPs) secretadas respecto a las células control ($122,3 \pm 31,6$ vs. $9,8 \pm 5,4$ UA/mg prot, $p < 0,05$). Además, en las tres líneas celulares el tratamiento con ATRA indujo un aumento en la actividad de MMP9 mientras que redujo la de MMP2. A partir de estos resultados y los previos, concluimos que el tratamiento con retinoides beneficiaría a pacientes con tumores mamarios agresivos de altos niveles de PKC α e inocuo en un contexto celular normal. Si bien la sobreexpresión de PKC α en células NMuMG incrementa los niveles MMPs, esto podría vincularse con un fenómeno de regresión tumoral, similar a lo observado durante la involución mamaria post-lactancia, aunque resta evaluar su efecto biológico.

211. (307) LA HISTAMINA INDUCE LA ACTIVACIÓN DEL PROGRAMA DE TRANSICIÓN EPITELIAL MESENQUIMÁTICA EN LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

Mohamad, N.¹; Porretti, J.¹; Badenas, M.¹; Esnaola, M.¹; Rivera, E.¹; Cricco, G.¹; Martín, G.^{1,2}

Facultad de Farmacia y Bioquímica¹ CONICET²

La transición epitelial-mesenquimática (TEM) es un proceso biológico que permite a las células epiteliales adquirir características mesenquimáticas. Su inapropiada activación contribuye a la invasión y metástasis, confiriendo a las células de carcinomas epiteliales cambios en la adhesión, activación de la motilidad y la capacidad para degradar la matriz extracelular. En trabajos previos sobre las líneas celulares de adenocarcinoma pancreático Panc-1 y BxPC3 demostramos que la histamina, una amina biógena que puede actuar como factor de crecimiento en diversos tejidos tumorales, modula la proliferación celular en forma dosis dependiente aumentándola a concentraciones < 10 μ M. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la histamina sobre la TEM.

En las células tratadas con histamina en concentraciones < 10 μM se observó un aumento de la actividad de metaloproteasa-2 (PANC-1) y metaloproteasa-9 (BxPC3) evaluadas por zimografía, $p < 0.01$ vs control en ambos casos. También incrementó la migración celular, evaluada mediante cámaras de migración, en ambas líneas celulares ($p < 0.01$ vs control en ambos casos). Con respecto a la expresión de marcadores de TEM evaluados por inmunocitoquímica, la histamina aumentó la expresión de alfa actina de músculo liso, vimentina y caderina-N (marcadores mesenquimáticos). Estos resultados se confirmaron mediante inmunoblot ($p < 0.05$ vs control en todos los casos). Asimismo la expresión de caderina-E, proteína clave en la identidad epitelial celular, disminuyó en membrana celular y aumentó en citoplasma. En resumen la histamina es capaz no sólo de regular la proliferación celular en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático, sino de inducir algunos eventos relacionados con la activación del programa de TEM que favorecen la progresión maligna. Estos resultados abren la perspectiva para la investigación de antagonistas específicos de los receptores a histamina como moduladores de la progresión tumoral en el adenocarcinoma pancreático.

212. (346) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RHBDD2 EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEZA Y CUELLO (CECC)

Rabassa, M.; Lacunza, E.; Croce, M.; Abba, M.

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

La expresión del gen RHBDD2 se asocia con un pronóstico desfavorable en cáncer de mama y colon. El objetivo de este estudio fue analizar su expresión en el CECC. Se estudiaron 201 muestras; 14 normales, 15 hiperplasias, 10 displasias, 131 tumores primarios (100 hombres, 31 mujeres; rango de 29 a 82 años; localizados en cavidad oral, cavidad nasal, laringe y faringe), 14 metástasis y 17 recurrencias. Se realizó inmunohistoquímica estándar con recuperación antigénica. Se empleó un índice de reactividad (IR) = intensidad + porcentaje de reactividad; además se consideró el patrón de reacción. Resultados: 13/14 (93%) de las muestras normales y 100% de las hiperplasias y displasias fueron positivas. En estas muestras se observó una intensa tinción citoplasmática en la capa basal y en algunas se observó tinción de membrana plasmática en las capas superficiales del epitelio. Las displasias mostraron tinción nuclear (5/10; 50%). Los tumores primarios fueron positivos en 91/131 (70%) muestras, las recurrencias en 11/17 (65%) y las metástasis 10/14 (71%). Se halló una diferencia significativa en la expresión de RHBDD2 entre los tumores primarios vs. las muestras normales ($p = 0.040$), hiperplasias ($p = 0.001$) y displasias ($p = 0.001$). En los tumores primarios la tinción fue de intensidad variable, localizada en el citoplasma perinuclear. No se halló relación de la expresión de RHBDD2 con el sexo o edad. Los tumores de la faringe mostraron un alto porcentaje de positividad (82%) y un IR bajo; los provenientes de la cavidad oral y laringe mostraron un mayor IR que la media. Se observó una disminución del IR en tumores avanzados ($p = 0.021$) y en tumores indiferenciados ($p = 0.007$). No se encontró relación entre la supervivencia de los pacientes y la expresión de RHBDD2. En conclusión se constató una disminución significativa en la expresión de RHBDD2 en el CECC respecto de los controles y lesiones preneoplásicas, la cual fue marcada en tumores avanzados e indiferenciados.

213. (375) EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL CITOCROMO P450 (CYP) CON ACTIVIDAD DE 20-HIDROXILASA (20HO) Y EPOXIGENASA (EPO) EN FEOCROMOCITOMA (FEO) HUMANO Y MURINO

Colombero, C.; Fernández, M.; Barontini, M.; Pennisi, P.; Nowicki, S.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas CEDIE-CO-NICET

Las isoformas del CYP 20HO y EPO metabolizan al ácido araquidónico a sus derivados 20-hidroxiados y epóxidos que tienen efectos angiogénicos y tumorigénicos, entre otras acciones bioló-

gicas. Se ha reportado una mayor expresión de 20HO y EPO en varios tipos de tumores y la disminución de la progresión tumoral luego de su inhibición. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de las isoformas CYP4A11 y CYP4F2 (20HO), y CYP2J2 (EPO) en FEO. Se analizaron mediante PCR y Western blot células MPC3 (Mouse Pheochromocytoma Cells), tumores murinos generados por la inyección s.c. de estas células, y muestras de FEO humano de distinto origen genético: esporádicos (ESP), von Hippel Lindau (VHL), neoplasia endócrina múltiple (MEN 2A) o paraganglioma tipo 4 (PGL4) provenientes de resecciones quirúrgicas. No se encontró expresión de ninguna isoforma en las células MPC3, en cambio en los tumores murinos se identificaron las isoformas CYP4A12 (análogo murino del 20HO), CYPs 2C29, 2C38 y 2C44 (análogos de EPO). En FEOs humanos, el patrón de expresión de las isoformas fue distinto según el origen genético del tumor: el CYP2J2 se detectó en todos los tumores ESP ($n = 4$), PGL4 ($n = 4$) y MEN2A ($n = 3$) pero sólo en 1 de 5 VHL. El nivel de expresión del CYP (CYP/tubulina) fue mayor para el CYP4A11 en PGL4 vs. ESP (0.94 ± 0.06 vs. 0.25 ± 0.14 ; $p < 0.05$; $n = 4$), el CYP4F2 fue mayor en MEN2A vs. VHL (1.99 ± 0.28 vs. 1.19 ± 0.18 ; $p < 0.05$; $n = 3-4$). Esta es la primera evidencia de la expresión de CYP (20HO y EPO) en FEO. El hecho que tanto los FEOs murinos como humanos expresen estas isoformas, aunque con una expresión diferencial según el tipo de tumor, indica que estas vías de señalización son activas en estos tumores. La importancia de los productos de estos CYPs en la progresión del FEO requiere futuros estudios.

214. (392) EFECTO DE AGONISTAS/ANTAGONISTAS ADRENÉRGICOS EN LA MIGRACIÓN IN VITRO DE LÍNEAS TUMORALES DE MAMA HUMANA

Rivero, E.; Gargiulo, L.; Pérez Piñeiro, C.; Bruzzone, A.; Luthy, I.

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Hemos demostrado la expresión de receptores α_2 -adrenérgicos en líneas tumorales y no tumorales de mama asociados a un aumento de la proliferación celular y del crecimiento tumoral. La estimulación de los receptores β_2 -adrenérgicos, conocidos hace tiempo en la glándula mamaria normal y en líneas tumorales de mama humana, entre ellas, las líneas MDA-MB-231 y MCF-7, provoca la disminución de estos parámetros. El agonista β -adrenérgico isoproterenol (Iso) y el agonista β_2 -adrenérgico salbutamol (Salb, actualmente utilizado para el tratamiento del asma), al igual que el antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina, han demostrado ser muy efectivos en este aspecto. Sin embargo, para pensar en su utilización como terapia adyuvante en cáncer de mama deben realizarse más estudios sobre importantes aspectos de la progresión tumoral como la migración, invasión y la capacidad metastásica. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de compuestos adrenérgicos en la migración celular *in vitro* en las líneas mencionadas por las técnicas de herida en monocapa y migración en *transwell*. En la línea tumoral altamente invasiva MDA-MB-231, los agonistas β_2 -adrenérgico salbutamol y β -adrenérgico isoproterenol, provocaron una disminución de la migración celular (Salb 0.1 μM : 67 ± 9 vs. 100 ± 14 , $p < 0.01$ por ensayo de herida; Iso 1 μM , 52 ± 19 vs. 100 ± 8 , por *transwell*). Este efecto fue revertido por el antagonista β propanolol (1 μM , 93 ± 28 vs. Salb 0.1 μM , $p < 0.05$). Salb no produjo efecto en la migración de las células MCF-7 a la misma concentración; la disminución provocada por Iso no fue significativa (52 ± 6 vs. 100 ± 18). No se observó un efecto significativo del antagonista α_2 rauwolscina. En conclusión, aunque debe evaluarse el efecto sobre la capacidad metastásica *in vivo*, el agonista β_2 -adrenérgico salbutamol causó una disminución significativa de la migración celular en la línea invasiva MDA-MB-231, resultando promisorio para una posible utilización como terapia adyuvante.

215. (409) EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO MCF-7 CON EL PÉPTIDO DESMOPRESINA INDUCE CAMBIOS EN LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE CADHERINA EPITELIAL Y OTROS MIEMBROS DEL COMPLEJO ADHERENTE

Besso, M.¹; Rosso, M.¹; Lapyckyj, L.¹; Garona, J.²; Ripoll, G.²; Vazquez-Levin, M.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Laboratorio de Oncología Molecular (UNQ)²

Introducción: Cadherina Epitelial (CadE) es una glicoproteína de membrana clave en la adhesión intercelular, responsable del balance homeostático entre la sobrevida celular regulada por adhesión y la muerte celular programada inducida por disrupción de la adhesión. Se ha reportado que la administración peri-operatoria de Desmopresina (DDAVP) inhibe la acción de células metastásicas residuales, actuando a través del receptor de vasopresina de tipo 2 (V2R). Sin embargo, el efecto del tratamiento con DDAVP sobre la expresión y localización de CadE y proteínas del complejo adherente hasta el presente no ha sido reportado. **Objetivo:** Evaluar el efecto del tratamiento con DDAVP sobre la expresión y localización de CadE y otros miembros del complejo adherente en una línea celular de cáncer de mama humano. **Metodología:** Se utilizó la línea celular MCF-7 que expresa CadE y V2R. Las células fueron tratadas con DDAVP (100 y 1000 nM) o con vehículo (control) y procesadas para evaluar la expresión del ARNm y proteína de CadE y de otros componentes del complejo adherente. **Resultados:** Se verificó la expresión de CadE y V2R (transcripto y proteína) en células MCF-7 previo al tratamiento. Las células tratadas con DDAVP presentaron, respecto del control: 1) aumento de señal perinuclear de V2R, 2) disminución (~20%) en los niveles de ARNm de CadE, 3) niveles similares de la forma completa de CadE (120 kDa), 4) re-localización celular de CadE, con señal mayoritariamente citoplasmática, 5) localización intracelular de β -catenina y 6) alteraciones en el citoesqueleto de actina. **Conclusión:** El tratamiento de células MCF-7 con DDAVP altera la localización de CadE y proteínas asociadas. La disrupción del complejo adherente podría afectar la adhesión de las células tumorales diseminadas, inhibiendo su implantación en el órgano blanco.

- 216. (426) ESTUDIO DE LA 8-OXO-DEOXIGUANINA (8-OXO-DG) COMO MARCADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS ÁCIDOS NUCLEICOS Y SU UTILIZACIÓN PARA MEJORAR EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**
Leonardi, D.¹; Vallecorsa, P.²; Morales Bayo, S.³; De Siervi, A.¹; Meiss, R.²; Vazquez, E.¹; Cotignola, J.¹
Depto de Química Biológica, FCEN, UBA - IQUIBICEN CONICET¹ Departamento de Patología. Instituto de Estudios Oncológicos. Academia Nacional de Medicina.² Servicio de Urología. Hospital Municipal de Vicente López "Prof. Dr. Bernardo A. Houssay".³

El diagnóstico presuntivo del cáncer de próstata (CaP) se realiza mediante la cuantificación de los niveles séricos del Antígeno Prostático Específico (PSA), aunque su utilidad es discutida debido a su baja especificidad, ya que también se observa un aumento del PSA en la hiperplasia prostática benigna (HPB) y las prostatitis. El objetivo del trabajo es buscar una nueva herramienta que permita diferenciar al CaP de las otras patologías prostáticas para mejorar el diagnóstico. Se reclutaron dos grupos de pacientes del Hospital Municipal de Vicente López bajo un protocolo aprobado por el comité de ética: 1) grupo control con HPB y PSA normal (<4 ng/ml); y 2) grupo con CaP confirmado y PSA elevado (≥ 4 ng/ml). Se obtuvo sangre periférica, se separó el plasma y se cuantificó la 8-oxo-dG (marcador de estrés oxidativo) mediante la técnica de ELISA. Además, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) para 8-oxo-dG en muestras de biopsias de HPB y CaP. Se observó que los individuos con HPB presentaban valores significativamente más elevados de 8-oxo-dG plasmática comparado a los pacientes con CaP (promedio: $8820 \pm 511,5$ pg/ml vs $5661 \pm 396,2$ pg/ml, respectivamente; $p < 0,01$). Las biopsias de HPB no mostraron marcación por IHQ. Sin embargo, las biopsias con diagnóstico de CaP presentaron inmunorreactividad positiva localizada en las células no tumorales presentes en la muestra. Es ampliamente reconocido que los sistemas de reparación del daño oxidativo funcionan de manera deficiente en muchos tumores, por lo tanto las células acumulan daño oxidativo favoreciendo aún más la progresión del cáncer. La acumulación de la 8-oxo-dG detectada por

IHQ en el tejido de pacientes con CaP, podría explicar los menores niveles plasmáticos en estos pacientes comparado con los individuos con HPB. Los resultados preliminares presentados establecen una herramienta fácilmente aplicable en el diagnóstico del CaP, sin embargo se requiere un mayor número de pacientes para corroborarlos.

- 217. (446) CORRELACIÓN ENTRE LA RADIOSENSIBILIDAD INTRÍNSECA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO Y LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS**

Notcovich, C.¹; Delgado González, D.¹; Salguero, N.¹; Bracalente, C.²; Molinari, B.¹²; Duran, H.¹²³

Comisión Nacional de Energía Atómica-Centro Atómico Constituyentes¹ CONICET² UNSAM³

Uno de los efectos provocados por la radiación en el tratamiento de tumores con radioterapia es la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, las células de melanoma presentan una elevada resistencia a este tipo de tratamiento. A fin de conocer el comportamiento frente a la apoptosis inducida por radiación, este trabajo se planteó como objetivo caracterizar la respuesta radiobiológica de células de melanoma humano y estudiar si existe correlación entre la radiosensibilidad intrínseca de las células y la apoptosis. Se estudiaron las líneas celulares de melanoma humano MELJ, A375 y SB2 irradiadas con una fuente gamma (¹³⁷Cs). Su radiosensibilidad se evaluó mediante el análisis del parámetro α y el factor de sobrevida a 2 Gy (SF2) obtenidos de curvas de sobrevida ajustadas al modelo lineal cuadrático. La línea celular MELJ resultó la más radiorresistente ($\alpha = 0,150 \pm 0,034$ SF2 = 0,71), siendo más sensibles las líneas A375 ($\alpha = 0,45 \pm 0,028$ SF2 = 0,29) y SB2 ($\alpha = 0,41 \pm 0,004$ SF2 = 0,21). El proceso de apoptosis se evaluó a 0, 2, 6, 24 y 48 horas post-irradiación a 2 y 4Gy, a través de tinción de núcleos con Hoescht y Western Blot de PARP-1. En las tres líneas celulares se identificaron núcleos con morfología apoptótica, siendo A375 y SB2 las que presentan un porcentaje mayor que la línea MELJ ($p < 0,01\%$). En el mismo sentido, el western blot de PARP-1 mostró para MELJ una baja presencia de la forma clivada (indicador de apoptosis) en relación a las líneas A375 y SB2. Los resultados obtenidos permiten concluir que la línea celular MELJ, la más radiorresistente del modelo en estudio, es la que presenta menor apoptosis inducida por radiación, demostrándose una correlación entre la radiosensibilidad intrínseca de células de melanoma humano y la apoptosis. La comprensión de mecanismos de radiorresistencia de melanoma resulta de suma importancia en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que permitan la sensibilización al tratamiento por radioterapia.

CARDIOVASCULAR 1

- 218. (38) LA 3-METILADENINA, INHIBIDOR DE LA AUTOFAGIA, DISMINUYE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL AL CALCIO E INCREMENTA EL DETERIORO MITOCONDRIAL DE AURICULAS AISLADAS DE RATA SOMETIDAS A ISQUEMIA SIMULADA-REPERFUSIÓN**

Hermann, R.; Rusiecki, T.; Marina Prendes, M.; Torresin, M.; Savino, E.; Varela, A.

Cátedra de Fisiología, FFYB, UBA, IQUIMEFA-CONICET

Trabajos anteriores mostraron que en la aurícula izquierda aislada de rata sometida a 75 min isquemia (Is) – 75 min reperfusión simuladas (Rs), la 3-metiladenina (MA) genera un mayor desarrollo de contractura durante la Is, aparición de arritmias severas en la Rs y una menor respuesta inotrópica ante la estimulación β -adrenérgica al finalizar la Is-Rs. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta contráctil de la aurícula frente a dosis crecientes de Ca^{2+} , luego de ser sometida a Is-Rs en ausencia y en presencia de MA (5 mM). Se evaluó también la gravedad del daño mitocondrial al finalizar la Is-Rs. Se empleó aurícula izquierda aislada de rata (Sprague-Dawley) estimulada a 60/min, e incubada isométricamente en Krebs-Ringer- CO_3H (glucosa 10 mM, O_2 95%- CO_2 5%, pH 7,4). Luego de 60 min de estabilización, se inició la Is reemplazando el O_2 por N_2 y la glucosa por 2-desoxiglucosa 10 mM, pH 6,8-7,0. Se registró la fuerza sistólica pico

(FS), la fuerza diastólica final (FD), el índice fuerza-tiempo (IFT) y las velocidades de contracción (+dF/dt) y de relajación (-dF/dt), (n=6). La respuesta contráctil al Ca^{2+} (% con respecto al control pre-isquémico) se evaluó empleando concentraciones crecientes de Ca^{2+} (0-10,2 mM) y representando la magnitud del efecto en función de la $[Ca^{2+}]$. Se observó una reducción en la máxima respuesta contráctil al Ca^{2+} cuando la Is-Rs se realizó en presencia de MA vs en su ausencia: FS: $36,67 \pm 1,36$ vs $99,50 \pm 9,19$ %; $p < 0,01$. IFT: $22,25 \pm 2,74$ vs $70,00 \pm 18,25$ %; $p < 0,05$. +dF/dt: $49,25 \pm 8,99$ vs $100,14 \pm 8,37$ %; $p < 0,05$. -dF/dt: $33,20 \pm 5,74$ vs $98,50 \pm 22,29$ %; $p < 0,05$. No se modificó la FD. Por otra parte, las micrografías electrónicas (20000X), obtenidas al finalizar la Rs mostraron edema con separación de crestas y aclaramiento de la matriz mitocondrial más severo en presencia de la MA que en su ausencia. Los resultados indican que el inhibidor de la autofagia ejerce efectos nocivos en la aurícula aislada de rata sometida Is-Rs.

219. (66) CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE CALCIO DE MITOCONDRIAS DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS ESPONTÁNEAS

Ciocci Pardo, A.; Mosca, S.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata

Previos trabajos muestran que el aumento del calcio mitocondrial es uno de los factores responsables de la formación y/o apertura del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM). Nuestro objetivo fue determinar en mitocondrias aisladas de ratas macho normotensas Wistar Kyoto (WKY) e hipertensas espontáneas (SHR) de 5 meses de edad la capacidad de retención de calcio (CRC) y establecer la posible relación con los niveles de presión arterial (PA). Para ello utilizamos el indicador fluorescente Calcium green que nos permitió evaluar la respuesta de muestras de la suspensión mitocondrial al agregado de pulsos sucesivos de 10 μM de Ca^{2+} . Cuando la mitocondria no puede retener más el Ca^{2+} , el PPTM se abre y la concentración de este ión aumenta en el medio de incubación. Los parámetros medidos fueron: el número de pulsos, la CRC (nmoles Ca^{2+} /mg proteína), el tiempo total (seg) y el tiempo empleado por cada pulso (seg) obtenidos antes del aumento del Ca^{2+} extramitocondrial. La presión arterial fue de 125 ± 1 y de 246 ± 9 mmHg para WKY y SHR, respectivamente. El número de pulsos, la CRC y el tiempo total fueron significativamente mayores mientras que el tiempo de cada pulso fue menor para WKY comparados con SHR. Estos valores fueron: 13 ± 1 vs. 4.5 ± 0.4 , 520 ± 40 vs. 180 ± 14 nmoles/mg prot, 566 ± 25 vs. 337 ± 49 seg y 44 ± 4 vs. 77 ± 12 seg. Entre PA y CRC se estableció una correlación negativa con alta significación estadística ($r = 0.988$; $p < 0.0001$). Estos resultados muestran que la CRC es mayor en WKY que en SHR y que esta diferencia estaría estrechamente asociada a los niveles de PA. Por otra parte, estos datos sugieren que las velocidades de entrada y salida de Ca^{2+} de la mitocondria serían menores en las SHR.

220. (496) INHIBICIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA TRX-1 SOBRE EL TAMAÑO DE INFARTO EN RATONES EN EDAD MEDIA DE LA VIDA

Pérez, V.¹; D'Annunzio, V.¹; Carreras, C.²; Poderoso, J.²; Sadoshima, J.³; Gelpi, R.¹

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular - Dpto. de Patología - Facultad de Medicina - UBA¹ Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital Universitario, UBA² Cardiovascular Research Institute - Department of Cell Biol and Mol Medicine - UMDNJ-New Jersey³

La tioredoxina-1 (TRX-1) tiene un efecto protector frente a la injuria por isquemia/reperfusión, sin embargo no se ha estudiado que ocurre en la edad media de la vida, donde los mecanismos pro-oxidantes pueden alterar la función de las proteínas; y por otro lado los mecanismos involucrados en la protección por TRX-1 no están del todo dilucidados. El objetivo principal fue evaluar el tamaño de infarto en ratones transgénicos (TG) TRX-1 jóvenes (3 meses) y de edad media (12 meses), comparándolos con sus respectivos no transgénicos (NTG). Un segundo objetivo fue eva-

luar la actividad, expresión y nitración de TRX-1 en ratones TG, y estudiar si Akt está involucrada en la protección. Para ello se utilizaron ratones TG con sobreexpresión cardíaca de TRX-1 jóvenes (TG-J n=6) y de edad media (TG-EM: n=7) con sus respectivos controles NTG (NTG-J: n=5 y NTG-EM: n=6), los mismos fueron sometidos a 30 min de isquemia y 120 min de reperfusión (técnica de Langendorff). Se midió el tamaño de infarto (trifenil tetrazolio) y la expresión de Akt y fosfo-Akt (western blot). Además se estudió la actividad de TRX-1 (ensayo de reducción de la insulina) y se evaluó la nitración cardíaca y expresión de TRX-1 (western blot). El tamaño de infarto en los TG-J fue menor que en los NTG-J (NTG-J: 42.8 ± 6.1 % vs TG-J: 27.6 ± 3.5 %, $p < 0.05$), sin cambios en los ratones de edad media (NTG-EM: 49.1 ± 6.3 vs TG-EM: 52.6 ± 5.2 %, ns). La falta de protección en los ratones TG-EM se acompañó por una disminución de la actividad del 57.9 ± 0.6 % de TRX-1 con un incremento en la nitración del 11.1 ± 0.2 % en los TG-EM. La protección en los ratones TG-J involucró un aumento en la fosforilación de Akt durante la reperfusión (TG-J: 42.2 ± 2.4 %; NTG-J: 31.9 ± 1.7 %, $p < 0.05$). Nuestros datos sugieren que los ratones TG-J presentan un menor tamaño de infarto a través de la activación de fosfo-Akt, mientras que en los ratones TG-EM ésta protección no se evidencia debido a una inactivación de TRX-1 por incremento de la nitración.

221. (134) PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y ESTADO ANTIOXIDANTE COMO APORTE AL ESTUDIO DE LA MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA

Darrigo, M.¹; Lioi, S.¹; Gerrard, G.¹; Diviani, R.¹; Ceruti, M.¹; Beloscar, J.²

FBIOYF UNR¹ CARRERA DE CARDIOLOGIA FCM UNR²

Si bien la patogenia de la Miocardiopatía Chagásica (MCC) aún es polémica, la aparente acción crónica del parásito y la inflamación conducirían a alteraciones en el estado antioxidante celular, el cual podría contribuir a la progresión de la enfermedad. Dada la evolución maligna de la Enfermedad de Chagas, la carencia de suficientes conocimientos biológicos y clínicos que permitan anticipar quienes de los afectados tienen riesgo agravado, nuestro propósito es brindar un aporte al estudio del paciente chagásico asintomático, que permitiría acceder al conocimiento de su prevalencia, predisposición hacia el deterioro cardíaco y agotamiento de la capacidad antioxidante. En este estudio se intenta establecer el rol de polimorfismos genéticos de superóxido dismutasa dependiente de Mn (SODMnAl9Val) y de catalasa (CATC272T), enzimas involucradas en el estrés oxidativo, como probables factores de riesgo de MCC. Se analizaron 4 grupos de individuos: sanos (S n: 53), chagásicos sin MCC (EC sin MCC n: 25), (MCC n: 33) y con cardiopatía no chagásica (CnoC n: 45). La caracterización molecular se realizó por PCR-RFLP y las actividades enzimáticas por técnicas espectrofotométricas. Se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal y se aplicó Kruskal Wallis. Las FG para CAT (IC 95%): S (CC 0.64, CT 0.36); EC sin MCC (CC 0.84, CT 0.16); MCC (CC 0.70, CT 0.30), CnoC (CC 0.64, CT 0.36) y para SODMn (IC 95%): S (AlaAla 0.54, AlaVal 0.33, ValVal 0.13); EC sin MCC (AlaAla 0.36, AlaVal 0.46, ValVal 0.18); MCC (AlaAla 0.35, AlaVal 0.30, Va/Va 0.35), CnoC (AlaAla 0.85, AlaVal 0.15, Va/Va 0.0) . En relación al estudio de la FG de SOD-Mn entre chagásicos y S se observaron diferencias ($p < 0.01$). Las actividades de catalasa, SOD y GPx mostraron diferencias ($p < 0.01$). La información obtenida podría contribuir a ampliar nuestro conocimiento de la fisiopatogenia de la Enfermedad de Chagas y a mejorar el diagnóstico y pronóstico de sus complicaciones.

222. (137) AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE TRH EN LA HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA (HVI) DEL RATON OBESO E HIPERLEPTINEMICO AGOUTI

Peres Diaz, L.; Landa, M.; Pirola, C.; García, S.

Lab. Cardiología Molecular, Inst. Inv. Med. A Lanari, UBA: IDIM-CONICET

Hemos demostrado que el aumento de TRH local induce HVI en la rata. También que su inhibición prolongada previene el desarrollo de HIV en el modelo de la SHR adulta, a pesar de la

franca hipertensión presente. Por otro lado, hemos demostrado a nivel del SNC la leptina aumenta la presión arterial (PA) mediante la inducción de la expresión de la TRH. Así, resultó interesante estudiar el modelo del ratón agouti, que posee una resistencia central a la leptina, presentando obesidad con hiperleptinemia. Basados en que se han descrito receptores de leptina en el corazón, hipotetizamos que la hiperleptinemia podría estar induciendo la expresión de TRH y conllevar a un fenotipo de HVI. Utilizamos machos Agouti comparados con controles C57 de 12 semanas, n=10. Al caracterizar la cepa confirmamos el aumento de peso (gr) (AG:45+3 vs C57: 30+4, p<0.01). Observamos un índice de hipertrofia cardíaca aumentado en los ratones obesos (p corazón/ longitud de la tibia) (AG: 0.085+5 vs C57:0.066+4, p<0.01) así como un significativo aumento de la PA sistólica (pletismografía, mmHg) (AG:90 + 5 vs C57: 75+5). Cuantificamos la expresión (mRNA, real t -RT-PCR) del precursor de TRH y de diferentes marcadores de daño BNP y BMHC (hipertrofia), colágeno tipo III (fibrosis) en estos grupos y observamos (ANOVA, Tukey test) un aumento de 3 veces en la expresión de TRH en el VI de los ratones obesos (p<0.02) que correlacionó con aumentos significativos de cada uno de los marcadores analizados en la cepa agouti (p< 0.05) (BNP: 220%; Col III : 190%; BMHC AG:170%). Nuestros resultados muestran que el ratón agouti presenta una hipertrofia ventricular con aumento de la expresión de la TRH cardíaca resultando un buen modelo para estudiar si la inducción de la TRH cardíaca por leptina participa de la hipertrofia cardíaca inducida por obesidad y abre la posibilidad de que la hiperleptinemia del paciente obeso induzca HVI por este mecanismo en forma relativamente independiente de la PA.

223. (146) MODULACIÓN DE LA CONTRACTILIDAD CARDÍACA POR EL ÓXIDO NÍTRICO (NO) ENDÓGENO. EFECTOS DE LA HIPOXIA HIPOBÁRICA DE CORTA DURACIÓN

La Padula, P. ; Bonazzola, P. ; Costa, L.

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA

En estudios previos mostramos cardioprotección y aumento en la producción de NO en la hipoxia hipobárica crónica (J Appl Physiol, 2008). En este trabajo se evaluó la capacidad del NO endógeno del miocardio para modular la contractilidad en condiciones basales y durante la estimulación β -adrenérgica, la respuesta al Ca^{2+} y a la hipoxia/reoxigenación (H/R) en músculos papilares aislados de ventrículo izquierdo de ratas sometidas a 58.7 kPa en una cámara de hipopresión durante 48 h (HH) y en sus controles a 101.3 kPa (C). Ambos músculos papilares de cada rata se estudiaron paralelamente, uno suplementado con el sustrato de la NO sintasa (NOS) L-arginina (arg) 2 mM, para obtener la máxima producción fisiológica de NO, y el otro en presencia de inhibidor (inh) de la NOS (L-NNA y L-NAME, 2 mM), para bloquear la generación de NO. Se determinó secuencialmente, en condiciones isométricas, la tensión desarrollada basal (TDb), luego de la adición de arg o inh, en respuesta a concentraciones crecientes de isoproterenol (iso, 10^{-9} a 10^{-4} M), de Ca^{2+} (1.3 a 2.8 mM), y durante un período de H/R de 60/30 min. La TDb (g/mm²) fue C: 1.5 ± 0.3 y HH: 1.5 ± 0.3 . Los resultados significativos (p<0.05) se expresan como media \pm SE, arg vs. inh, en % de TDb. Tanto arg como inh modificaron la TD transitoriamente, normalizándose a los 8 min. El efecto máximo fue C: 126 ± 6 vs. 76 ± 5 y HH: 124 ± 3 vs. 82 ± 3 . La respuesta máxima al iso fue C: 196 ± 27 vs. 118 ± 10 y HH: 172 ± 23 vs. 176 ± 28 (NS). La concentración máxima de Ca^{2+} aumentó la TD aproximadamente 10% mientras que 60 min de H la disminuyó un 90% en todos los grupos experimentales. La capacidad de recuperación de la TDb al cabo de la R fue C: 98 ± 8 vs 53 ± 9 y HH: 41 ± 9 vs 40 ± 9 (NS). En conclusión, el NO moduló la contractilidad basal en ambos grupos de manera similar, mientras que sólo en C la respuesta β -adrenérgica y la tolerancia a la H/R fueron moduladas por el NO, cuya producción sería activada por el iso. *PIP 1688/09*

224. (153) EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC) A DISTINTOS TIEMPOS DE ADMINISTRACIÓN EN RATAS WISTAR CON DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICAS

SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO Y LA VISCOSIDAD SANGUÍNEA

Dominighini, A.1; Gonzalez, J.1; Crosetti, D.1; Ronco, M.2; Urli, L.1; Frances, D.2; Monti, Juan2; Wagner, Marcelo3; Carnovale, Cristina2; Luquita, Alejandra1

Cat. Biofísica. Fac. Cs. Médicas.UNR1 Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, CONICET2 Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA3

La infusión de Lc o "muérdago criollo" en medicina popular se utiliza para dar mayor fluidez a la sangre disminuyendo el exceso de colesterol (Co) plasmático. Hemos demostrado que ratas tratadas con extracto crudo de Lc por vía intraperitoneal (i.p.), disminuyen el Co plasmático y aumentan la viscosidad sanguínea (VS). Del extracto crudo se purificó Proantocianidina (PLc). Objetivo: analizar el efecto del tratamiento de PLc a distintos tiempos, sobre la concentración de Co plasmático y la viscosidad sanguínea (VS). Métodos: Ratas Wistar macho adultas 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=12) inyectadas i.p. con solución fisiológica y Tratadas (T) inyectadas i.p. con PLc 3 mg /100g peso corporal, cada 24 horas durante 3(n=6) y 7(n=6) días. Al cuarto y octavo día, respectivamente, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal, i.p.), obteniéndose sangre por punción cardíaca. Se determinaron Co (método enzimático de esterasa-oxidasa), CoHDL, y CoLDL en plasma. Con viscosímetro rotacional Wells- Brookfield LVT- a $230\ s^{-1}$, a $37\ ^\circ C$ se determinaron VS (sangre) y VP (plasma). VS relativa estandarizada a un hematocrito (VSrs) del 45%, se calculó como= (VS/VP) 45/ Hto. Resultados: (media \pm ES). Co plasmático (mg %): C : $121,80 \pm 2,21$, T₃: $71,56 \pm 3,64^*$, T₇: $67,66 \pm 1,17^*$; Co HDL: C : $31,83 \pm 0,94$, T₃: $22,10 \pm 2,37^*$, T₇: $28,04 \pm 1,89^*$; CoLDL : C: $26,38 \pm 0,90$, T₃: $13,59 \pm 1,08^*$, T₇: $18,00 \pm 0,29^*$; VSrs: C: $5,58 \pm 0,19$, T₃: $6,26 \pm 0,39^{ns}$, T₇: $4,65 \pm 0,15^*$ (*p<0,05 y ns: no significativo, vs. C). Conclusión: El tratamiento con PLc (administrados durante 3 y 7 días) produce un descenso de Co plasmático, Co HDL y CoLDL incrementando la fluidez sanguínea después de 7 días de tratamiento en ratas alimentadas con dieta hipercolesterolémica.

225. (160) CORRELACIÓN ENTRE HIPERHOMOCISTEINEMIA Y EL POLIMORFISMO 677CT DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA CON LA ESTIMACIÓN FRAMINGHAM DE RIESGO DE ENFERMEDAD VASCULAR (ATP III-FRS)

Gariglio, L.1; Riviere, S.2; Morales, A.2; Potenzoni, M.1; Porcile, R.1; Fridman, O.23

Hospital Universitario. Universidad Abierta Interamericana1 Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud. Universidad Abierta Interamericana.2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.3

El Framingham Risk Score (ATP III-FRS) es una herramienta predictiva de riesgo bajo, moderado y alto de enfermedad vascular (coronaria, cerebrovascular y arterial periférica; CAD), basado en sexo, edad, colesterol total, C-HDL, tratamiento antihipertensivo, tabaquismo, diabetes e historia de enfermedad vascular (HEV). Otros biomarcadores como la homocisteinemia (tHcy) son factores independientes de riesgo de CAD. Se compararon los niveles de tHcy y la presencia del polimorfismo 677CT de la enzima metiléntetrahidrofolato reductasa (MTHFR), de la vía de remetilación de la homocisteína, con el ATP III-FRS en una población de la Ciudad de Buenos Aires. **Métodos.** Estudio transversal. Consentimiento informado y cuestionario. Criterios de exclusión: menores de 18 años e ingesta de vitaminas. Polimorfismo C677T por PCR-RFLP. tHcy en ayunas por quimioluminiscencia. Estadística: test-t Student, ANOVA y análisis de regresión logística. **Resultados.** Población compuesta por 233 sujetos (varones y mujeres) entre 18 y 79 años. En sujetos de riesgo bajo, moderado y alto, las edades promedio fueron respectivamente $40,8 \pm 14,6$; $62,3 \pm 11,9$ y $58,9 \pm 9,3$ años, colesterol total $199,7 \pm 43,3$; $228,5 \pm 50,9$

y 256,8±57,9 mg/dl, HDL-C 56,3±14,2; 52,7±12,8 y 40,3±7,3 mg/dl, hipertensos 20,5%; 67,6% y 70,6%, fumadores 34,3%; 32,4% y 76,5%, diabéticos 3,6%; 5,4% y 47,1%, HEV 47,6%; 63,9% y 58,8%. La tHcy correlacionó positivamente con riesgo de CAD, siendo los valores en los de bajo riesgo 7,32±2,03 µmoles/L, en los de moderado 10,65±3,94 y en los de alto 9,1±3,08 (p<0,001 moderado y alto vs bajo); Tercer y cuarto cuartiles de tHcy mostraron significativamente (p<0.05) mayores OR de riesgo de CAD comparados con el primer cuartil. La presencia del polimorfismo 677CT de la MTHFR no correlacionó con los niveles de riesgo de CAD. **Conclusiones.** El riesgo de CAD evaluado por el ATP III-FRS correlacionó positivamente con la hiperhomocisteinemia pero no con la presencia del alelo T del polimorfismo 677CT MTHFR

226. (297) EL AUMENTO DE LEPTINA EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO SE ASOCIA CON MARCADORES DE PLACA VULNERABLE

Fernández Machulsky, N.¹; Miksztoiwicz, V.¹; Fabre, B.²; García Escudero, A.³; Blanco, R.³; Rodríguez, A.³; Gagliardi, J.³; Berg, G.¹

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA¹ Laboratorio de Endocrinología. Depto. Bioquímica Clínica-INFIBIOC. Facultad de Farmacia y Bioquímica-² Sección Hemodinamia, División Cardiología, Hospital Argerich³

La leptina es una hormona producida, principalmente, por el tejido adiposo, con múltiples funciones metabólicas. Recientemente se la asocia al desarrollo de enfermedad cardiovascular e infarto agudo de miocardio (IAM) con aumento de la actividad del sistema nervioso simpático. La vulnerabilidad de la placa aterosclerótica se asocia a un incremento en los glucocorticoides conjuntamente con metaloproteasas (MMPs), sin embargo, se desconoce el efecto de la leptina sobre estos marcadores. **Objetivo:** evaluar el comportamiento de leptina, cortisol y MMPs en pacientes hospitalizados con IAM tratados con angioplastia primaria (n=49, 57±12 años), en la internación y tres meses posteriores, y en pacientes coronarios estables (controles) (n=12, 64±10 años). Se midieron peso, talla, tensión arterial y circunferencia de cintura. En suero se determinó leptina y cortisol y en plasma actividad de MMP-2. **Resultados:** en el momento del IAM en comparación con 3 meses se observó aumento de leptina (p=0,006), cortisol (p=0,001) y MMP-2 (p=0,001), así como al comparar con controles (p=0,04; p=0,001 y p=0,001) respectivamente. No se observaron diferencias entre controles vs 3 meses en ninguno de los parámetros. Leptina correlacionó con índice de masa corporal (r=0,48; p=0,01), cortisol (r=0,24; p=0,03) y MMP-2 (r=0,30; p=0,03). Los valores de MMP-2 resultaron significativamente mayores en los pacientes con IAM de localización anterior o combinado respecto de los pacientes con IAM de cara inferior o lateral (1,0349 ± 0,18 vs 0,9230 ± 0,12; p=0,045). **Conclusiones:** El incremento de leptina, con conocida acción sobre la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, causaría la desregulación del eje hipotálamo hipofísico adrenal con aumento de secreción de cortisol. El mecanismo inflamatorio asociado conduciría a un aumento en la actividad de MMPs, y a través de este a mayor vulnerabilidad de la placa aterosclerótica y probablemente a un mayor tamaño de infarto.

227. (21) LA MMP-2 ES RESPONSABLE DE LA DEGRADACION DE LA DITROFINA DURANTE LA ISQUEMIA MIOCARDICA AGUDA

Siachoque, N.¹; Rodríguez, M.¹; Buchholz, B.¹; Miksztoiwicz, V.²; Berg, G.²; Donato, M.¹; Gelpi, R.¹

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, F. Medicina. UBA¹ Instituto de Lípidos y Lipoproteínas, FFBYB - UBA²

Objetivo: determinar si la distrofina es blanco de la calpaína o de la MMP-2, y si su degradación ocurre durante un episodio de isquemia aguda. Materiales y métodos: corazones aislados de conejos neozelandeses fueron perfundidos según la técnica modificada de Langendorff y sometidos a 30 minutos de isquemia global. En un segundo grupo, antes de la isquemia global se administró doxiciclina (inhibidor de MMP; 50µM). Además, en corazones no sometidos a isquemia (normóxicos) se administró

SIN-1 (Estimulador de la producción de ONOO⁻; 100 mM) y se realizó un seguimiento por 30 min. Se consideró como control un grupo de corazones que fueron perfundidos en normoxia durante 30 min. Se evaluó la peroxidación lipídica a través de la técnica de TBARS, se analizó la expresión de distrofina y espectrina por Western blot y la actividad de MMP-2 por zimografía. **Resultados:** Se observó una degradación de la distrofina durante la isquemia, de un 79% respecto a el valor del grupo control (p<0.05); sin cambios en los niveles de espectrina. Dado que la espectrina es un sustrato específico de la calpaína, este resultado descarta la participación de la calpaína en la degradación de distrofina. Por otro lado, durante la isquemia hubo un aumento de la actividad de la MMP-2 de un 71% respecto a el valor del grupo control (p<0.05). La administración de doxiciclina (inhibidor de MMP), administrado antes de la isquemia, previno la degradación de la distrofina. La administración de SIN-1 a corazones normóxicos aumentó la concentración de TBARS un 33% (p<0.05), la actividad de la MMP-2 un 36 % (p<0.05) y redujo significativamente los niveles de distrofina a un 61% respecto del control (p<0.05). **Conclusión:** Los resultados demuestran que la distrofina es sustrato de la MMP-2 en el contexto de la injuria isquémica, sugiriendo un posible mecanismo por el cual las MMPs median la lesión miocárdica isquémica.

228. (298) METABOLISMO OXIDATIVO EN PULMÓN LUEGO DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON METALES

Magnani, N.¹; Marchini, T.¹; Mebert, A.²; Desimone, M.²; Diaz, L.²; Alvarez, S.¹; Evelson, P.¹

IBIMOL-CONICET, Química General e Inorgánica, FFyB, UBA¹ IQIIMEFA-CONICET, Química Analítica Instrumental, FFyB, UBA²

El material particulado (MP) proveniente de la contaminación ambiental presenta, adsorbido en su superficie, un alto contenido de metales de transición capaces de generar aumentos en la producción de especies oxidantes y daño oxidativo en el pulmón. El objetivo del trabajo fue analizar el efecto de los metales de transición presentes en el MP sobre el metabolismo oxidativo en pulmón de ratón. Para ello, se construyeron nanopartículas cargadas con Cr y Ni, por el método de Stöber. Se determinó su diámetro mediante la técnica de dispersión de luz (diámetro promedio: 0,1–1,0 µm) y su contenido por absorción atómica y electroforesis capilar (20 mg metal/g MP). La exposición al MP se realizó por instilación intranasal (0,01; 0,05; 0,1; 1 mg de metal/kg peso). Las determinaciones se realizaron 1 h luego de la exposición. Se realizaron medidas de consumo de O₂ tisular por una técnica polarográfica y de daño oxidativo a lípidos a través del contenido de TBARS en homogeneizados. Luego de la exposición al MP con Cr se observó un aumento significativo para la concentración de 0,05 mg/kg tanto en el consumo de O₂ total (control: 291 ± 19 ng-at O/min. g tej; p < 0,05) como en el consumo no mitocondrial (en presencia de KCN) (control: 84 ± 9 ng-at O/min. g tej; p < 0,05). La exposición al MP con Ni mostró aumentos significativos en todas las concentraciones evaluadas (control: 312 ± 15 ng-at O/min. g tej; p < 0,05), pero sólo las concentraciones 0,1 y 1 mg/kg mostraron aumentos significativos luego de la inhibición por KCN (control: 97 ± 15 ng-at O/min. g tej; p < 0,05). Se observó un aumento significativo en el contenido de TBARS para las concentraciones más altas de Cr (0,1 y 1 mg/kg), mientras que todas las concentraciones de Ni evaluadas presentaron aumentos significativos (control: 198 ± 10 pmol/mg prot; p < 0,05). La exposición al MP con Cr ó Ni muestra efectos diferenciales sobre el metabolismo oxidativo pulmonar, desencadenando procesos inflamatorios y produciendo daño oxidativo.

GASTROENTEROLOGÍA, METABOLISMO Y NUTRICIÓN 2

229. (344) CONSUMO DE OXÍGENO MITOCONDRIAL Y DAÑO OXIDATIVO EN DISTINTAS ÁREAS DEL CEREBRO DE RATA POR SOBRECARGA DE COBRE

Saporito Magriñá, C.¹; Musacco Sebio, R.¹; Semprine, J.¹; Repetto, M.¹²

Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL-UBA-CONICET)²

La sobrecarga crónica del Cu en el cerebro produce neurotoxicidad, daño oxidativo y aumento del consumo de oxígeno (O₂) mitocondrial en estado activo y en estado de reposo. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del Cu sobre la actividad mitocondrial en distintas áreas del cerebro de rata para caracterizar los cambios bioquímicos involucrados en la generación de daño oxidativo. Ratas Sprague Dawley machos (150 g) recibieron Cu(II) en el agua de bebida (0,5 g/L) durante 21 días. Se determinó la quimioluminiscencia espontánea de órgano (QI) y el consumo de oxígeno (CO) en corteza, hipocampo y cuerpo estriado de cerebro y en mitocondrias aisladas de cada área. Se estimó el control respiratorio (CR). En corteza se observó un aumento significativo del 125% de QI respecto al control (C: 16 + 2 cps/g órgano, p < 0.001); del 13% del CO en estado activo (III) (C: 76 + 3 nmol O₂/min mg prot, p < 0.01) y del 19% CO en estado de reposo (IV) (C: 13,5 + 0,5 nmol O₂/min mg prot) (p < 0.01) con malato-glutamato como sustrato; en hipocampo, se observó disminución significativa del 20% (p < 0.05) en presencia de cianuro (CN⁻) (C: 173 + 12 nmol O₂/min g, p < 0.001), y del 36% sin CN⁻ (C: 1215 + 18 nmol O₂/min g, p < 0.001), y en cuerpo estriado solamente disminución del 32% con CN⁻ (C: 175 + 16 nmol O₂/min g, p < 0.001), sin cambios a nivel mitocondrial. En ninguna de las tres áreas se observaron cambios en el CR respecto al control. La sobrecarga de Cu en hipocampo genera disminución del CO en el tejido, sin cambios a nivel mitocondrial, indicando que el transporte de electrones a nivel de la cadena respiratoria no se ve afectado; el cambio podría deberse a alteraciones metabólicas. En corteza, el incremento de CO mitocondrial indica que en condiciones fisiológicas, con suministro de sustrato y ADP, el transporte de electrones puede funcionar a una mayor capacidad. Sin embargo, la funcionalidad respiratoria no se ve afectada ya que no se registraron cambios en el CR.

230. (345) DAÑO OXIDATIVO IN VIVO POR SOBRECARGA CRÓNICA DE COBALTO Y NIQUEL EN HÍGADO Y CEREBRO

Ferrarotti, N.¹²; Semprine, J.¹; Musacco Sebio, R.¹; Saporito Magriñá, C.¹; Repetto, M.¹³

Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Microbiología Clínica, Inmunología y Virología Clínica, Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas.² Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL-UBA-CONICET)³

La exposición crónica a metales de transición altera la homeostasis celular mediante la oxidación de biomoléculas y genera daño oxidativo (DO). El objetivo de este trabajo fue comparar los fenómenos oxidativos inducidos por exposición crónica a cobalto (Co) y níquel (Ni) en hígado (H) y cerebro (Ce). Se administró a tres grupos de ratas Sprague Dawley (250 g): agua (controles, C), CoCl₂ y NiSO₄ (0,1 g/L en agua de bebida) durante 42 días (d). Se evaluaron marcadores de DO en H y Ce respecto al control (C): Quimioluminiscencia de órgano in vivo (QI), oxidación de lípidos (TBARS); oxidación de proteínas (carbonilos), metabolitos del óxido nítrico (NO₂⁻) y actividad de NADPH oxidasa. H: se observó: incremento del 30% de carbonilos (C: 326±1 nmol/g, p<0.05) por Co, y del 67% en QI (C:169±11cps/cm², p<0.01), 27% de TBARS (C:52±4 nmol/g, p<0.001) a los 14 d y 48% de NO₂⁻ (C:0,9±0,1 µmol/g, p<0.05) a los 7 d por Ni. La actividad de NADPH oxidasa incrementó 185% por Co y 28% por Ni a los 42 d (C:47±1 nmol/min x g, p<0.001). Ce: incrementó: QI 5 veces por Co y Ni (C:162±8 cps/cm², p<0.01) a los 14 d, TBARS 5 veces (C:11±2 nmol/g, p<0.001) por Co a los 7 d y 8,5 veces por Ni (p<0.05) a los 14 d, carbonilos 78% (C:374±33 nmol/g) a los 42 d por Co y 44% por Ni a los 7 d (p<0.01), NO₂⁻ un 23% (p<0.01) por Ni a los 7 d, y NADPH oxidasa 18 veces por Co a los 14 d, y por Ni, 3 veces a los 7 d y 30 a los 42 d (C:11±1 nmol/min,g, p<0.001).

QI in vivo refleja el DO por exposición crónica a Co y Ni en H y Ce generado por la oxidación de biomoléculas mediante procesos diferentes. En H, el Co genera DO por procesos que involucran la oxidación de proteínas, y el Ni, mediados por la oxidación de lípidos y metabolismo del NO. En ambos casos, seguidos por la activación de NADPH oxidasa. En Ce, la oxidación de lípidos son procesos tempranos que generan DO por exposición a Co y Ni, mientras que la oxidación de proteínas es un proceso posterior, precedido por la activación de NADPH oxidasa.

231. (399) RELACIÓN ENTRE PRESIÓN ARTERIAL, CALCURIURIA Y BAJA MASA ÓSEA

Vicco, M.¹²³; Parodi, G.³; Ferini, F.³; Luz, R.³; Gaydou, A.³; Musacchio, H.²³

Laboratorio de Tecnología Inmunológica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral - CONICET¹ Facultad de Ciencias Médicas - Área de Clínica Médica² Hospital J. B. Iturraspe³

Introducción. Se ha postulado la existencia de una relación entre hipertensión arterial y osteoporosis. La hipertensión arterial aumentaría persistentemente la calciuria, lo que produciría una disminución de la masa ósea. El objetivo de este estudio fue evaluar la relaciones entre masa ósea, presión arterial y calciuria. Materiales y métodos. Se realizó un estudio descriptivo transversal mediante un muestreo no probabilístico de conveniencia, aprobado por el comité de Bioética de la Universidad Nacional del Litoral. Se compararon mujeres hipertensas y normotensas, evaluando edad, presión arterial y relación calcio/creatinina urinaria; se efectuaron densitometrías óseas por DXA de columna lumbar, cadera y cuerpo entero, determinando la DMO y la CMO. Se efectuó análisis bivariado estudiando asociación y correlación entre las variables de interés. Resultados. Se estudiaron 135 mujeres, 64 (47%) hipertensas. Tenían osteoporosis 13 hipertensas (20,3%) y 13 normotensas (18,3%), p=NS. No se encontraron diferencias significativas en la calciuria (164 ± 104 vs. 127 ± 99 mg/l, p = NS), cociente calciuria/creatininuria (0,16 ± 0,09 vs. 0,14 ± 0,12, p = NS) y los valores de densidad y cantidad mineral óseas. No se evidenció correlación entre presión arterial y calciuria (r=0,05; p=0,65). Los grupos de estudio fueron heterogéneos con respecto a edad e índice de masa corporal; los resultados no se modificaron cuando se ajustó el análisis para estas variables. Conclusión. No se encontró asociación entre presión arterial, calciuria y masa ósea. Nuestros datos no apoyan la hipótesis de una asociación entre hipertensión arterial y osteoporosis a partir de la calciuria.

232. (403) ALTERACIONES METABÓLICAS EN HIJOS DE PADRES CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Vicco, M.¹²³; Rodeles, L.³; Ferini, F.³; Cesar, L.³; Baretta, M.³; Musacchio, H.²³

Laboratorio de Tecnología Inmunológica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral - CONICET¹ Facultad de Ciencias Médicas - Área de Clínica Médica² Hospital J. B. Iturraspe³

Antecedentes y Objetivos: El antecedente familiar de hipertensión arterial en jóvenes sanos se ha asociado a hiperinsulinemia, la cual a su vez podría producir aumento en el cortisol sérico, confluendo ambos mecanismos en daño endotelial renal que se traduciría en la presencia de microalbuminuria. El objetivo del reciente trabajo consistió en valorar el nivel de insulina, cortisol sérico y la presencia de microalbuminuria en jóvenes sanos, hijos de padres con hipertensión arterial esencial. Material y Métodos: se realizó un trabajo transeccional-correlacional causal en la ciudad Argentina de Santa Fe, incluyendo 145 jóvenes sanos mayores de 18 años edad, divididos en 2 grupos según antecedente de primer grado de hipertensión arterial esencial. Se valoraron las concentraciones séricas en ayunas de insulina, cortisol, y los niveles de microalbuminuria en primera orina matutina. Resultados: La mediana de edad fue de 20 años, siendo el 58% mujeres. El grupo de estudio incluyó el 48%. El 4,8% presentó insulino-resistencia, 13,8% microalbuminuria y el 52% (n=76) hipercortisolínemia, no encontrándose diferencias

significativas de los niveles séricos de insulina y cortisol, ni de microalbuminuria entre los grupos, así como tampoco correlación entre éstas variables. Conclusión: En el presente trabajo no se encontró asociación entre el antecedente de 1° grado de hipertensión arterial y alteraciones de la homeostasis de insulina o cortisol así como tampoco traducción de daño endotelial traducido en la presencia de microalbuminuria.

233. (475) EFECTO DE UNA LECHE FERMENTADA PROBIÓTICA FRENTE A LA REEXPOSICIÓN DEL ANTÍGENO EN UN MODELO DE ALERGINIA

Velez, E.¹; Palomar, M.¹; Meson, O.²; Bibas Bonet, M.²; Perdigon, G.¹²; Maldonado, C.¹²

Centro de Referencia para Lactobacilos, CERELA - CONICET¹ Cat. de Inmunología, Inst. de Microbiología, Fac. de Bioqca. Qca. y Fcia. - Universidad Nacional de Tucumán²

En trabajos previos vimos que la administración oral de una leche fermentada probiótica (LFP) disminuye el nivel de IgE sérica en un modelo de alergia en ratones con ovoalbúmina (OVA). El objetivo de este trabajo es determinar si la LFP mantiene bajos los niveles de IgE posterior a un reestímulo con OVA. Ratones BALB/c se dividieron en 5 grupos: Control-Normal (CN); Basal (B-5días-LFP); Control-Sensibilizado (CS); Tratamiento Previo (P-5d-LFP+OVA+H2O) y Continuo (C-5d-LFP+OVA+LFP-hasta finalizar el ensayo). Los ratones fueron sensibilizados con OVA al 1% seguido de aerosoles de OVA durante 15 días; el reestímulo se realizó 15 días después de la última exposición. Se tomaron las muestras a los 7 y 15 días post-sensibilización (dPS) y 2 días post-reestímulo (dPR). Por ELISA se determinó en suero IgE e IgG específicas, IgG1 e IgG2a. En lavado broncoalveolar (BAL): IgE e IgG específicas y en sobrenadante de tejido pulmonar: IgE específica, IL10 e IFN γ . La LFP disminuyó el nivel de IgE a-OVA en suero en P y C a los 7 y 15dPS; no hubo diferencias para 2dPR. En BAL IgE disminuyó solo a los 7 dPS. LFP aumentó los niveles de IgG sérica total a-OVA en todos los tiempos para C, siendo la IgG2a la de mayor proporción en todas las muestras. En pulmón la IL10 y el IFN γ aumentaron a los 7dPS en el grupo continuo pero solo los niveles de IFN γ se mantuvieron elevados hasta los 2dPR. Los resultados indicarían que la LFP favorecería el balance inmune hacia una respuesta Th1, ante un reestímulo antigénico en ratones sensibilizados, induciendo aumento de IL10 que regularía la producción de IgE a-OVA en el grupo continuo a los 7dPS. Los niveles de INF γ mantendrían el balance Th1 en el tiempo con ligera disminución de IgE a-OVA (2dPR) y aumento de IgG1a. La LFP fue más efectiva en la disminución de IgE en etapas tempranas que frente a un reestímulo antigénico

234. (494) EFECTO DE LACTOBACILLUS CASEI CRL 431 Y DE UNA LECHE FERMENTADA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INTESTINAL Y SISTÉMICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDAD EN RATÓN

Novotny Núñez, I.¹; Maldonado Galdeano, C.¹²; De Moreno De Leblanc, A.¹; Perdigon, G.¹²

Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA-CONICET¹ Cát. de Inmunología, Inst. de Microbiología, Fac. de Bioqca. Qca. y Fcia. - Universidad Nacional de Tucumán²

La obesidad es un estado inflamatorio crónico, con acumulación excesiva de grasa o hipertrofia del tejido adiposo. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de *L. casei* CRL431 (Lc) y de su leche fermentada (LF) en un modelo experimental de obesidad. Los ratones recibieron dieta convencional (G1) o dieta alta en grasas (G2); y se les administró leche (L), LF, Lc o agua (A) durante 3 meses. Las muestras se tomaron mensualmente. Se estudió histología de hígado e intestino delgado (ID), n° de células IgA+ en ID, actividad fagocítica (AF) de macrófagos de bazo (MB) y peritoneo (MP). Para evaluar inmunidad sistémica, se inmunizó con ovoalbúmina (OVA) y se determinó IgG específica anti-OVA en suero por ELISA y la traslocación de *Salmonella* a órganos en un modelo de infección. Los datos mostrados corresponden al 2° mes, donde incrementaron los marcadores séricos de obesidad. En hígado, se observó steatosis en G2L y G2A, revertida en los

grupos G2LF y G2Lc. En ID se observaron vellosidades más cortas en G2A que en G1. G2LF y G2Lc lograron revertir dichas alteraciones. G2A disminuyó el n° de células IgA+ en ID comparado a G1 y sólo LF aumentó estos valores. La administración de LF o Lc incrementó la AF de MB y MP previa a la inmunización; sólo Lc mantuvo este efecto en MB post-inoculación. G2A disminuyó AF de MP post-inoculación, revertida por las 3 dietas. En la respuesta sistémica, la administración de los suplementos dietarios no la modificó, comparada a los respectivos controles. En el modelo de infección, la traslocación de *Salmonella* a órganos no mostró diferencias en ninguno de los grupos estudiados. La administración de Lc o LF a ratones obesos mejoró las alteraciones histológicas en hígado e intestino, estimuló la producción de IgA en ID y la AF de macrófagos de bazo y peritoneo (parámetros alterados por la obesidad). No fue efectiva en el aumento de la respuesta anti-OVA ni en la protección frente a *Salmonella*, aún cuando la inmunidad intestinal se vio mejorada.

235. (506) BALANCE OXIDATIVO EN SANGRE Y TEJIDO CEREBRAL EN UN MODELO DE GLAUCOMA EXPERIMENTAL

Reides, C.¹; Lasagni Vitar, R.¹; Lerner, F.¹; Musi Tanuri, C.¹; Ferreira, S.¹; Llesuy, S.¹²

Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA¹ IBIMOL, UBA-CONICET.²

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con un aumento de la presión intraocular. El objetivo fue evaluar el balance oxidativo en sangre y homogeneizados de tejido cerebral en un modelo de glaucoma experimental. Para llevar a cabo dicho objetivo se determinaron los siguientes parámetros a los 14 días de la operación: quimioluminiscencia espontánea de cerebro (QL) en corteza visual izquierda (CVI) y derecha (CVD); b-sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma; c-contenido de glutatión total (GSH) en glóbulos rojos, CVD y CVI; d- superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en glóbulos rojos; e-nitritos (CN) en plasma. Ratas Wistar (3 meses) fueron operadas bajo microscopio por cauterización de dos venas episclerales del ojo izquierdo (GG) (n=5) mientras el grupo control (GC) (n=5) fue sometido al mismo protocolo quirúrgico sin cauterización. Los resultados para la QL fueron 2792 \pm 145 cpm/mg proteína para CVI/GG y 2800 \pm 210 cpm/mg proteína para CVD/GG (CVI/GC: 1878 \pm 210 cpm/ mg proteína **p*<0,01; CVD/GC 1617 \pm 171 cpm/mg proteína **p*<0,01). Los TBARS en plasma para GG fueron 45 \pm 4 pmoles/ mg proteína (GC: 33 \pm 3 pmoles/ mg proteína **p*<0,05). El GSH para glóbulos rojos fue en GG 0,38 \pm 0,04 μ mol/mL (GC: 0,61 \pm 0,05 μ mol/mL **p*< 0,01); en tanto en CVI/GG fue 1,40 \pm 0,15 μ mol/g órgano (GC: 2,88 \pm 0,21 μ mol/g órgano **p*< 0,001) y en CVD/GG fue 2,57 \pm 0,12 μ mol/g órgano (GC: 3,15 \pm 0,20 μ mol/g órgano **p*< 0,05). La actividad de SOD en glóbulos rojos fue para GG 1,44 \pm 0,08 U/mg proteína (GC: 0,92 \pm 0,10 U/mg proteína **p*< 0,005) y la de CAT 1,45 \pm 0,15 pmol/mg proteína (GC: 1,90 \pm 0,11 pmol/mg proteína **p*< 0,05). No se observaron cambios significativos en la CN en plasma. Estos resultados sugieren que las especies prooxidantes se encuentran aumentadas y los antioxidantes no enzimáticos disminuidos en el glaucoma tanto en la sangre como en el tejido cerebral. El aumento de la actividad de SOD sugiere una respuesta adaptativa al aumento de daño en sangre.

236. (540) RESPUESTA DEL PERFIL LIPÍDICO-LIPOPROTEICO Y DE LA MASA ÓSEA AL AGREGADO DE FITOSTEROLES AL ACEITE DE GIRASOL ALTO OLEICO, EN LA HIPERCOLESTEROLEMIA NUTRICIONAL

Alsina, E.; Martínez Reinoso, J.; Mancuso, A.; Bryck, G.; Rodríguez, P.; Macri, E.; Friedman, S.

Facultad de Odontología, UBA

Nuestros estudios previos demostraron que en la hipercolesterolemia nutricional (HCN), una dieta rica en aceite de girasol alto oleico (AGAO) impactaba negativamente en el perfil lipídico-lipoproteico y en la masa ósea, comparada con aceite de oliva(AO). Dado que AGAO es de bajo costo, amplia disponibilidad, difusión

y consumo en los hogares, se planteó agregarle fitosteroles (F), componente ya presente en AO, como una nueva estrategia nutricional. Objetivo: Evaluar en ratas con HCN, el efecto del consumo de AGAO con F, sobre los lípidos séricos y masa ósea. Métodos: Ratas Wistar macho al destete para inducir HCN, recibieron por 3 semanas (T3) una dieta aterogénica rica en grasa saturada (GS) y col. A T3 se midió la colesterolemia total (col-t, mg/dL) y se dividieron en 3 grupos. Por 5 semanas (T8), se reemplazó la GS por AGAO o AGAO-F (1% de fitosteroles naturales) o AO. Las dietas se administraron ad libitum y se registró zoometría y consumo (kcal/100g peso corporal/día). A T8, se evaluaron: índice hepatosomático (IHS) y col-t, col-noHDL y TG séricos (mg/dL); la densidad (DMO, g/cm²) y contenido mineral óseo (CMO, g) de esqueleto total (DPX). Resultados: (media±DE.Anova.SNK): AGAO y AGAO-F presentaron menor peso (AGAO:268,46±33,59=AGAO-F:257,61±14,29<AO:301,08±15,04; p<0.05); sin DS en consumo, longitud corporal e IHS(p>0.05). AGAO mostró los mayores niveles de col-total (AGAO:312,67±60,06>AO :163,83±30,02=AGAO-F180,54±13,44) y col-noHDL (p<0.01). AGAO-F mostró hipertrigliceridemia (AGA-F:113,92±13,14>AO:54,60±18,13=AGAO:58,67±14,76;p<0.01).El CMO(AGAO:21,4±0,36 <AGAO-F:3,52±0,61=AO:3,92±0,34)yDMO(AGAO:0,25±0,0<AGAO-F:0,26±0,0=AO:0,26±0,0; p<0.01). Conclusión:El enriquecimiento de AGAO con fitosteroles naturales permitió un mejor manejo de la HCN y evitó la pérdida de masa ósea. Nuevos estudios dilucidarán la presencia de hipertrigliceridemia. UBACyT 20020100100613.

237. (545) EFECTO DEL PROBIÓTICO LACTOBACILLUS CASEI CRL 431 SOBRE PARÁMETROS INMUNES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRÉS MULTIFACTORIAL EN RATÓN

Palomar, M.¹; Velez, E.¹; Novotny Núñez, I.¹; Perdigon, G.¹²; Maldonado Galdeano, C.¹²

Centro de Referencia para Lactobacilos¹ Cat. de Inmunología, Inst. de microbiología, Fac. Bqca. Qca y Fcia-Universidad Nacional de Tucumán²

El estrés tiene impacto sobre el sistema inmunológico pudiendo afectar órganos inmunes como timo, el curso de enfermedades sistémicas, como así también del sistema común de mucosas. Los probióticos estimulan la respuesta inmune protegiendo al organismo frente a la agresión de patógenos e influyen en la producción de citoquinas y de anticuerpos. En un modelo experimental multifactorial de estrés en ratones BALB/c evaluamos las modificaciones en timo y parámetros inmunes y el efecto del probiótico *Lactobacillus casei* (Lc) en la recuperación de los mismos y niveles de corticosterona en suero. Los ratones durante 11 días fueron privados de alimento durante 12h/día (8:00pm-8:00am) y de movimiento durante 3h diurnas, para ello, fueron colocados en tubos de PVC de 75 cm³. El resto del día tuvieron agua y alimento *ad-libitum*. Los ratones se dividieron en 3 grupos: control normal (C), control estrés (E) y ratones estresados alimentados con Lc los días que duró la experiencia (E+Lc). Las muestras se tomaron al día 12. Se extrajeron macrófagos peritoneales (MP) y macrófagos de bazo (MB) y se determinó capacidad fagocítica. En timo se determinaron las distintas poblaciones celulares por citometría. El estrés disminuyó la capacidad fagocítica de MP y MB, también tuvo efectos en el timo reduciendo celularidad y las poblaciones de linfocitos T CD8+ y CD3+ CD4+ CD8+. La administración de la bacteria probiótica aumento la capacidad fagocítica de MP y MB y la celularidad total en timo y a nivel de la población de linfocitos T CD8+. Sin embargo no tuvo efecto sobre la población de CD3+CD8-CD4+ y CD3+CD4+CD8+. La administración continua de la cepa probiótica durante la experiencia recupero los parámetros inmunes afectados en los animales sometidos a condiciones de estrés. El mecanismo inducido en timo y macrófagos no está relacionado con la disminución de los niveles de corticosterona en suero, ya que estos permanecieron altos aun con la administración del probiótico.

238. (591) LOS ÁCIDOS GRASOS N3 Y LA PÉRDIDA ÓSEA ALVEOLAR INDUCIDA POR PERIODONTITIS EXPERIMENTAL

Stranges, A.¹; Antona, M.¹; Costa, O.¹; Alsina, E.¹; Suárez, C.¹; Zago, V.²; Ramos, C.¹; Friedman, S.¹; Macri, E.¹
Facultad de Odontología UBA¹ Laboratorio Lípidos y Lipoproteínas. Facultad Farmacia y Bioquímica. UBA²

La periodontitis (P) provoca inflamación, resorción ósea alveolar y pérdida dentaria. En estudios previos encontramos que la hipercolesterolemia (HC) induce pérdida ósea en mandíbula de rata. Los ácidos grasos n3 (AGn3) mostraron propiedades anti-inflamatorias y reguladoras de la lipidemia. Pocos estudios evaluaron sus efectos en P. Objetivo: investigar en ratas si los AGn3 decrecen la resorción ósea alveolar inducida por P experimental. METODOS: en ratas Wistar adultas HC se indujo P con ligadura (L) unilateral del primer molar de hemimandíbula (+L). El contralateral, se usó como control (-L). Se dividieron en 3 grupos: HC (HC+L; HC-L), n3 profilaxis (P) (n3P+L; n3P-L) y n3 tratamiento (T) (n3T+L; n3T-L). A t=0 (n3P) y a t=3 semanas (n3T) se reemplazó grasa saturada por aceite de pescado. A t=7 semanas se sacrificaron por punción cardiaca. En suero se midió perfil lipídico-lipoproteico(mg/dL) y las hemimandíbulas fueron teñidas con azul de metileno (1g%). La pérdida ósea alveolar (POA) se determinó por fotografías digitales (vestibular y lingual) y software según: a) método de distancia: media de 6 mediciones lineales (mm), b) método del área (mm²): de superficie radicular expuesta. Radiográficamente (RVG Kodak 5100) se midió hueso de soporte periodontal (HSP:%). ANOVA+SNK (p<0.05). Resultados: a) HC presentó hipercolesterolemia (157±24 vs 70±6mg/dL(n3P)= 69,3±12mg/dL (n3T);p<0,001).b) Según distancia y área, POA fue mayor en molares ligados, con efecto sinérgico en HC+L y menor en n3, sin DS en molares no tratados; [distancia(mm):HC+L (1,6±0,1) > n3P+L (1,4±0,7)= n3T+L (1,4±0,6 (p<0.001) y área lingual(mm²): HC+L (5,2±0,4) > n3P+L (4,6±0,3) = n3T+L (4,2±0,4(p<0.001)]. c) HSP (%) menor resorción ósea en n3, n3P-L (45,7±2,6)=n3T-L (44,0±2,9) > HC-L(38,7±3,4) > n3P+L(34,6±3,1) > n3T+L(29,9±2,3)=HC+L(28,7±3,6)(p<0.001). CONCLUSION: los AGn3 podrían ser beneficiosos para modular la respuesta inflamatoria y evitar la pérdida dentaria en P. UBACyT 20020100100613.

239. (603) ACCIÓN DEL VANADATO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA DELTA AMINOLEVULINATO SINTETASA EN CÉLULAS HEPÁTICAS C3A

Rodríguez, L.¹; Oliveri, L.¹; Codesido, M.¹; Espelt, V.²; Casas, A.¹; Batlle, A.¹; Gerez, E.¹

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias¹ Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)²

La porfiria aguda intermitente (PAI) se caracteriza por una disminución en la actividad de la PBG-deaminasa asociada a un marcado incremento en la expresión de la δ-aminolevulinato sintetasa (ALAS). Se ha demostrado en roedores y embriones de pollo que la insulina inhibe o previene la inducción de la enzima ALA-S. En trabajos previos hemos demostrado *in vivo* que el vanadato, agente insulinoimímico, tiene un efecto negativo sobre la transcripción del ALA-S lo cual permite considerar al vanadato como potencial agente terapéutico para el tratamiento de la PAI. Sin embargo, los resultados obtenidos con el animal entero pueden ser de difícil interpretación al intentar dilucidar los complejos mecanismos regulatorios de feedback que involucran múltiples efectores. Por ello, con el objeto de complementar los resultados obtenidos con vanadato *in vivo* se evaluaron los efectos de dicha droga en cultivos de la línea establecida de hepatoma humano C3A. Las células se crecieron en medio DMEM bajo en glucosa (5mM) y sin suero durante diferentes tiempos. Las células tratadas con vanadato se crecieron durante 18 hs sin suero y luego se le administró el vanadato 1, 2, 3 μM durante 1, 3 y 6 hs. Las células control se las trató con el vehículo correspondiente. El tratamiento con vanadato provocó una caída del 56% en los niveles de proteína del ALA-S mitocondrial y citoplasmática, y esta caída fue acompañada con un aumento de 3,6 veces en la fosforilación de Akt (ser 473) y una caída del 63% en los niveles nucleares del factor de transcripción FOXO. Además se observó una disminución de 27% en la fosforilación (ser 133) del factor de transcripción CREB. Estos resultados están en concordancia con nuestros datos obtenidos *in vivo* lo cual

nos permite concluir que el modelo utilizado resulta adecuado para seguir investigando los mecanismos de acción del vanadato y su posible utilización en el tratamiento de la PAI.

240. (604) EFECTO DE LOS ANESTÉSICOS ISOFLURANO Y SEVOFLURANO SOBRE LA BIOSÍNTESIS DEL HEMO EN UN MODELO GENÉTICO MURINO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

Ruspini, S.¹; Zuccoli, J.¹; Lavandera, J.²; Batlle, A.¹; Buzaleh, A.¹³
 CIPYP, CONICET, Hospital de Clínica, UBA¹ Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe² Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA³

Las porfirias son enfermedades metabólicas producidas por alteraciones en la biosíntesis del hemo. La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) se caracteriza por disminución de la Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-D) y ataques agudos con síndrome neuroabdominal; los fármacos y en particular algunos anestésicos son sus principales desencadenantes. El objetivo fue estudiar en un modelo genético de PAI el efecto de los anestésicos volátiles sobre la síntesis de hemo. Ratones *knockout* deficientes en la enzima PBG-D (Pbgd^{-/-}, PAI) (descenso al 30% de la actividad normal) y ratones heterocigotas para dicha mutación (Pbgd^{+/-}, T1) (actividad disminuida 55%), machos y hembras, recibieron Isoflurano (2 ml/kg, i.p.) y Sevoflurano (1,5 ml/kg, i.p.) y se sacrificaron luego de 20 minutos. Se midió actividad y expresión de 5-Aminolevulíco sintetasa (ALA-S) y actividad de PBG-D en hígado, cerebro, riñón y sangre. El Isoflurano aumentó la actividad de ALA-S en hígado (40%; p<0,05) y riñón (46%; p<0,05) de ratones PAI machos. Este anestésico en los ratones T1 machos indujo 160% (p<0,01) el ALA-S hepática. El Sevoflurano en ratones PAI hembras aumentó el ALA-S en riñón (100%; p<0,05) y cerebro (163%; p<0,01); en el grupo T1 hembras, este efecto se observó en hígado (248%; p<0,01) y cerebro (550%; p<0,01). Al evaluar los efectos sobre la PBG-D, el Isoflurano redujo 25% (p<0,05) la actividad hepática del grupo T1 machos; mientras que en ratones PAI machos, dicha actividad disminuyó 40% (p<0,05) en hígado y 18% (p<0,05) en cerebro. Al estudiar la acción del Sevoflurano en ratones hembras T1, la actividad disminuyó 55% (p<0,05) en hígado y 80% (p<0,05) en riñón. En conclusión, el Isoflurano alteró bioquímicamente aún más la actividad de PBG-D disminuida por la mutación. El efecto del Sevoflurano sobre esta enzima sólo se produjo en ratones T1 hembras. En ratones PAI las alteraciones se observaron en machos, a diferencia de la PAI humana que se desencadena principalmente en mujeres.

241. (626) EFECTO DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS CRL1505 SOBRE LA RECUPERACIÓN DE CÉLULAS T EN UN MODELO DE INFECCIÓN NEUMOCÓCCICA EN RATONES DESNUTRIDOS

Barbieri, N.¹; Herrera, M.¹; Salva, S.²; Villena, J.¹; Alvarez, S.¹³
 CERELA-CONICET¹ INQUINOA-CONICET² Instituto de Bioquímica Aplicada Universidad Nacional de Tucumán³

La administración nasal de *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 (Lr), durante un proceso de re-nutrición de ratones desnutridos, favorece la recuperación de células T, afectadas por la desnutrición. En este trabajo se evaluó el efecto sobre células T y el perfil de citoquinas, luego de una infección por *Streptococcus pneumoniae* (Sp). Ratones desnutridos durante 21d con una dieta hipoproteica (D), se separaron en 2 grupos y fueron tratados con: dieta balanceada (B) durante 7d o B 7d suplementada con Lr (10⁹ cél/d/ratón) por vía nasal los 2 últimos d (B+Lr). El d8, estos grupos, controles bien nutridos (N) y D fueron desafiados con Sp. El d10 post-infección (pi) se evaluó en timo, bazo y pulmón las células T por citometría de flujo (CD3, CD4, CD8); y en el d5 pi se determinó en fluido broncoalveolar (FBA) y suero: IL-2, INF- γ , IL-4, IL-10 por ELISA. Los ratones D presentaron un reducido nro de las células T en timo,

bazo y pulmón luego de la infección. En timo de ratones renutridos se observó aumento del nro de céls CD3+CD4+, siendo los valores del grupo B+Lr superiores a los del grupo B (N=25, 4 \pm 5; D=6,1 \pm 2; B=43,6 \pm 9; B+Lr=56,31 \pm 7 10⁶cél/timo). En bazo, se incrementaron las céls CD3+CD4+ y CD3+CD8+, pero sólo en el grupo con Lr se normalizó el nro de céls CD3+CD4+. En pulmón, la infección redujo el nro de céls CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en ambos grupos, pero B+Lr presentó valores superiores a los del grupo B. Se evaluó estimulación de células Th mediante el perfil de citoquinas inducidas luego del desafío. En FBA, ratones tratados con Lr presentaron mayores niveles de IL-10 e IL-4 que el N y niveles similares de IL-2 (IL-4: N=32,6 \pm 6; D=20,0 \pm 4; B=34,3 \pm 6; B+Lr=46,9 \pm 6 pg/ml). En suero, IL-10, INF- γ e IL-2 en renutridos fueron menores que en el N. El grupo B+Lr indujo aumento de IL-4 superior al N. La administración nasal de Lr promueve la recuperación de la población CD3-CD4 a nivel sistémico y respiratorio y favorece un perfil de citoquinas de tipo Th2, frente a una infección por Sp.

242. (741) ÓXIDO NÍTRICO SINTASA Y HEMO OXIGENASA EN ENCÉFALO DE RATONES TRATADOS CON ANESTÉSICOS VOLÁTILES Y OTROS AGENTES PORFIRINOGENICOS: ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

Buzaleh, A.¹²; Meiss, R.³; Lavandera, J.⁴; Vallecorsa, P.³; Ruspini, S.¹; Batlle, A.¹
 CIPYP, CONICET, Hospital de Clínicas, UBA¹ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA² Departamento de Patología, Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina³ Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe⁴

La Óxido Nítrico Sintetasa (NOS) es una hemoproteína que sintetiza óxido nítrico que participa en funciones fisiológicas en neuronas, glia y vasculatura, además de estar involucrado en enfermedades neurodegenerativas. Existen 4 isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y mitocondrial (mtNOS). La Hemo oxigenasa (HO) es la primera enzima involucrada en la degradación del hemo; existen 3 isoformas; HO-1, HO-2 y HO-3; es inducible por numerosos estímulos y en respuesta al estrés oxidativo. Las porfirias son enfermedades metabólicas debidas a alteraciones en la síntesis del hemo; los fármacos y en particular los anestésicos son los principales desencadenantes. Previamente hemos observado alteraciones en la actividad y expresión de las enzimas HO-1 y NOS frente a las drogas porfirinogénicas. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de los anestésicos Enflurano, Isoflurano, y de otros agentes porfirinogénicos: alilisopropilacetamida (AIA), veronal, etanol, sobre la expresión proteica de HO-1 y de isoformas de la NOS en diferentes células cerebrales de ratón. Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos y el sistema streptavidina-biotina-peroxidasa con DAB para el revelado. En los ratones controles se detectó expresión positiva de n-NOS, i-NOS y HO-1 en neuronas; e-NOS únicamente se observó en el endotelio de los vasos. En neuronas, la expresión proteica de nNOS aumentó en respuesta a todos los xenobióticos ensayados; mientras que una marca más intensa para iNOS se vio únicamente luego de la anestesia, veronal y etanol. La expresión de HO-1 también se indujo en las neuronas de todos los grupos estudiados. Además se detectó inducción de la expresión en el plexo coroideo y en células de la glia en la mayoría de los grupos. En conclusión una buena correlación entre la expresión de HO-1 e iNOS se observó en las neuronas. En las células de la glia se produjo la mayor expresión de la isoforma iNOS.

INMUNOLOGÍA TUMORAL 1

243. (18) LA INMUNOSUPRESIÓN ASOCIADA AL CRECIMIENTO DEL TUMOR MC-C NO ES DEBIDA A CAMBIOS INTRÍNSECOS DE LA CÉLULA TUMORAL

Bruzzo, J., Chiarella, P., Meiss, R., Ruggiero, R.
Academia Nacional de Medicina

La teoría de la inmunoección de tumores está definida por tres eventos claves: eliminación, equilibrio y escape. La fase de eliminación tumoral se corresponde con el concepto original de inmunovigilancia. Las células tumorales que no son eliminadas proceden hacia una fase de equilibrio entre el tumor y el sistema inmune. Finalmente, o bien el sistema inmune contribuye a la selección de variantes tumorales que crecerán incontroladamente eludiendo el reconocimiento inmune (inmunoección) o bien el tumor inhibe los mecanismos inductores y/o efectores de la respuesta inmune antitumoral (inmunomodulación). Para comenzar a distinguir entre ambas alternativas analizamos la expresión de MHC I durante el crecimiento del fibrosarcoma inmunogénico MC-C y estudiamos la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* de esplenocitos inmunes (de ratones portadores de tumores MC-C pequeños (< 500 mm³), sobre células tumorales provenientes de tumores pequeños y de tumores grandes (2000 mm³). En ambos experimentos no se observaron diferencias significativas, sugiriendo que la célula tumoral no downregula MHC I, ni tampoco modula los antígenos, mecanismos a los que se le ha atribuido un importante rol en el escape tumoral. Por otro lado, realizamos el estudio de inmunogenidad de MC-C comparando aquella obtenida en el pasaje 5 con la obtenida en el pasaje 25 donde la DT₅₀ de los inmunizados fue en ambos casos > 5x10⁶ y la de los controles fue 4x10⁴ ± 0.4x10⁴ y 5x10⁴ ± 0.6x10⁴ células, respectivamente (p < 0.001 inmunizado vs control), demostrando que la capacidad del tumor MC-C de generar una respuesta inmune anti-tumoral no se pierde a lo largo de varios pasajes. Estos resultados indicarían que en nuestro modelo no hay selección de variantes tumorales que dejan de ser reconocidas por el sistema inmune, sino que hay una alteración de la respuesta inmune del hospedador en cada nuevo pasaje inducida por la presencia del tumor. En otras palabras, no habría inmunoección sino inmunomodulación.

244. (141) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS ABH EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Lebensohn, N.¹, Vaquié, E.¹, Aguirre, R.², Racca, L.¹, No-cito, A.², Di Paolo, O.¹, Biondi, C.¹
*Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR¹.
Facultad de Ciencias Médicas - UNR²*

La expresión de los antígenos del grupo sanguíneo ABO, no está limitada a los glóbulos rojos, también están presentes en la superficie de otras células del organismo y en las secreciones. Estos antígenos presentan cambios en su expresión durante la diferenciación celular y el desarrollo a la malignidad. El objetivo de este trabajo fue investigar la expresión antigénica ABH en cortes histológicos de pacientes con diagnóstico presuntivo de cáncer de mama. Se trabajó con muestras de tejido incluidas en tacos de parafina (n=18) proveniente de mujeres con un rango de edad entre 20 y 70 años. Se realizó el estudio aplicando una técnica inmunohistoquímica con el método NovoLink™ Polymer Detection Systems con anticuerpos monoclonales diluidos convenientemente, válidos para tejidos incluidos en parafina. La inmunotinción se basó en la utilización de un polímero de alto peso molecular (dextrano) al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de enzima y de anticuerpo secundario. Cada muestra se valoró semicuantitativamente de negativa a fuertemente positiva. Se utilizó la adherencia al tejido vascular como control positivo y al tejido adiposo como control negativo. Las lesiones analizadas de cáncer de mama mostraron una delección total de la expresión ABH (n=14). En las muestras de pacientes sin diagnóstico anatomopatológico de cáncer se observó una conservación de los antígenos del sistema ABO (n=4). Hemos encontrado una relación significativa entre la expresión antigénica ABH y el grado de malignidad de las lesiones analizadas. (Test de Fisher p<0.0005). La pérdida de reactividad ABH en los sitios de mayor invasividad tumoral se correlaciona con el grado del desarrollo del tumor, el grado histológico y su malignidad. La pérdida de la expresión de los antígenos de grupos sanguíneo ABO tendría una influencia

pronóstica negativa en el carcinoma de mama, además podría ser utilizada como marcador de riesgo en la patología estudiada.

245. (152) LA INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR MEDROXIPROGESTERONA FAVORECE LA FORMACIÓN DE METÁSTASIS EN CÁNCER DE MAMA

Salatino, M., Dalotto Moreno, T., Croci, D., Sundblad, V., Dergan-Dylon, S., Cerliani, J., Rabinovich, G.
Instituto De Biología y Medicina Experimental.

La progesterona es una hormona sexual con propiedades inmunosupresoras que juega un papel crucial en la génesis y progresión del cáncer de mama. Investigamos si la progesterona sintética acetato de medroxiprogesterona (MPA) favorece el crecimiento tumoral y las metástasis en un tumor que no expresa receptor de progesterona (HI) al influenciar el microambiente tumoral, especialmente los componentes del sistema inmune. Previamente demostramos que tanto la Pg como el MPA inducían un aumento de la proteína inmunosupresora Gal1 en tumores de mama hormono dependientes contribuyendo a fenómenos de tolerancia y escape tumoral. Utilizamos el tumor de mama murino altamente metastásico 4T1 que expresa altos niveles de Gal1 para inocular ratones Balb/c. El tratamiento *in vivo* con MPA (pellet) por 21 días indujo un incremento de la expresión de Gal1 estroma (2 veces). Asimismo, el tratamiento con MPA aumentó sistemáticamente la frecuencia de células T regulatorias (Tregs) (que expresan Gal1) y de su reclutamiento hacia el tumor (Ct 40±5% MPA 60±8%; p<0.05). Notablemente, el aumento de Tregs por MPA se produjo en ratones con o sin tumor (Ct 12% MPA14.5% 4T1 12% 4T1+MPA 15%; p<0.05). En este sentido demostramos que MPA indujo la diferenciación de Tregs *in vitro* en presencia de IL-2 y cantidades sub-óptimas de TGF-β (Ct: 38% vs MPA10⁻⁶ 44% MPA 10⁻⁷ 44,5% p<0,05). Si bien el tratamiento *in vivo* con MPA no indujo un aumento en la capacidad supresora de las Tregs, sí promovió un aumento de su capacidad de inducir invasión al ser co-cultivadas con células 4T1 (Ct: 50cel/campo vs MPA: 93cel/campo, p<0,05). Finalmente demostramos que el tratamiento *in vivo* con MPA incrementó el número de metástasis del tumor 4T1 a pulmón (Ct: 7.2 ± 1.5 vs MPA: 15,8± 1.7 p<0,05). En resumen, nuestros resultados indican que la administración exógena de MPA a ratones portadores de un tumor de mama HI promueve un microambiente tumoral supresor que favorece la invasión y la frecuencia de metástasis.

246. (195) LOS EXOSOMAS DERIVADOS DE UN LINFOMAT, QUE EXPRESAN ANTÍGENOS ASOCIADOS AL TUMOR Y LAS PROTEÍNAS DEL SHOCK TÉRMICO HSP 90 Y HSP 70, INDUCEN UNA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA EN RATONES SINGENEICOS

De Toro, J.¹, Herschlik, L.¹, Gravisaco, M.², Coifman, D.¹, Vendrell, A.¹, Waldner, C.¹, Mongini, C.¹
Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular (CEFYO-CONICET Facultad de Medicina, UBA)¹ CICVyA, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina²

Los exosomas son nanovesículas muy estables producidas por diversos tipos celulares que expresan las proteínas características de las células de las que derivan. Según su interacción con células del sistema inmune pueden ser tolerogénicos, promotores o supresores. En estudios anteriores demostramos la presencia de proteínas de importancia inmunológica en los exosomas derivados de las células LBC: el antígeno estable al calor CD24, las proteínas del choque térmico Hsp90 y Hsp70, y las moléculas del CMH de clase I. Asimismo, demostramos que los antígenos asociados al tumor se encuentran concentrados en los exosomas respecto a la célula LBC y que comparten determinantes antigénicos presentes en las proteínas de 51, 59 y 63 kDa. El objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades inmunoregulatorias de los exosomas LBC. Para ello, esplenocitos de ratones BALB/c vírgenes o previamente inmunizados con células LBC irradiadas, fueron cultivados en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de exosomas (0,5-10 ug/ml) durante 48, 72 y 96 h y se determinó la estimulación de una respuesta específica por incorporación de ³H timidina y por la secreción de

IFN-g en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Encontramos una estimulación dosis-dependiente de los esplenocitos a las 72 y 96 h obteniéndose la mayor respuesta estimulando con 10 µg/ml de exosomas durante 96 h ($p < 0,0001$). Esta estimulación se correlacionó con la secreción de INF-g en los sobrenadantes de cultivo. Se encontró un aumento significativo en la secreción de INF-g, respecto del control ($p < 0,01$). Demostramos que los exosomas derivados de las células LBC poseen la capacidad de estimular una respuesta T específica *in vitro* en linfocitos vírgenes o de memoria por lo que constituirían una fuente ideal de antígenos tumorales acelulares con iguales propiedades que las células tumorales pero con la ventaja de ser más estables, reproducibles y seguros para ser utilizados en la inmunoterapia del cáncer.

247. (214) LA EXPRESIÓN ENDÓGENA DE GALECTINA-1 REGULA LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS T CD8+ EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN CÁNCER DE PRÓSTATA.

Giribaldi, M.¹, Jaworski, F.¹, Gentilini, L.¹, Compagno, D.¹, Rabinovich, G.², Laderach, D.¹
Laboratorio de Glicómica Estructural y Funcional, IQUIBICEN UBA-CONICET¹ Laboratorio de Inmunopatología, IByME-CONICET²

Distintos tipos de tumores se caracterizan por expresar galectina-1 (Gal1) tanto en las propias células tumorales como en el estroma y en células del sistema inmunológico. Sin embargo, se conoce poco acerca del papel funcional de las interacciones entre galectinas y glicanos en cáncer de próstata. Previamente hemos demostrado una correlación positiva entre los niveles de expresión de esta galectina y el grado de evolución de la enfermedad. No obstante, la expresión de Gal1 no afecta la capacidad proliferativa de las células tumorales; aspecto relacionado con el glicofenotipo 'no permisivo' observado en tumores TRAMP-C1 y muestras de pacientes. Dado el conocido efecto inmunomodulador de Gal1, decidimos explorar el papel funcional de la Gal1 endógena en diversos tipos celulares participantes de la respuesta anti-tumoral. A tal fin, llevamos a cabo ensayos de activación celular de linfocitos T provenientes de ratones deficientes en Gal1 (Gal1 KO) o WT, en respuesta a mitógenos y en presencia de células presentadoras de antígenos (CPA) de ratones Gal1 KO ó WT bajo la influencia de células prostáticas tumorales singeneicas, TRAMP-C1. La variación de la expresión endógena de Gal-1 en la población de CPAs no afectó de manera significativa la proliferación linfocitaria. Sin embargo, la ausencia de Gal1 en los linfocitos T produjo un aumento significativo en la capacidad proliferativa de células T CD8+ en presencia de CPAs WT y células tumorales ($P < 0,05$). Además observamos que en respuesta a los estímulos mencionados, la población de linfocitos T CD8+ Gal1 KO presenta un menor porcentaje de células regulatorias CD8+ CD122+ CD28-, acompañados por una disminución en la expresión de Foxp3 y de IL-10, respecto de linfocitos WT. Estos datos sugieren que, independientemente de su rol extracelular en la supervivencia linfocitaria, la expresión intrínseca de Ga-1 por parte de linfocitos T controla sus propiedades funcionales mediante la activación de mecanismos regulatorios.

248. (242) LA PROTEÍNA DE MEMBRANA DE BRUCELLA SPP COMO ADYUVANTE DE OVA POSEE ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTITUMORAL

Coria, L.¹, Ibaez, A.¹, Tkach, M.², Paskevich, K.¹, Bruno, L.¹, Rizzo, G.¹, Schillaci, R.², Cassataro, J.¹
Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo-CO-CONICET¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET. Buenos Aires, Argentina²

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que una proteína de *Brucella* spp. (Bp) como adyuvante de ovalbúmina (OVA) induce respuestas T CD8+ y Th1. Por otra parte, Bp posee actividad de inhibidor de proteasas e inhibe parcialmente la degradación de antígenos (Ags) en células presentadoras de antígeno (APCs). En este trabajo, continuamos estudiando su mecanismo de acción y utilizando un anticuerpo que reconoce

moléculas MHC1 unidas al péptido SIINFEKL de OVA específico para linfocitos T CD8+ observamos que en células dendríticas (DCs) incubadas con OVA+Bp la presentación de OVA vía MHC1 y la estabilidad de los complejos MHC1-SIINFEKL se encuentra aumentada en comparación con DCs incubadas con OVA sola ($P < 0,01$). Por lo tanto, un aumento de la vida media del Ag favorece una presentación sostenida del Ag y explicaría la capacidad adyuvante de Bp sobre linfocitos T CD8+ y citotóxicos. Dado que estas respuestas son cruciales en vacunas contra tumores evaluamos la capacidad antitumoral de Bp. Observamos que esplenocitos de ratones inmunizados con OVA+Bp indujeron un mayor porcentaje de lisis específica (liberación de Cr⁵¹) de células tumorales -melanoma murino transfectado con un plásmido que expresa OVA (MO5)- en comparación con los esplenocitos de ratones inoculados con OVA sin adyuvante ($P < 0,001$). Por último, estudiamos la respuesta antitumoral inducida *in vivo* en los ratones inmunizados y luego desafiados con células MO5. Bp como adyuvante de OVA aumentó la supervivencia de los ratones desafiados con el tumor con respecto a la inmunización con OVA sin adyuvante ($P < 0,02$). Estos resultados indican que Bp aumenta la vida media del Ag co-administrado al inhibir su degradación dentro de la APC e induce respuestas citotóxicas por lo que podría ser utilizada en vacunas antitumorales.

249. (327) MODULACIÓN DE LA INMUNOSUPRESIÓN ESTABLECIDA DURANTE EL DESARROLLO DEL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO LP07 MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON GEMCITABINA (GEM)

Porte Alcon, S., Karas, R., Diamant, M.
Instituto de Oncología Angel H. Roffo.

Las Células Mieloides Supresoras (MDSC) participan en la inmunosupresión asociada al desarrollo neoplásico. En diversos modelos tumorales se ha descrito que el tratamiento *in vivo* con GEM produce una disminución de MDSC esplénicas, favoreciendo una respuesta inmune antitumoral. Previamente determinamos que ratones portadores del adenocarcinoma de pulmón murino LP07 (P-LP07), presentan un aumento de MDSC en el bazo, y que el tratamiento con GEM retarda el desarrollo tumoral. **Objetivo:** Determinar si la eliminación de MDSC en bazo con GEM, puede favorecer la activación de los esplenocitos. **Resultados:** P-LP07 fueron tratados semanalmente con 60 mg/kg de GEM (i.p.) a partir del día 5 de portación (P+GEM). Al día 25 se determinó que el tratamiento con GEM produce: 1) Disminución en el % células MDSC (Gr1+ CD11b+) presentes en el bazo (citometría de flujo): P+GEM: $6,2 \pm 0,7\%$ vs P-LP07: $19,9 \pm 3,4\%$, $p = 0,0015$. 2) Aumento en la capacidad proliferativa de los esplenocitos luego de la estimulación con PMA/Ionomicina (método MTS/PMS, unidades arbitrarias): P+GEM: $3,8 \pm 1,1$ UA vs P-LP07 $1,9 \pm 0,7$ UA, $p = 0,0021$. 3) Disminución en el % células apoptóticas/total de esplenocitos (tinción DAPI): P+GEM: $12,2 \pm 7,0\%$ vs P-LP07: $19,9 \pm 9,4\%$, $p = 0,019$. 4) Aumento en los niveles de citoquinas inflamatorias en el medio condicionado de esplenocitos (Mouse Antibody Cytokine Array, n veces): GM-CSF (7,6); SCF (15); sTNFR1 (25); IL-2 (28); IL-12p70 (4,5); IL-13 (7,3) y trombosopoyetina (3,3); junto con una disminución en los niveles de IL-6 (7,2); IL-12p40 (3,7) e IL-17 (5,2). **Conclusión:** El tratamiento de portadores de tumor LP07 con GEM disminuyó la población de MDSC en el bazo, así como la cantidad de células apoptóticas y aumentó la capacidad proliferativa de las células esplénicas, coincidentemente con mayores niveles de IL-2 e IL-12p70. El tratamiento con GEM permitiría la activación de las células esplénicas, las cuales podrían establecer una respuesta inmune antitumoral más eficiente.

250. (340) EL SILENCIAMIENTO DE RECEPTORES TIPO TOLL EN CÉLULAS TUMORALES PRODUCE UNA MODIFICACIÓN EN EL CRECIMIENTO TUMORAL IN VIVO.

Núñez, N., Nocera, D., Gatti, G., Sánchez, L., Rivero, V., Maccioni, M.
Facultad de Ciencias Químicas - CIBICI Conicet- UNC

Introducción: Es cada vez más evidente que los receptores tipo Toll (TLRs) son capaces de responder a moléculas propias del huésped y desencadenar una respuesta inflamatoria. En condiciones normales estos ligandos pueden estar estimulando de forma sostenida estas vías, promoviendo la activación crónica de NFκB. En el caso de un tumor, podría generar una modificación en su crecimiento. **Resultados:** Para analizar qué función cumplen estos receptores en las células tumorales, se generaron líneas estables en células B16 y TRAMPC2 con plásmidos que expresan short hairpin de ARN (KD) contra TLRs y moléculas adaptadoras. No se observó una modificación en el balance de proliferación entre las líneas KD generadas (MTT). Una vez corroborada la eficiencia del silenciamiento en las líneas, las células B16KD fueron inyectadas en ratones C57BL6. Se observó un aumento del volumen tumoral en el grupo B16shMyD88 y B16shTLR2 (n=10 p<0,05) con respecto con al grupo B16shLuc. Además, se observó una disminución en el tamaño tumoral y aumento en la sobrevida en animales TLR2-/- tratados con PGN intratumoralmente (n=10 p<0,05). Por otro lado, cuando las distintas líneas TRAMPC2KD se inyectaron en ratones C57BL6, se observó que las células TRAMPC2shTLR4 generaron tumores de mayor tamaño comparado al grupo TRAMPC2shLuc (n=10 p<0,05). **Conclusión:** nuestros resultados indican que el silenciamiento de las vías de señalización de TLR4, TLR2 y MyD88 presentes en las células tumorales altera el crecimiento tumoral in vivo. Podemos sugerir que en condiciones fisiológicas, algún ligando endógeno podría activar los TLRs presentes en las células tumorales e influenciar el crecimiento tumoral.

251. (353) EFECTOS INMUNOMODULADORES DE LA FLU-DARABINA (FLU) SOBRE LINFOCITOS T (LT): POSIBLES IMPLICANCIAS EN EL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B (LLC)

Nannini, P.^{1,3}, Borge, M.^{1,3}, Maglioco, A.¹, Morande, P.^{1,3}, De Los Ríos Alicandú, M.¹, Bezares, F.², Dran, G.¹, Giordano, M.^{1,3}, Gamberale, R.^{1,3}

*Instituto de Medicina Experimental IMEX Conicet- Academia Nacional de Medicina*¹ *Hospital General de Agudos Dr. T. Álvarez y Hospital Bancario, CABA.*² *Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA*³

En la LLC, la activación de los linfocitos T (LT) favorece la sobrevida del clon leucémico en ganglios linfáticos (GL) y médula ósea. Previamente reportamos que los LT de los pacientes responden a las quimiocinas que los atraen a los GL y que la FLU, un análogo de adenosina empleado para tratar a los pacientes, incrementa la producción de la citoquina antiapoptótica IFNγ en LT. El objetivo de este trabajo fue estudiar otros efectos inmunomoduladores de la FLU sobre LT. Para ello cultivamos células mononucleares totales de pacientes LLC con o sin FLU y luego de 18hs las células fueron lavadas y empleadas en ensayos de migración con transwells en respuesta a CXCL12, CCL21 y ensayos de proliferación T empleando CFSE. Encontramos que la FLU no modificó la migración de los LT de los pacientes a las quimiocinas CXCL12 o CCL21 (n=16). Sin embargo, la preincubación de las células con FLU, aumentó la proliferación de los LT inducida por PHA (n=8, p<0.05). En estas mismas condiciones, se incrementó la activación del clon leucémico determinada por la expresión de CD69 y CD86 a las 24hs (n=6 p<0.01). A fin de estudiar el efecto del tratamiento *in vivo* con la droga, inoculamos ratones balb/c con o sin FLU i.p. (n=10 por grupo) y evaluamos el número total de LT en GL, el cual fue mayor en los tratados con FLU (p<0.01). Los LT de los GL de estos ratones mostraron una mayor proliferación *ex vivo* (n=4 p<0.05). En su conjunto estos resultados demuestran que los LT que sobreviven a la FLU son más susceptibles a proliferar. Hasta el presente, los tratamientos indicados en LLC terminan fracasando, en parte debido a que las células leucémicas y los LT sobreviven dentro de los ganglios y médula ósea aún cuando son indetectables en circulación. Nuestra hipótesis es que dentro de esos nichos de supervivencia, los LT de los pacientes tratados con FLU proliferarán más, brindando

mayores señales de sobrevida y activación al clon leucémico y favorecerán, en última instancia, la recaída del paciente.

252. (410) EL AGONISTA TLR7 IMIQUIMOD Y LA MOLÉCULA COESTIMULADORA CD40 MEJORAN LA RESPUESTA ANTITUMORAL DE UNA VACUNA DE LISADO TUMORAL

Disciullo, P.¹, Detoro, J.¹, Herschlik, L.¹, Gravisaco, M.², Paz, A.³, Waldner, C.¹, Mongini, C.¹

*CEFYO CONICET UBA*¹ *CICVyA, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina*² *Hospital Municipal de Oncología "Marie Curie"*³

Nuestro objetivo fue evaluar si nuestra vacuna constituida por un lisado de células del linfoma T murino LBC con la combinación de 2 adyuvantes puede inducir una respuesta antitumoral eficaz en ratones portadores de tumor. Células LBC transfectadas con CD40 y sin transfectar fueron lisadas por el método de congelación y descongelación y se inocularon ratones Balb/c con el lisado correspondiente a 10⁶ células sin y con 100μg/ratón de Imiquimod, i.p. Se realizaron 2 inoculaciones separadas por 7 días. A la semana de la última se desafió con las LBC. Todos los grupos tratados presentaron un aumento significativo de la sobrevida con respecto al grupo control sin inmunizar (LBC y LBC. CD40)p<0,0357, LBC+Imq y LBC.CD40+Imq p<0,0004) y respecto al grupo que recibió sólo Imiquimod (p<0,0002)(LogRank test). En los lotes que recibieron los lisados con Imiquimod, la incidencia tumoral fue del 10-11% mientras que, en los grupos que recibieron sólo el lisado, la incidencia fue mayor (33-55%). Los porcentajes de citotoxicidad específica fueron superiores al normal en todos los grupos inmunizados (p<0,05)(ANOVA Tukey post-ANOVA). En el lavado peritoneal se halló un aumento de IFNγ en todos los grupos vacunados respecto al normal (p<0,001) y al rechazador natural (p<0,001)(ANOVA Tukey post-ANOVA) y un aumento significativo de linfocitos TCD8+, TCD4+ y B en todos los grupos tratados respecto al normal (p<0,0001)(ANOVA Tukey post-ANOVA). Se observó anticuerpos circulantes en el suero de todos los ratones inmunizados que rechazaron el tumor hasta 75 días post-desafío. Los animales que rechazaron el tumor fueron re-desafiados y se evidenció un aumento de la sobrevida en todos los lotes respecto al control (p<0,01)(LogRank test). Así, se demostró que nuestra terapia no sólo induce una eficiente respuesta contra el tumor, produciendo altos porcentajes de rechazo y aumentando la sobrevida de aquellos que no lo rechazaron, sino que también es capaz de generar una excelente respuesta de memoria.

253. (435) EXPANSIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES EN RATONES PORTADORES DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS LM3

Moreno Ayala, M.¹, Klein, S.², Bal De Kier Joffé, E.², Castro, M.³, Seilicovich, A.¹, Candolfi, M.¹

*Instituto de Investigaciones Biomédicas UBA-CONICET*¹ *Área Investigación Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires,*² *Department of Neurosurgery, Department of Cell and Developmental Biology, University of Michigan*³

Ha sido descripto que las pacientes de cáncer mamario presentan un aumento de los linfocitos T reguladores (Tregs) circulantes. En este trabajo caracterizamos el modelo de carcinoma mamario LM3 con el objeto de establecer si en los ratones portadores de tumor también se observa una expansión de Tregs. Ratones Balb/c inmuno-competentes fueron inoculados con células LM3 (2x10⁵, s.c.). Los tumores fueron detectables luego de 12 días y crecieron con un tiempo de duplicación de ~7d (volumen_{40d}: 854mm³ ± 154). Los adenocarcinomas LM3 presentaron un fenotipo agresivo, caracterizado por la invasión del tejido adiposo de la glándula mamaria cercana al sitio de inoculación, y el desarrollo de metástasis pulmonares. Las células inmunes presentes en el tumor fueron identificadas mediante inmunofluorescencia indirecta. Observamos que aunque las células inmunes (CD45⁺) accedieron al sitio del tumor, no ingresaron al microambiente tumoral, quedando la mayoría retenida en la periferia del tumor y alrededor de

vasos sanguíneos. Detectamos escasas células T CD8⁺ y células presentadoras de antígeno (MCHII⁺), pero observamos abundantes Tregs (Foxp3⁺). Luego purificamos las células inmunes tumorales (gradiente de Percoll) y mediante citometría de flujo determinamos que ~10% de las células inmunes eran células T CD4⁺. El 30-40% de estas células T fueron identificadas como Tregs (CD45⁺/CD4⁺/CD25⁺). Para determinar si la presencia del tumor LM3 genera una expansión de Tregs periféricas, cuantificamos las Tregs esplénicas en ratones portadores de tumor vs ratones normales por citometría de flujo. Aunque el porcentaje de células CD4⁺ total fue similar en ambos grupos (control: 15.8% ± 1.1; LM3: 14.2 ± 1.2), el número de Tregs fue mucho mayor en el bazo de ratones portadores de tumor (control: 184x10³ ± 25; LM3: 735x10³ ± 122; p<0.05, *t* de Student). Nuestros resultados indican que el modelo LM3 es apropiado para evaluar estrategias terapéuticas que apuntan a controlar la función de Tregs.

254. (438) ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE UN TUMOR DURANTE SU CRECIMIENTO Y REGRESIÓN INDUCIDA POR INMUNOTERAPIA

Machuca, D.¹, Magliocco, A.¹, Badano, M.³, Vallecorsa, P.², Camerano, G.³, Meiss, R.², Dran, G.¹

Laboratorio de Oncología Experimental. IMEX-ANM CO-NICET¹ Instituto de Estudios Oncológicos IEO; Academia Nacional de Medicina² IMEX-CONICET, ANM³

En estudios previos del fibrosarcoma murino MCC demostramos que un protocolo inmunoterapéutico basado en la reinoculación de linfocitos T citotóxicos, provenientes del ganglio linfático drenante del tumor (GLDT) expandidas ex vivo, induce la regresión tumoral del 65% de los ratones tratados. Inesperadamente cuando solo se extrae el GLDT se produce exacerbación del crecimiento tumoral. Con el fin de profundizar en los mecanismos que determinan la regresión como la exacerbación del tumor, decidimos estudiar los cambios a nivel del infiltrado linfocitario tumoral (TIL) que ocurren durante ellas. Inicialmente se comparó la composición del TIL de tumores en remisión con el de tumores en crecimiento. Los primeros mostraron aumento significativo del número de linfocitos por gramo tumoral (3,72±0,64**vs1,60±0,33)x10⁶ y cambios en su distribución histológica, formando agregados en las áreas necróticas. Así como incremento en la proporción de linfocitos TCD4⁺ (17,48±0,74**vs11,81±1,13; n=5) y TCD8⁺ (25,3±4,0**vs7,6±1,2; n=5), aumento de la activación de las células CD8⁺ (%CD25⁺/CD8⁺: 27,6±4,8*vs10,5±2,2, n=3), junto con disminución de las células T regulatorias (%Foxp3⁺/CD4⁺: 30,5±2,7*vs44,3±2,8, n=5) y de las B (% B220⁺: 13,5±1,9*vs21,1±1,8, n=5). Luego se comparó el TIL de tumores exacerbados por la linfadenectomía (LNx) con el de crecimiento normal. Histológicamente ambos presentan el mismo patrón de infiltración difusa, sin diferencias cuantitativas en las poblaciones mencionadas arriba. El primer grupo sin embargo, presentó gran presencia de vasos congestivos. Concluimos que la regresión inducida por la inmunoterapia se relaciona con aumento del TIL y la necrosis asociada a esto, como a así al aumento del índice CD8/CD4, indicativo de actividad citotóxica, y disminución del porcentaje de Treg y linfocitos B, respecto del tumor en crecimiento. En cambio, la exacerbación del crecimiento del MCC por la LNx no se relacionaría con cambios en el TIL.*p<0,01 y **p<0,001.

255. (504) RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL ESPONTÁNEA: ROL DE LAS CÉLULAS NK EN LA ACTIVACIÓN TEMPRANA DE LINFOCITOS T CD8 ANTÍGENO ESPECÍFICOS IN VIVO

Raffo Iraolagoitia, X., Spallanzani, R., Ziblat, A., Ávila, D., Domaica, C., Zwierner, N., Fuertes, M.

Laboratorio de Inmunopatología, IByME

Tanto en modelos murinos como en algunos pacientes humanos, es posible detectar linfocitos T (LT) específicos contra antígenos tumorales que han sido activados espontáneamente. Sin embargo, los mecanismos de la inmunidad innata responsables de promover la activación de estos LT están pobremente caracterizados. Las células *Natural Killer* (NK) representan la primera línea

de defensa contra células tumorales debido a su capacidad única de reconocerlas y eliminarlas. Además, las células NK son claves como nexos entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa debido a su capacidad para interactuar con células dendríticas y su capacidad de secretar IFN-gamma. En consecuencia, nos planteamos como **objetivo** estudiar el rol de las células NK en la activación espontánea de la respuesta inmune anti-tumoral mediada por LT CD8 *in vivo*. Para esto, un grupo de ratones C57/BL6 depletado de células NK mediante la inoculación del anticuerpo anti-NK1.1 y un grupo control fueron desafiados con células de la línea de fibrosarcoma MC57 transducidas para expresar el antígeno modelo SIY. Esta línea celular expresa naturalmente un ligando del receptor activador NKG2D. Observamos que a los 6 días los animales depletados presentaron una disminución significativa (*p*<0,05) en la frecuencia de LT CD8 productores de IFN-gamma luego de reestimar *in vitro* con SIY (evaluado por citometría de flujo intracitoplasmática) y en la frecuencia de LT CD8 específicos anti-SIY (evaluado por marcación con tetrámeros SIY/K^b y citometría de flujo, *p*<0,01) en bazo. Estos parámetros estuvieron asociados con un mayor número de células tumorales viables en el sitio de inoculación del tumor en los animales depletados de células NK. Nuestros resultados demuestran que las células NK son un componente crítico para el adecuado desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral espontánea mediada por LT CD8 *in vivo*.

256. (507) LA TERAPIA CON UNA DOSIS BAJA Y ÚNICA DE CICLOFOSFAMIDA (CY) COMBINADA CON IL-12 INDUCE UNA POTENTE RESPUESTA INMUNITARIA ANTITUMORAL Y ES SUPERIOR A LA COMBINACIÓN DE UN ESQUEMA METRONÓMICO DE CY CON IL-12 EN UN MODELO DE CÁNCER DE COLON MURINO

Malvicini, M.¹, Piccioni, F.¹, Bayo, J.¹, Fiore, E.¹, Alaniz, L.¹, Garca, M.¹, Atorrasagasti, C.¹, Aquino, J.¹, Matar, P.², Mazzolini, G.¹

Laboratorio de Terapia Génica-Facultad de Ciencias Biomédicas-Universidad Austral¹ Instituto de Genética Experimental-Facultad de Ciencias Médicas-Universidad Nacional de Rosario²

La terapia con una dosis baja y única de Cy y posterior terapia génica con IL-12 mediante un vector adenoviral (Cy Mo+ AdIL-12) posee un efecto antitumoral sinérgico con desarrollo de una potente respuesta inmunitaria específica en un modelo de cáncer de colon murino (células CT26). Posteriormente evaluamos la combinación Cy+AdIL-12 utilizando un esquema de administración de Cy denominado metronómico (dosis bajas y repetidas regularmente; CyMe). Siguiendo este esquema hemos demostrado que Cy Me+AdIL-12 posee un escaso efecto antitumoral y no resulta sinérgico en la erradicación de tumores, sin embargo logra eliminar algunos mecanismos inmunosupresores a través de la reducción de los niveles de células Tregs y de células supresoras de origen mieloide. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la terapia combinada de CyMe+AdIL-12 sobre la respuesta inmunitaria efectora y compararlos contra la terapia con Cy Mo+AdIL-12. Como resultado, hallamos una menor proliferación y activación de esplenocitos cuando estos son enfrentados a células dendríticas (DCs) pulsadas con extractos tumorales obtenidos de ratones tratados con Cy Me (*p*<0,05 vs. Cy Mo) Encontramos que esto se debía a que el tratamiento con Cy Me induce menor activación y maduración de las CDs pulsadas (*p*<0,05 vs. Cy Mo). Además, los animales tratados con CyMe+AdIL-12 muestran menor infiltrado tumoral de células CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ y sus esplenocitos desarrollan menor actividad citotóxica y menor tasa de proliferación que la observada con el tratamiento con CyMo+AdIL-12 (*p*<0,05). Concluimos que este fenómeno podría explicar, al menos parcialmente, la falta de respuesta *in vivo* generada por la combinación de Cy Me+ AdIL12. Estos efectos diferenciales podrían ser de importancia para el diseño de combinaciones de inmunoterapia del cáncer utilizando Cy como agente inmunomodulador.

257. (516) LINFOCITOS T SENESCENTES INDUCIDOS POR TUMORES (LITSIT) PROMUEVEN LA SECRECIÓN DE

FACTORES INVOLUCRADOS EN LA ANGIOGÉNESIS POR PARTE DE MONOCITOS (MO) HUMANOS

Ramello, M., Tosello Boari, J., Gorosito Serran, M., Acosta Rodriguez, E., Montes, C.
CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

El microambiente tumoral se conforma por células estromales, tumorales y células del sistema inmune intercomunicadas que, por medio de citoquinas (cqs) y moléculas de superficie, orquestan el desarrollo de la respuesta inmune antitumoral. Previamente demostramos que LiT CD4+ o CD8+ de donantes sanos incubados con líneas tumorales sufren senescencia inducida por tumores y son capaces de promover la activación de Mo a un perfil inflamatorio/protumoral. Nuestro objetivo fue evaluar en Mo modulados por LiTSIT la activación de NFkB involucrado en la secreción de cqs inflamatorias y la capacidad de secretar factores involucrados en la invasión, angiogénesis y metástasis. Para ello, Mo autólogos fueron cultivados con LiTSIT CD4+ o CD8+ o LiT controles (LiT CD4+ o CD8+ sin incubar con la línea tumoral) en presencia de anti-CD3 y luego estimulados con LPS por diferentes periodos de tiempo. Por western blot determinamos que Mo modulados por LiTSIT expresan p52 pero no muestran fosforilación de Ikb α , indicando la activación preferencial de la vía no canónica de NFkB. Mo cultivados con LiTSIT (CD4+ o CD8+) y estimulados con LPS por 48 hs mostraron mayor producción de MMP-9 y de VEGF respecto de los Mo cultivados con LiT CD4+ o CD8+ controles ($p < 0,01$ y $p < 0,05$) y una menor producción del factor angiostático IP-10. Con ensayos de transwell determinamos que esta modulación de la actividad de los Mo requiere del contacto celular con LiTSIT. Evaluando posibles moléculas candidatas mediadoras del diálogo intercelular detectamos que un mayor % de LiTSIT expresan CD40L y TIM-3 respecto a LiT controles. (CD40L: CD4 SIT 42 \pm 16 vs control 7 \pm 0,3, CD8SIT 40 \pm 8 vs control 13 \pm 17; TIM-3: CD4 SIT 74 \pm 3 vs control 21 \pm 14, CD8SIT 66 \pm 12 vs control 45 \pm 15). Ensayos futuros evaluarán la participación de CD40L y TIM-3 en la secreción de cqs inflamatorias y factores angiogénicos por parte de Mo. Los resultados indican que LiTSIT modularían la activación de Mo impactando en la respuesta inmune antitumoral.

258. (531) EFECTOS DEL ADENOCARCINOMA DE PULMON MURINO (LP07) EN LA SOBREVIVENCIA DE LOS POLIMORFONUCLEARES (PMN) NEUTROFILOS

Karas, R., Porte Alcon, S., Diamant, M.
Departamento de bioterio y cáncer experimental, Instituto de Oncología, Ángel H. Roffo

El tumor LP07 cursa con inflamación crónica y leucocitosis a expensas de PMNs (PMN-P). Los PMN-P presentan una mayor producción de ROS respecto a los PMN normales (PMN-N), y promueven la migración e invasión de las células tumorales (cLP07). El tratamiento in vivo con indometacina (Indo, 40 μ g/ratón/día, oral) redujo el crecimiento tumoral y las metástasis espontáneas, disminuyó la producción de ROS en los PMNs (PMN-I), e inhibió su capacidad de inducir la migración e invasión de las cLP07. **Objetivo:** Determinar si el tumor LP07 modula la viabilidad, apoptosis y netosis de los PMNs. Ratones BALB/c fueron inoculados con 3x10⁵ cLP07 sc, tratados ó no desde el día 0 con Indo. Los PMNs se obtuvieron de sangre periférica (Ficol-Triyosom; δ :1090) cuando el volumen tumoral fue de 500 mm³. **Resultados:** Se analizó la viabilidad (MTS-PMS, Abs) de los PMNs en cultivos de 18hs. Se observó que PMN-P (0.26 \pm 0.01) y PMN-I (0.25 \pm 0.01) tienen mayor viabilidad respecto de PMN-N (0.17 \pm 0.01) ($p < 0.001$). El medio condicionado de cLP07 (MC-LP07) aumento la sobrevivencia de PMN-N (0.33 \pm 0.02; $p < 0.001$) y PMN-I (0.35 \pm 0.0; $p < 0.001$), sin afectar a los PMN-P (0.25 \pm 0.0). La evaluación de apoptosis de PMNs (cultivo 18 hs, DAPI-IP, % células apoptóticas/ totales) mostró un menor n^o de células apoptóticas tanto en PMN-N (36.1 \pm 2.2; $p < 0.001$) como en PMN-I (5.5 \pm 0.8; $p < 0.001$) respecto a PMN-P (14.0 \pm 1.8). El agregado de MC-LP07 redujo la apoptosis de PMN-N (12.5 \pm 2.0 $p < 0.001$) y de PMN-I (0.7 \pm 0.2; $p < 0.01$), sin afectar a los PMN-P (10.0 \pm 2.0). En las mismas muestras se determinó NETs. El MC-LP07 aumentó la netosis en PMN-P y PMN-I. Los PMN-N no formaron NETs en presencia o ausencia de MC-LP07.

Conclusiones: El tumor LP07 produce factores que modulan la actividad de los PMNs, aumentando su viabilidad, reduciendo la apoptosis e induciendo la formación de NETs. El tratamiento in vivo con Indo, revierte parcialmente el efecto inducido por el tumor LP07 sobre los PMNs.

259. (558) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO MUSCARÍNICO DE AUTOANTICUERPOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. PARTICIPACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C, ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS, PROTEÍNA QUINASA C/AMPC

Pelegrina, L.¹, Fiszman, G.², Pignataro, O.³, Azar, M.², Morgado, C.², Sales, M.¹
CEFYBO-CONICET.UBA¹ Instituto de Oncología A.H. Roffo. UBA² IBYME-CONICET³

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en la población femenina. Demostramos la presencia de autoanticuerpos (autoAcs) contra receptores muscarínicos (RM) en la fracción IgG del suero de pacientes con cáncer de mama en estadio I (IgG-T1N0Mx) (tamaño tumoral < 2 cm y sin metástasis ganglionares). Tanto el agonista muscarínico carbacol (CARB) como la IgG-T1N0Mx estimulan la proliferación, migración y actividad de MMP-9 por activación de los RM (subtipos 3 y 4) en células tumorales mamarias humanas MCF-7. Investigamos las vías de señalización implicadas en los efectos de la IgG-T1N0Mx sobre células MCF-7. El efecto proliferativo producido por la IgG-T1N0Mx (150 \pm 5%; $p < 0,001$ vs. control: células sin tratamiento) fue inhibido por: 4-DAMP (10⁻⁹ M) un antagonista selectivo M₃, NCDC (10⁻⁵ M) inhibidor de la fosfolipasa C, L-NMMA (10⁻⁴ M) inhibidor de las óxido nítrico sintasas (NOS) y staurosporina (10⁻⁷ M) inhibidor de proteína quinasa C (PKC) ($p < 0,01$ vs. IgG-T1N0Mx). Además, la estimulación de la actividad de MMP-9 producida por la IgG-T1N0Mx (155 \pm 3.3; $p < 0,01$ vs. control) fue reducida por la incubación previa con NCDC, L-NMMA y staurosporina ($p < 0,01$ vs. IgG-T1N0Mx). Determinamos que la IgG-T1N0Mx inhibe la producción de AMPc (80 \pm 7 % $p < 0,001$ vs. control) y la preincubación con tropicamide (10⁻⁹M), un antagonista selectivo M₄, revierte este efecto ($p < 0,01$ vs. IgG-T1N0Mx). Concluimos que los autoACs de pacientes con cáncer de mama, activan la vía de señalización PLC/NOS/PKC acoplada a receptores M₃ e inhiben la producción de AMPc vinculada al receptor M₄ en células tumorales de mama humana.

260. (569) EFECTO DUAL DE HEMO OXIGENASA-1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA EN EL CONTEXTO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

Jaworski, F.¹, Gueron, G.¹, Giribaldi, L.¹, Gentilini, L.¹, Meiss, R.², Rabinovich, G.^{1,3}, Compagno, D.¹, Vazquez, E.¹, Laderach, D.¹
Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA – IQUIBICEN CONICET.¹ Departamento de Patología, Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina.² Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental - IByME CONICET.³

El cáncer de próstata (CaP) es la afección neoplásica más frecuente y una de las más letales en hombres al no existir terapias efectivas para los pacientes en estadios avanzados. Resulta así imperioso estudiar los mecanismos moleculares implicados con el fin de prevenir o controlar su diseminación. La enzima Hemo Oxigenasa-1 (HO-1), inducida como mecanismo homeostático celular ante procesos inflamatorios, ha sido asociada a menor proliferación, invasión y migración de células tumorales. Previamente reportamos que muestras de tumores generados en ratones nude derivados de células PC3 sobre expresando HO-1 mostraron mayores niveles de ARNm para las galectinas -1 y -8 respecto al grupo control. En el presente trabajo por inmunohistoquímica verificamos que dichos cambios se traducen en un aumento en la expresión a nivel proteico ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente), validando las observaciones precedentes. En base a estas evidencias y a los múltiples mecanismos inmunomoduladores vinculados a HO-1 y las galectinas, estudiamos la regulación por HO-1 sobre la activación linfocitaria. Ensayos de

proliferación linfocitaria inducida por un anticuerpo agonista de CD3 y determinada por dilución de CFSE a las 72 h indicaron que el tratamiento con hemina 70 μ M, inductor de HO-1, aumenta los niveles de proliferación correspondientes tanto a linfocitos T CD8⁺ como CD4⁺. Si bien la activación en presencia de células murinas de CaP TC1 resultó en una fuerte respuesta inmunosupresora, el pre-tratamiento de dichas células con el activador de HO-1 potenció dicho efecto. De manera interesante, al inducir HO-1 simultáneamente en ambos compartimentos se revirtió casi totalmente el efecto inmunosupresor. En todos los casos las diferencias en los niveles de proliferación resultaron significativas con $p < 0,05$. Estos hallazgos indican que la inducción de la enzima tendría efectos duales antagonicos en función de la subpoblación implicada, reforzando la relevancia del microambiente tumoral.

261. (590) ROL DE LOS AUTOANTICUERPOS CONTRA RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA

Martínez Pulido, P.¹, Lombardi, M.¹, Fiszman, G.², Azar, M.², Cresta Morgado, C.², Castro, M.¹, Sales, M.¹
Laboratorio de Inmunofarmacología tumoral. CEFYBO-CONICET¹ Instituto de Oncología A.H. Roffo. UBA²

Los receptores muscarínicos (RM) se expresan tanto en tumores de mama humanos como células de la línea MCF-7, derivada de un adenocarcinoma mamario humano. Describimos que la IgG proveniente de pacientes con cáncer de mama en estadio I (IgG-T1N0Mx) (tamaño tumoral < 2 cm, sin ganglios axilares metastáticos) estimula la proliferación y migración de las células MCF-7 por activación muscarínica. La angiogénesis es central en la progresión tumoral porque promueve tanto el crecimiento tumoral como la diseminación metastásica. Investigamos el efecto muscarínico de la IgG-T1N0Mx sobre la respuesta neovascular inducida por el tumor MCF-7. Estudiamos los niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A) por Western blot y los resultados expresados en unidades de densidad óptica (D.O.) relativa indican que las células MCF-7 expresan VEGF-A (1,01 \pm 0,01; n=3). El tratamiento con IgG-T1N0Mx (10⁻⁶M) incrementó la expresión de VEGF-A (2,51 \pm 0,34; $p < 0,001$ vs. basal) mientras que la preincubación con 4-DAMP o tropicamida (10⁻⁶M) antagonistas selectivos para RM₃ y RM₄ respectivamente revirtió el efecto (1,26 \pm 0,33 $p < 0,001$; 1,65 \pm 0,28 $p < 0,01$ vs. IgG-T1N0Mx; n=4). En ensayos de angiogénesis *in vivo* las células MCF-7 produjeron una respuesta neovascular positiva (N° vasos/mm²) (control: 1,12 \pm 0,2; n=9; MCF-7: 1,86 \pm 0,30; n=15 $p < 0,05$) y el tratamiento de las mismas con IgG-T1N0Mx aumentó la respuesta angiogénica (3,18 \pm 0,5; $p < 0,001$ vs. basal). Este efecto se redujo en presencia de 4-DAMP y tropicamida (2,05 \pm 0,29; 2,15 \pm 0,38; $p < 0,001$ vs. IgG-T1N0Mx). Concluimos que la activación muscarínica por IgG-T1N0Mx promueve la angiogénesis tumoral por activación muscarínica; la presencia de estos autoanticuerpos sería un factor de riesgo en la progresión tumoral.

262. (633) EL ANTÍGENO ERITROCITARIO BANDA 3 INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN EN CÉLULAS B DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

Morande, P.¹, Borge, M.¹, Nannini, P.¹, De Los Ríos, M.¹, Bezares, R.², Gamberale, R.¹, Giordano, M.¹
IMEX¹ Hospital de Agudos Dr. Teodoro Álvarez²

La leucemia linfática crónica (LLC) es la causa más frecuente de anemia hemolítica autoinmune (AHA) en el adulto, pero se desconoce aún el motivo de esta asociación. Nosotros demostramos que las células B leucémicas actúan como células presentadoras de la proteína eritrocitaria Banda 3 (B3) induciendo la proliferación de linfocitos T autorreactivos. En el presente trabajo estudiamos si la unión de B3 a las células LLC tiene efectos sobre su estado de activación. Para ello trabajamos con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de pacientes LLC y evaluamos la expresión de las moléculas de activación CD69, CD25 y CD86 por citometría de flujo, discriminando la población LLC por triple marcación. Encontramos que la incubación de CMSP por 24 hs

con B3 (50 ug/ml) incrementa el porcentaje de células LLC que expresan CD69 y la media de intensidad de fluorescencia (52+6% versus 61+6%; MIF=65+11 vs MIF=75+12, control vs B3, $p < 0,01$ para ambos parámetros, n=20). Las diferencias son significativas a partir de las 6 hs de incubación. No observamos efectos aditivos al incremento de CD69 inducido por IFN- α o CpG (n=6). La expresión de CD25 también fue incrementada por B3 a las 48 hs de cultivo (MFI=85+11 vs MFI=97+12, control vs B3, $p < 0,05$, n=13). No encontramos diferencias en la expresión de CD86 (n=20). B3 indujo la secreción de IL-6 en 5 de 9 pacientes estudiados, sin afectar la secreción de IL-10. No encontramos asociación entre el efecto de B3 y los marcadores pronóstico CD38 y ZAP-70, ni en relación al estadio Rai/Binet de la enfermedad. Nuestros resultados sugieren que el reconocimiento de B3 por parte de las células LLC no sólo les permite endocitar y presentar péptidos derivados a linfocitos T autorreactivos, si no también incrementa su nivel de activación.

263. (680) EL ACONDICIONAMIENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CON ACIDO HIALURÓNICO AUMENTA SU CAPACIDAD DE MIGRACIÓN

Rizzo, M., Piccioni, F., Malviccini, M., Lloyd, R., Garca, M., Atorrasagasti, C., Bayo, J., Fiore, E., Alaniz, L., Andriani, O., Terrez, M., Mazzollini, G.
Hospital Universitario Austral

Las células dendríticas (CD) son las principales células encargadas de iniciar y coordinar la respuesta inmunitaria frente a antígenos, por lo cual han sido utilizadas en el tratamiento contra el cáncer. Una vez inoculadas, la respuesta inmunitaria inducida depende, al menos en parte, de su capacidad de migrar hacia los órganos linfáticos secundarios donde puedan gatillar la respuesta antitumoral. La forma en la que las CD son cultivadas y activadas, previo a su empleo como vacunas terapéuticas contra el cáncer, es muy heterogénea así como lo son los resultados de su empleo a nivel clínico. Planteamos el empleo del ácido hialurónico (AH) como un componente del "cocktail" de maduración de las CD con el fin de mejorar su eficacia para generar inmunidad antitumoral. Nos centramos en evaluar cambios en la capacidad de migración de las CD usando AH. **Objetivo:** Determinar si el empleo de AH es capaz de activar y modular la capacidad de migración de las CD pulsadas con antígeno tumoral (CD/LT/AH) provenientes tanto de voluntarios sanos como de pacientes con tumor de colon primario y/o metastásico, e investigar qué receptores podrían estar involucrados. **Material y métodos:** Realizamos ensayos de migración *in vitro* en cámara de Boyden, evaluamos marcadores de maduración de CD por citometría de flujo y la expresión de receptores involucrados en esta respuesta mediante qPCR. **Resultados:** Las CD/LT/HA derivadas de voluntarios sanos presentan un índice de migración hacia CCL21 *in vitro* significativamente mayor (1,5-3) respecto a las CD no tratadas con AH (CD/LT), sin afectar la expresión CCR7. El tratamiento con AH aumenta la expresión de CMH II sin modificar CD80, CD83, CD86 y CD40. Pudimos observar también que este tratamiento modula la expresión de TLR2-4 y CD44, receptores involucrados en la señalización de AH. En 2/8 DC/LT/AH derivadas de pacientes observamos un efecto similar, aumentando su capacidad de migrar y la expresión de CMH II. **Conclusión:** Sugerimos que el AH podría ser un adyuvante en los cocktails de maduración de CD utilizadas para inmunoterapia, mejorando su capacidad de migración y de presentación antigénica.

264. (687) INMUNOTERAPIA UTILIZANDO UNA CEPA VACUNAL DE SALMONELLA TYPHI ATENUADA PARA LA PREVENCIÓN DE METÁSTASIS HEPÁTICAS EN UN MODELO MURINO

Vendrell, A.¹, De Toro, J.¹, Herschlik, L.¹, Gravisaco, M.², Goin, J.¹, Larotonda, G.³, Mongini, C.¹, Waldner, C.¹
CEFYBO-CONCET/Facultad de Medicina UBA¹ Instituto de Biotecnología, INTA Castelar² Lavet Lab Argentina³

En estudios previos hemos demostrado que una cepa vacunal de *Salmonella* Typhi atenuada (CVD 915) cuando es inoculada en forma intratumoral y subcutánea (s.c) induce una respuesta inmu-

ne antitumoral específica en ratones portadores de un adenocarcinoma mamario (LM3) s.c. El efecto terapéutico se evidenció por un aumento de la supervivencia, un retraso del crecimiento tumoral y una drástica disminución en la incidencia de metástasis pulmonares en los ratones tratados comparados con los controles. Dado que los adenocarcinomas mamarios comúnmente hacen metástasis hepáticas decidimos estudiar si la CVD 915 administrada por vía orogástrica (o.g.) puede prevenir la implantación de células LM3 en el hígado, en un modelo murino de metástasis hepáticas. Se inoculó por vía o.g un grupo de ratones BALB/c con 5×10^6 UFC de CVD 915 mientras que a otro grupo se le administró PBS (grupo control). Al cabo de 24 h, los ratones fueron sometidos a una cirugía en la que se les inyectó en el bazo 50000 células LM3. Luego se practicó una esplenectomía para remover el tumor primario. A los 22 días de la implantación del tumor, el tratamiento preventivo con CVD 915 disminuyó significativamente la aparición de focos de metástasis hepáticas ($p=0,0179$) y el volumen medio de las mismas (1.9 vs 6.2 mm³, $p=0,0247$), en los ratones tratados con respecto al lote control. En ese tiempo se observaron un aumento en la frecuencia de los linfocitos CD4⁺ y una disminución en la frecuencia de los linfocitos B (células B220⁺), tanto en el hígado como en sangre periférica de los animales tratados con CVD 915 ($p<0,05$). Estos resultados indican que la vacuna CVD 915 al ser utilizada en forma preventiva por vía o.g., induce una respuesta antitumoral capaz de reducir el crecimiento de metástasis en un órgano vital y sugieren su utilización potencial como una terapia adyuvante para el cáncer

265. (688) ANTÍGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI INDUCEN INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL QUE PROTEGE DEL CRECIMIENTO TUMORAL EN MODELOS DE CÁNCER INDUCIDO QUÍMICAMENTE

Chiale, C.¹, Ubillos, L.^{1,2}, Chiribao, M.³, Robello, C.³, Osinaga, E.^{1,2}, Freire, T.^{1,2}

Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Uruguay¹ Unidad de Glicobiología e Inmunología Tumoral, Institut Pasteur Montevideo, Uruguay² Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo, Uruguay³

Existen datos epidemiológicos que han revelado una relación inversa entre la incidencia de algunas enfermedades parasitarias y el desarrollo de cáncer. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la inmunización con extractos de *Trypanosoma cruzi* disminuye significativamente el desarrollo de cáncer de colon y mama en ratas sometidas a carcinogénesis química con DMH y NMU, respectivamente. En este trabajo estudiamos los mecanismos inmunológicos que podrían estar mediando dicha protección anti-tumoral. En particular, hemos comprobado que esplenocitos de ratas inmunizadas con *T. cruzi* son capaces de mediar la eliminación de células tumorales. De la evaluación de las poblaciones celulares presentes en estas ratas, detectamos un aumento en la población de macrófagos en bazo, lo que nos ha conducido a evaluar la actividad macrofágica a través del estudio del estadillo respiratorio. De manera complementaria, observamos que los anticuerpos desarrollados en ratas inmunizadas con *T. cruzi* poseen una notable especificidad por células tumorales, mientras que no reconocen las células normales. Asimismo, dichos anticuerpos son capaces de mediar la eliminación de células tumorales, como lo demuestran los ensayos de Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos realizados. Nuestros resultados muestran que los antígenos de *T. cruzi* son capaces de inducir respuestas inmunitarias capaces de mediar la eliminación de células tumorales y conferir protección en los modelos de cáncer inducido químicamente evaluados. Estos datos sugieren existencia de antígenos parasitarios capaces de inducir respuestas inmunológicas con especificidad por células tumorales.

266. (699) DETECCIÓN EN TUMORES DE MAMA DE LA ENZIMA INDOLAMINO-2,3-DIOXIGENASA INVOLUCRADA EN MECANISMOS DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

Isla Larrain, M., Rabassa, M., Lacunza, E., Blas, Y., Barbera, A., Cretn, A., Terrier, F., Segal-Eiras, A., Croce, M.

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad Ciencias Médicas, UNLP

La Indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) es una enzima de 42-45 kD que cataliza la degradación del Trp, asociada a mecanismos de tolerancia inmunológica. Está vinculada con la inducción de linfocitos T regulatorios y disminución de T activados. Se ha sugerido su relación con mecanismos de evasión tumoral. **Objetivos:** Determinar si la presencia de IDO en tumores de mama y exosomas derivados de ellos y en líneas celulares mamarias es significativa en relación a muestras controles. Realizar un análisis *in silico* para determinar los genes asociados a IDO. Se analizaron 50 de pacientes con cáncer de mama; 22 controles benignos y normales; líneas de cultivo MCF7 y T47D. Se utilizó anticuerpo monoclonal anti-IDO (Millipore). Se halló reacción inmunohistoquímica positiva en el 44% de las muestras de pacientes con cáncer de mama y 25% de las muestras benignas, dando reacción negativa las normales. Las células de líneas tumorales presentaron reacción con un patrón citoplasmático. Mediante cromatografía en columna de exclusión molecular y ultracentrifugación diferencial se obtuvieron fracciones enriquecidas en exosomas a partir de plasma. Por Western blot, en 4/11 de las fracciones enriquecidas en exosomas obtenidos de plasma de pacientes se observó una banda de 42 kD compatible con IDO. Se emplearon para el análisis *in silico* herramientas bioinformáticas basadas en Multiexperiment Matrix (MEM); las redes de interacción proteína/gen mediante solapamiento de genes y estudio proteína/proteína por base de datos STRING. Los análisis *in silico* mostraron asociación de IDO con 2 clusters de genes relacionados con proliferación celular, respuesta inflamatoria, además de genes que participan en apoptosis. La presencia de esta enzima en los tumores de mama, en líneas de cáncer de mama y también en exosomas liberados por el tumor permitirían inferir su papel en la generación de tolerancia inmunológica al tumor, por lo que esta enzima constituiría un estratégico blanco terapéutico.

267. (702) IMIQUIMOD AUMENTA LA CAPACIDAD ESTIMULATORIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COCULTIVADAS CON CÉLULAS APOPTÓTICAS Y NECRÓTICAS DE MELANOMA

Mac Keon, S.¹, Bruzzone, L.¹, Mordoh, J.¹, Wainstok, R.² Fundación Instituto Leloir¹ Lab de Biología Tumoral, Depto de Quím. Biol, FCEN, UBA. IQUIBICEN-CONICET.²

Las células dendríticas murinas derivadas de médula ósea (CD) poseen la capacidad de incorporar antígenos de células apoptóticas y necróticas del melanoma B16F1 (Apo/Nec). En nuestro laboratorio observamos que al vacunar ratones C57BL/6 con células CD-Apo/Nec se obtiene hasta 80% de protección antitumoral. Investigando condiciones que potencien su capacidad inmunoestimuladora, se evaluó la capacidad funcional *in vitro* de CD-Apo/Nec con ensayos de reacción linfocitaria mixta. Se observó que las CD-Apo/Nec no diferían del control en su capacidad estimuladora *in vitro* ($p>0,05$). Sin embargo, CD en ausencia de las células Apo/Nec son funcionales, ya que al madurarlas con LPS o Imiquimod poseen alta capacidad estimuladora ($p<0,05$). Con el objetivo de aumentar la capacidad estimuladora *in vitro* de las células CD-Apo/Nec se ensayaron diferentes cócteles durante el co-cultivo de 24 hs de las CD con las Apo/Nec. Un cóctel estándar consistente en citoquinas inflamatorias (TNF- α 10ng/ml, IL1-B 10ng/ml, IL6 1 ug/ml, PGE2 1ug/ml) no fue capaz de mejorar la capacidad estimuladora de las CD-Apo/Nec. Se realizó un screening evaluando la hiperregulación de marcadores de maduración (CD80, CD86 y CMH-II) en las CD utilizando diferentes combinaciones de ligandos de Receptores de tipo Toll. Las mejores condiciones fueron obtenidas con Poli I:C (30 ug/ml) más Imiquimod (10ug/ml) más PGE2 (10 ug/ml). Sin embargo, no se obtuvo un aumento en la capacidad estimuladora por ensayos de reacción linfocitaria mixta. Llamativamente, al realizar el co-cultivo con Imiquimod (10 ug/ml) se logró aumentar la capacidad estimuladora de las CD-Apo/Nec ($p<0,05$). Este efecto no se debió a una disminución en la incorporación de células Apo/Nec, ya que no hubo diferencias significativas en la capacidad fagocítica

($p > 0,05$). Estos hallazgos serían importantes para el diseño de futuras terapias anti-melanoma basadas en células dendríticas cargadas con células tumorales apoptóticas y necróticas.

268. (717) CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO FUNCIONAL DE UNA VACUNA COMPUESTA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS COCULTIVADAS CON CÉLULAS APOPTÓTICAS Y NECRÓTICAS DE MELANOMA MURINO B16F1

Campisano, S.¹, Mac Keon, S.³, Gazzaniga, S.¹, Ruiz, M.¹, Mordoh, J.³, Wainstok, R.^{1,2,3}

Lab. de Biología Tumoral. Dpto. de Qca. Biológica. Fac. de Cs. Exactas y Naturales. UBA.¹ IQUIBICEN-CONICET.² Fundación Instituto Leloir-IIBBA CONICET.³

La vacunación con células dendríticas (CD) derivadas de médula ósea (MO) cocultivadas con células apoptóticas/necróticas (ApoNec) de melanoma murino B16F1, induce protección dependiente de linfocitos T (LT) CD4+ y CD8+. Luego de la separación magnética con microesferas anti-CD11c, las fracciones resultantes: CD11c+ (CD+) y CD11c- (CD-), cocultivadas con ApoNec, no indujeron protección *in vivo*. Nuestro propósito fue evaluar si esta ausencia de protección está asociada a una menor eficiencia de captación y presentación antigénica *in vitro* de las células presentes en CD+/ApoNec y CD-/ApoNec, respecto a CD/ApoNec. Luego del cultivo de precursores de MO con GMC-SF murino y separación magnética, se determinaron los niveles de CMHII y CD86, se realizaron experimentos de fagocitosis de ApoNec, endocitosis de FITC-dextran (antes y después de incubación con LPS), y proliferación linfocitaria alogeneica. CD, CD+ y CD- expresaron niveles similares de CMHII y CD86. Presentaron una eficiencia similar para fagocitar: CD (24,5 ± 3,4%), CD+ (27 ± 7,4%) y CD- (31,8 ± 7,5%) y endocitar: CD (59,5 ± 1%), CD+ (48,1 ± 2,3%) y CD- (57,9 ± 4,2%). Luego de la incubación con LPS, disminuyó la capacidad endocítica ($p < 0,001$), demostrando que las células son capaces de reaccionar frente a un estímulo madurativo. Todas las fracciones estimularon LT con respecto al control negativo ($p < 0,001$). Luego del co-cultivo, CD+ y CD- disminuyeron su capacidad estimuladora (CD+ vs. CD+/ApoNec $p < 0,001$; CD- vs. CD-/ApoNec $p < 0,01$), mientras se mantuvo constante en CD. Consideramos que la ausencia de protección alcanzada con CD+/ApoNec y CD-/ApoNec no puede atribuirse a una menor capacidad de captación y presentación antigénica *in vitro* respecto de CD/ApoNec, y dado que las distintas fracciones celulares presentan características funcionales similares, consideramos que para inducir protección antitumoral es necesaria la cooperación *in vivo* de las CD CD11c+ con las demás células provenientes del cultivo de MO.

269. (746) OBSTÁCULOS PARA LA INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL EN UN MODELO MURINO

Chiarella, P., Bruzzo, J., Machuca, D., Dran, G., Rugiero, R.

Laboratorio Oncología Experimental - IMEX - CONICET

En trabajos anteriores demostramos que la terapia en 2 pasos con células dendríticas estimuladas con extracto tumoral (CD) más una dosis baja de dexametasona (DX) (DX+CD) fue efectiva para retardar el crecimiento de un tumor establecido pero no para eliminarlo, presumiblemente porque luego de cierto volumen tumoral la mayoría de los linfocitos potencialmente reactivos contra el tumor se encuentran tolerizados. Es por ello que decidimos agregar a la terapia DX+CD una transferencia adoptiva de linfocitos naïve, que de este modo podrían ser estimulados por las CD. Si bien hubo mejorías en los días 29 ($p < 0,01$) y 36 ($p < 0,001$) de crecimiento tumoral con respecto a DX+CD, a medida que los tumores iban creciendo no se observaron diferencias entre ambos tratamientos. Es posible que aún los linfocitos transferidos sean tolerizados por un ambiente inmunosupresor generado por el tumor, explicando por qué la terapia fue perdiendo eficacia a medida que el tumor crecía. Sabemos que la aplicación de DX disminuye una población mieloides potencialmente inmunosupresoras (MDSC), pero no la elimina. Para diferenciar estas MDSC se agregó ATRA en el tratamiento. Esto

retardó el crecimiento tumoral y aumentó la supervivencia respecto de los controles ($p < 0,001$), pero solo mejoró los resultados entre los días 25 y 40 ($p < 0,01$) respecto de DX+CD, y no más tarde cuando el tratamiento con ATRA fue suspendido. Cuando precursores de médula ósea de un ratón normal o con tumor, se cultivaron con GF-CSF en un medio condicionado de tumor o en suero de ratones portadores de tumor, se observó una reducción en el número de CD y un aumento de MDSC ($p < 0,05$), conjuntamente con un aumento de IL-10 ($p < 0,001$) y TNF- α ($p < 0,01$) y a su vez bajos niveles de IL-12p70 ($p < 0,001$) en el sobrenadante del cultivo. Esto sugiere que el tumor genera permanentemente factores promotores de MDSC, cuya eventual eliminación mejoraría la aplicación de los distintos tratamientos inmunológicos.

270. (805) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE UNA CEPA DE SALMONELLA TYPHI EN UN MODELO MURINO DE LINFOMA T

Vendrell, A.¹, De Toro, J.¹, Herschlik, L.¹, Gravisaco, M.², Goin, J.¹, Larotonda, G.³, Mongini, C.¹, Waldner, C.¹

CEFYO-CONICET/Facultad de Medicina UBA¹ Instituto de Biotecnología, INTA, Castelar. Buenos Aires² Lavet Lab Argentina, Buenos Aires³

Previamente demostramos la eficacia terapéutica de una cepa vacunal atenuada de *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*) como inmunoterapia en un modelo murino de un linfoma T metastásico. Los ratones portadores del tumor EL4 e inmunizados con la CVD 915 en forma intratumoral y en el área de los ganglios drenantes mostraron un retraso en el crecimiento tumoral y un aumento de la supervivencia. En este trabajo profundizamos el estudio de la eficacia terapéutica y de los mecanismos efectores antitumorales promovidos por la bacteria. Nuestros resultados indicaron que el tratamiento con la *S. Typhi* promovió una reducción en el índice mitótico de los tumores ($p < 0,05$) y un retraso en el desarrollo de metástasis palpables en los nódulos linfáticos ($p < 0,001$). La administración de *Salmonella* en los ratones portadores del tumor promovió una infiltración leucocitaria, principalmente de neutrófilos ($p < 0,01$) y disminución de los niveles de IL-10 en el microambiente tumoral ($p < 0,05$). Por otra parte detectamos que la *Salmonella* permanece viable dentro del tumor y que los neutrófilos infiltrantes expresan antígenos de la bacteria. Finalmente, demostramos que la *Salmonella* se adhiere a las células tumorales y ejerce actividad oncolítica dependiendo del contacto directo con la célula tumoral. Estos resultados demuestran la eficacia de una cepa vacunal de *S. Typhi* como un agente oncolítico e inmunoterapéutico contra un tumor altamente maligno.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 2

271 (78) EL COACTIVADOR GRIP1 ESTÁ INVOLUCRADO EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES POR RSUME

Druker, J.¹; Liberman, A.¹; Gerez, J.¹; Rein, T.²; Holsboer, F.²; Arzt, E.¹

Instituto de investigación en Biomedicina de Buenos Aires -CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck¹ Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania²

La actividad del receptor de glucocorticoides (GR) está regulada por sumoilación. Se han descrito tres sitios consenso de sumoilación para el GR: lisina (K) 297 y K313 localizados en el N-terminal, mientras que el tercer sitio (K721) está en el dominio de unión al ligando (LBD). Existe poca evidencia acerca de la relevancia del sitio K721 sobre la actividad transcripcional del GR. Considerando que pequeños cambios en el LBD pueden alterar la actividad de coactivadores sin afectar su interacción con el GR, decidimos estudiar la implicancia del tercer sitio de sumoilación del GR y su relación con el coactivador GRIP1 sobre la regulación de la actividad transcripcional del GR por RSUME. Demostramos por Western blot que RSUME aumenta la sumoilación del GR y este efecto no se observa con la mutante estructural de RSUME, Y61A/P62A. Además, RSUME aumenta la

actividad transcripcional del GR medida por ensayos reporteros ($p < 0.05$). Estos resultados fueron validados por PCR en tiempo real, observando que la sobreexpresión de RSUME aumenta los niveles del mRNA de un gen blanco del GR, mientras que tanto el silenciamiento de RSUME por siRNA como la sobreexpresión de Y61A/P62A muestran un efecto opuesto, indicando que RSUME es necesario para la modulación de la actividad del GR en el contexto natural de la cromatina. A través de ensayos de purificación de proteínas conjugadas a 6xHis-SUMO, demostramos que RSUME aumenta la sumoilación del tercer sitio K721, mientras que RSUME no aumenta la actividad del GR cuando se utilizan las mutantes K721R y K297/313/721R. En forma interesante, aunque GRIP1 interacciona con la mutante K721R, su capacidad de coactivador se ve afectada cuando la K721 está mutada. Además, el siRNA de RSUME inhibe la estimulación de GRIP1 sobre la actividad del GR. RSUME podría modular la respuesta a glucocorticoides, regulando la actividad del GR a través de la sumoilación del tercer sitio, modificando así, la función de coactivadores tales como GRIP1.

272. (287) RECEPTOR OXER1, PROTEÍNA DE MEMBRANA PERTENECIENTE A LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G, CON ALTA AFINIDAD PARA PRODUCTOS DE LA 5-LIPOXIGENASA: PRESENCIA EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS Y PARTICIPACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE STAR

Cooke, M. ; Cornejo Maciel, F.
INBIOMED, UBA-CONICET. Dept. Bioquímica Humana,
Fac. de Medicina, UBA

La regulación hormonal de la esteroideogénesis involucra al ácido araquidónico (AA), precursor de los productos lipoxigenados necesarios para la inducción de la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) y activación de la esteroideogénesis. A pesar de conocer la participación de los productos de la 5-lipoxigenasa, especialmente del ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico, en la regulación de la actividad del promotor de la proteína StAR, aún se desconoce su mecanismo de acción. Por otro lado, está postulado que los productos lipoxigenados son secretados y que funcionarían en forma autócrina estimulando un receptor de membrana denominado OxeR1 perteneciente a los receptores acoplados a proteína G y con alta afinidad por los productos de la 5-lipoxigenasa. Es por ello que postulamos que la acción del AA y sus metabolitos sobre la producción de esteroides se ejercería a través de la activación del receptor OxeR1. En este estudio verificamos la presencia y funcionalidad del receptor OxeR1 en la regulación de la síntesis de esteroides. Tanto el ARNm como la proteína OxeR1 están presentes en células esteroideogénicas, determinados por RT-PCR y western blot respectivamente. La funcionalidad del OxeR1 fue corroborada por tratamiento de las células de Leydig MA-10 tanto con un antagonista como con un agonista del receptor. Mientras que el antagonista ácido docosa-hexaenoico ejerce un efecto inhibitorio sobre la esteroideogénesis, el 5-oxoETE (500 nM), el más potente agonista de este receptor, produjo un incremento significativo en los niveles de la proteína StAR evaluados por western blot y en la síntesis de esteroides determinada por radioinmunoensayo ($p < 0.05$). Este trabajo nos permite sugerir que los productos lipoxigenados actuarían en forma autócrina a través de receptores de membrana en la regulación de la síntesis de esteroides mediada por AMPc.

273. (424) CYPA FORMA COMPLEJOS CON P23 Y PROTEGE A LAS CÉLULAS CONTRA ESTIMULOS APOPTÓTICOS

Daneri Becerra, C.¹; Galigniana, M.¹²; Lagadari, M.¹
IByME¹ FCEN-UBA/IQUIBICEN²

CyPA es una inmunofilina (IMM) de 17-kDa que adquiere propiedades inmunosupresoras al unir la droga ciclosporina A. CyPA es abundante en todos los tejidos, lo que sugiere su participación en otros procesos biológicos. Si bien CyPA estaba descrita clásicamente como una proteína citoplasmática, nuestro laboratorio reportó recientemente que también es un factor mitocondrial que se concentra en el núcleo frente a variados tipos de estrés. Esta

observación es similar a la que realizamos previamente con otra IMM, FKBP51, a la que le encontramos acción antiapoptótica. Para comprender la posible función biológica de CyPA en las mitocondrias, estudiamos el efecto de su sobreexpresión en células sometidas a estímulos proapoptóticos. Cuando las células fueron expuestas a H₂O₂ o estaurosporina, CyPA se concentró en el núcleo, fenómeno observado en varios tipos celulares. Tal translocación es reversible ya que CyPA abandona el núcleo cuando cesa el estímulo, siendo su exportación independiente de CRM-1. La sobreexpresión de CyPA favoreció la resistencia de las células a la apoptosis, indicando que podría ser ésta una función biológica aún desconocida de CyPA. Cuando células de neuroblastoma se expusieron a 20 µM H₂O₂ por 30 min y fueron analizadas 5 h después por microscopía de fluorescencia, se observó que tanto CyPA como la cochaperona p23 habían abandonado el núcleo y colocalizaban en el citoplasma. La inmunoprecipitación de p23 demostró que CyPA forma complejos con la cochaperona. Para analizar esta asociación, se inmunoprecipitó a p23, se trató al pellet con buffers astringentes para eliminar proteínas coadsorbidas, se resolvió a p23 por SDS/PAGE y se le realizó un Far-Western blot con GST-CyPA recombinante, encontrándose que CyPA y p23 interaccionan directamente. Siendo que la sobreexpresión de p23 también produjo resistencia a la apoptosis, sugerimos que el nuevo complejo CyPA-p23 podría estar relacionado con la novedosa función antiapoptótica de CyPA.

274. (508) EFECTOS ANTIAPÓPTÓTICOS DEL 17β-ESTRADIOL Y DE LA TESTOSTERONA EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ER Y AR, MANGANESO SUPERÓXIDO DISMUTASA Y CITOCROMO C OXIDASA

La Colla, A.; Pronsato, L.; Ronda, A.; Vasconsuelo, A.; Milanesi, L.; Boland, R.
Laboratorio de Química Biológica, Dto BByF, UNS

El 17β-estradiol (E2) y la testosterona (T) son esteroides típicamente relacionados con funciones reproductivas. Sin embargo, se ha demostrado que ambas hormonas son capaces de ejercer prácticamente en toda célula animal acciones no relacionadas con la reproducción. Este es el caso del músculo esquelético donde, durante el envejecimiento, se observan patologías del tejido como la sarcopenia. Aunque las bases moleculares no han sido completamente aclaradas, se la asocia a bajos niveles de E2 y T que causan una disregulación de la apoptosis. Previamente demostramos que el E2 y la T inhiben la apoptosis inducida por H₂O₂ en células musculares esqueléticas. En este trabajo demostramos que el E2 a concentraciones fisiológicas promueve un aumento de la expresión y la actividad enzimática de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), mientras que el esteroide incrementa la actividad de la citocromo c oxidasa IV (COX IV) sin producir cambios significativos en la expresión. Mediante la utilización del antagonista fulvestrant, y por ensayos de coinmunoprecipitación, se evidenció que el receptor de estrógenos (ER) participa en estos eventos. Además, observamos una disminución en la expresión de MnSOD y en la actividad de COX IV cuando las células eran tratadas con H₂O₂, efectos que fueron revertidos por el agregado previo de la hormona. Por otra parte, experimentos con el antagonista flutamida indican que la acción antiapoptótica de la T involucra su receptor (AR). El AR se localiza en núcleo, mitocondria y microdominios de membrana plasmática. Se demostró que el AR interacciona con caveolina-1. El complejo fue disociado por el tratamiento con T, lo que implica translocación del AR de la membrana hacia otro compartimiento subcelular. Nuestros estudios sugieren que el E2 y la T ejercen un rol en la protección de células musculares y profundizan el conocimiento de las bases moleculares de miopatías asociadas a disregulación de la apoptosis por estados de déficit hormonal.

275. (514) IMPLICANCIAS DEL PROCESO DE EXCLUSIÓN DE AMPc MEDIADO POR MRP4 EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN MODELOS DE ADENOCARCINOMAS DUCTALES PANCREÁTICOS

Carozzo, A.¹; Diez, F.¹; Copsel, S.²; Shayo, C.²; Fernández, N.¹; Davio, C.¹

Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, FFyB, UBA.¹ Laboratorio de Farmacología y Patología Molecular, IBYME, CONICET.²

Diversos reportes indican que el AMPc se encuentra involucrado en la regulación del crecimiento y la diferenciación de células normales y malignas. Los niveles de AMPc intracelular (AMPci) resultan del balance entre su producción, degradación y exclusión. Previamente describimos el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 en líneas celulares de carcinomas ductales pancreáticos (PDAC): BxPC3, HPAF y Panc1. 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 como objetivo evaluar la relación entre el proceso de exclusión de AMPc mediado por MRP4 y el grado de diferenciación de líneas celulares de PDAC. Estudios cinéticos mostraron un aumento en los niveles de AMPc extracelular (AMPce) frente al tratamiento con forskolina e isoproterenol que es inhibido en un 80% por probenecid (inhibidor de MRP4) ($p < 0.01$). La relación AMPce/AMPci fue mayor en las líneas más indiferenciadas y malignas (Panc1 vs HPAF y BxPC3; $p < 0.01$). Consistentemente, al analizar la expresión de MRP4 por PCR cuantitativa, observamos mayores niveles de RNAm en las células Panc1 ($p < 0.05$). Resultados similares fueron obtenidos por Western Blot. El análisis de los niveles basales de AMPce mostró que la exclusión de este segundo mensajero es un proceso que ocurre aún en ausencia de estímulo y no sólo como consecuencia de su incremento citoplasmático. Dicha exclusión basal también resultó inhibible por probenecid, por lo cual evaluamos el efecto del inhibidor sobre la proliferación de células Panc1, observando una inhibición del 50% luego de 6 días de tratamiento ($p < 0.05$). Resultados similares fueron obtenidos al silenciar MRP4 con shRNA. Estos resultados indican una correlación entre el grado de malignidad, la expresión de MRP4 y la regulación de los niveles de AMPc. Más aun, dicho proceso modula la proliferación celular convirtiendo a MRP4 en un prometedor blanco terapéutico para los PDAC.

276. (550) RECEPTORES P2 MODULAN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPS) EN CULTIVO PRIMARIO DE OSTEÓBLASTOS DE CALVARIA DE RATA NEONATA

Ayala, V.; Santillán, G.
Universidad Nacional del Sur

Los osteoblastos son células que surgen por diferenciación de las células osteoprogenitoras, bajo la influencia de diversas proteínas, dentro de ellas las BMPs. Se sabe que distintos tipos de estrés como fuerzas mecánicas, ultrasonido, etc. estimulan la expresión de algunas BMPs y la formación de hueso. A su vez se ha reportado que estos estímulos aumentan la acumulación de ATP y UTP en el espacio extracelular. Estos o sus metabolitos pueden actuar sobre receptores P2 (P2X, ionotrópicos y P2Y, metabotrópicos) de la membrana plasmática para inducir diversas respuestas celulares. En este trabajo estudiamos el efecto de ATP, ATPγS, UTP, ADPβS, y UDP (10 y 100 μM) sobre la diferenciación de osteoblastos, evaluando la formación de nódulos de mineralización por tinción con rojo de alizarina y los niveles de expresión génica de BMP-4, BMP-5, y BSP (sialoproteína ósea), por técnicas de QRT-PCR, en función del tiempo de tratamiento en osteoblastos de calvaria de rata (OBC) en medio osteogénico. OBC tratados con ATP o UTP 100 μM en medio osteogénico comenzaron a presentar cambios morfológicos a partir del día 7 de tratamiento, dichos cambios se correlacionaron con un aumento significativo, respecto a los controles, en la expresión génica de BMP-4, BMP-5, y BSP. Además, bajo esas mismas condiciones, se observó alrededor del día 22 un incremento en la deposición de calcio con respecto a los controles. Sin embargo a concentraciones 10 μM, ATP o UTP incrementan, en forma significativa, los niveles de expresión génica de BMP-4 y BSP a tiempos tempranos

(2-3 días de tratamiento) respecto a los controles, pero BMP-5, sólo resultó ser responsiva a UTP 10 μM. Estos resultados sugieren un rol importante para los receptores P2Y2 y/o P2Y4 en la maduración de células óseas y demostramos, por primera vez, que los nucleótidos extracelulares modulan la expresión de genes responsables de la maduración y función del osteoblasto como BMP-4, BMP-5, y BSP.

277. (259) PERMEABILIZACIÓN LISOSOMAL: UN EVENTO APICAL EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR MANGANESO EN LA ASTROGLIA

Gorojod, R.; Alaimo, A.; Kotler, M.
Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso / Nano-Oncología. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQUIBICEN-CONICET

La disfunción lisosomal ha sido relacionada con numerosas patologías neurodegenerativas. En la enfermedad de Parkinson, el aumento en la generación de ROS induce la permeabilización de la membrana lisosomal produciendo deficiencias en la capacidad degradativa de las células y permitiendo la translocación de proteasas al citosol (entre ellas, catepsinas B y D) y el consecuente clivaje de sustratos ectópicos llevando a la muerte celular. El Manganismo es un Parkinsonismo inducido por exposición crónica a manganeso (Mn) y comparte tanto sintomatología como vías de señalización con la enfermedad de Parkinson. Numerosos estudios señalan a los astrocitos como un blanco temprano del daño producido por el metal. El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible relación entre la permeabilización de la membrana lisosomal y la apoptosis inducida por Mn. Para ello, células C6 de astrocitoma de rata fueron expuestas a Mn durante 6 ó 24hs y se evaluó el efecto de la preincubación durante 1h con los inhibidores de las Catepsinas B (Ca-074 Me, 1 μM) y D (Pepstatina A, 10 μM) y de la v-ATPasa responsable de la acidificación de los lisosomas (Bafilomicina A1, 0,1 nM). Tanto Ca-074 Me como Pepstatina A previnieron totalmente la muerte celular medida por MTT luego de 24hs de exposición a Mn ($p < 0.001$), mientras que la Bafilomicina A1 lo hizo parcialmente ($19 \pm 2\%$, $p < 0.001$). Además, la preincubación con Pepstatina A o Bafilomicina A1 lleva a una menor activación de las caspasas 3 y 8 ($p < 0.05$) y a una disminución en los niveles de expresión de la proteína Fas ligando ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente). Además, ambos inhibidores previnieron parcialmente la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente). Estos datos sugieren un rol apical para la vía de muerte lisosomal en la apoptosis inducida por Mn y permiten proponerla como un posible blanco para la terapia del manganismo y probablemente otras enfermedades neurodegenerativas.

278. (728) PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR LA VÍA MIX-AMPc EN LA DIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS 3T3-L1 A ADIPOCITOS

Gabrielli, M.¹; Romero, D.²; Price, J.²; Martini, C.¹; Vila, M.¹
Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN - FCEyN - UBA¹ Dept. of Biochemistry - University of Mississippi Medical Center²

Los fibroblastos 3T3-L1 son un modelo importante para estudiar el proceso de diferenciación a adipocitos. Estas células, por agregado de una mezcla que contiene insulina, dexametasona y metilisobutilxantina (I+D+MIX) al cabo de unos ocho días diferencian a adipocitos. Sin embargo, no se alcanza esta diferenciación si se las trata en presencia sólo de I+D. Con el fin de identificar genes activados por MIX que sean necesarios para la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos se hizo un estudio de expresión de genes por microarray. Se analizaron luego de tres días de tratamiento los mensajeros en células controles, tratadas con mezcla de diferenciación (I+D+MIX) o sólo con insulina y dexametasona (I+D). En el análisis se encontró que MIX modifica significativamente la expresión de varios genes, algunos de ellos asociados a distintos caminos metabólicos como por ejemplo el metabolismo energético. Entre estos genes modificados en

presencia de MIX se encuentran algunos de los que han sido previamente descritos como asociados a la adipogénesis como C/EBP β , PPAR γ , ácido graso sintetasa, o SREBF1, pero también hay nuevos genes no descritos anteriormente. Por otro lado, resulta interesante haber encontrado alteración en la expresión de genes involucrados en otros procesos de diferenciación celular, como Lbx2, Ybx2, Cyr61. Estos resultados nos permiten identificar moléculas río abajo de la señal de MIX-AMPC importantes en el proceso de diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos.

FARMACOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA

279. (53) EL RANELATO DE ESTRONCIO PREVIENE LOS EFECTOS DELETÉREOS DE LOS AGE MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK Y WNT

Fernández, J.; Schurman, L.; Sedlinsky, C.; Molinuevo, M.; Cortizo, A.; Mccarthy, A.

Laboratorio de Investigación en Osteopatía y Metabolismo Mineral, Facultad de Cs. Exactas, U.N.L.P.

Previamente hemos demostrado que el Ranelato de Estroncio (RS, un fármaco anti-osteoporótico) ejerce acciones osteogénicas y revierte efectos deletéreos de los productos de glicación avanzada (AGEs) sobre osteoblastos en cultivo. Empleando inhibidores específicos, pudimos demostrar que estos efectos involucran la apertura de canales de calcio y la activación de quinasas reguladas extracelularmente (Erk). En este trabajo profundizamos el estudio de los mecanismos involucrados: investigamos las acciones de los AGEs y el RS sobre la secreción osteoblástica de citoquinas; sobre la fosforilación de las Erk y su relación con la vía del Wnt; así como también el rol de canales de calcio. Para ello, empleamos osteoblastos en cultivo MC3T3E1, los cuales se incubaron en presencia de 0.1mM de RS; 100ug/ml de AGEs y/o 100ug/ml de albúmina sérica bovina (BSA) como control. La secreción de las citoquinas IL1b y TNFa se determinó por ELISA; la activación de Erk y b-catenina por Western blot. Los AGEs estimularon la producción de IL-1b y de TNFa (ambos 200% del basal, $p < 0.001$); mientras que inhibieron la activación de las Erk y de b-catenina (ambos 65% del basal, $p < 0.01$). Por otro lado, el RS redujo la producción de IL1b y TNFa (ambos 60% del basal, $p < 0.01$); mientras que incrementó la activación de Erk (120% del basal, $p < 0.01$) y b-catenina (125% del basal, $p < 0.01$). Adicionalmente, el RS revirtió los efectos de los AGEs sobre Erk y b-catenina, y sobre la secreción de citoquinas. Todos los efectos investigados del RS pudieron ser inhibidos por co-incubación con 10uM de nifedipina. En conclusión, los AGEs estimulan la producción de citoquinas inflamatorias en osteoblastos en cultivo e inhiben las vías de Erk y Wnt, y el co-tratamiento con RS previene estos efectos de los AGEs sobre osteoblastos en cultivo mediante la apertura de canales de calcio tipo L.

280. (618) REGULACIÓN DE MÚLTIPLES BLANCOS CELULARES POR COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN PLANTAS DE ROSMARINUS OFFICINALIS L.: ACCIONES ANTIBACTERIANAS E INMUNOMODULADORAS

Ojeda Sana, A.¹; Van Baren, C.²; Moreno, S.¹
Fundación Instituto Leloir, I.I.B.B.A -CONICET, CABA.¹
IQUIMEFA (UBA-CONICET)-FfyB-UBA, CABA²

Diversos fitoquímicos modulan el crecimiento de células procariotas y también células del sistema inmunológico en mamíferos, hecho que ha recibido recientemente considerable atención. Las plantas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sintetizan un grupo ubicuo de metabolitos entre ellos monoterpenos y diterpenos fenólicos. En este trabajo se investigó su efecto sobre el crecimiento bacteriano y sus posibles efectos inmunomoduladores. Nuestro objetivo es comprender como las moléculas vegetales modulan múltiples blancos moleculares de acción en células pro y eucariotas. Se testeó la capacidad de los compuestos del romero para inhibir el crecimiento bacteriano solos o en combinación con antibióticos de uso en la clínica por microdilución en medio líquido, sus efectos sobre la viabilidad

celular utilizando el reactivo de MTS y la regulación de fagocitosis en macrófagos RAW 264.7 por microscopía confocal. El ácido carnósico (AC), principal diterpeno de los extractos de romero, dispuso el potencial de membrana en *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* a un cuarto de su concentración inhibitoria mínima (CIM) y potenció aminoglicósidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas. Además, inhibió el crecimiento intracelular de *S. aureus* en macrófagos infectados sin afectar la viabilidad celular luego de 24 horas de tratamiento. Los monoterpenos α -pineno y 1,8-cineol (1,8-C), constituyentes mayoritarios del aceite esencial de romero, inhibieron el crecimiento bacteriano, observando que solo el 1,8-C a la mitad de su CIM permeabilizó la membrana celular de *Escherichia coli*, por el ensayo del SYTOX Green, en un 70%. Por otra parte, el 1,8-C a concentraciones de 0,016 % estimuló la fagocitosis en macrófagos. En conclusión, los metabolitos secundarios bioactivos del romero, solos o en combinación, serían de utilidad para el tratamiento de infecciones bacterianas ejerciendo efectos antimicrobianos y estimulando células del sistema inmune innato del huésped.

281. (213) EFECTO QUIMIOPROFILÁCTICO DE ALBENDAZOLE FORMULADO COMO DISPERSIÓN SÓLIDA SOBRE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Pensel, P.¹⁴; Castro, S.²⁴; Allemandi, D.²⁴; Sánchez Bruni, S.³⁴; Palma Santiago, D.²⁴; Elissondo, M.¹⁴

Lab. Zoonosis Parasitarias Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata; CONICET. E-mail: mceliss@mdp.edu.ar¹ Lab. Farmacotecnia, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. UNITEFA² Lab. Farmacología, Dpto. Fisiopatología, Fac. Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro³ CONICET⁴

Albendazole (ABZ) es el fármaco de elección para el tratamiento de la hidatidosis. Sin embargo, presenta limitaciones en su eficacia debido a la errática biodisponibilidad atribuida a su escasa velocidad de disolución. Una alternativa para mejorar esta propiedad es utilizar dispersiones sólidas (DSs). Éstas son formulaciones donde el fármaco es dispersado homogéneamente en una matriz biológicamente inerte. Estudios *in vivo* han demostrado que el uso de poloxamer 188 (P188), un surfactante polimérico utilizado como matriz en DSs, puede aumentar la velocidad de disolución de ABZ y consecuentemente su disponibilidad plasmática. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia quimioprolifáctica de las DSs ABZ-P188 en ratones experimentalmente infectados con protoescolices de *Echinococcus granulosus*. Ratones CF-1 (n=30) fueron infectados intraperitonealmente con 1500 protoescolices/animal. Un día post-infección los animales fueron separados en 3 grupos (n=10): Grupo control (agua bidestilada); Grupo ABZ suspensión (25 mg/kg) y Grupo ABZ-P188 (25 mg/kg). Los tratamientos se realizaron vía oral durante 30 días cada 24 horas. Cinco meses post-infección, los animales fueron sacrificados registrándose el peso de los quistes. Los pesos se compararon con el test ANOVA + Tuckey ($p < 0.05$). Se tomaron muestras para microscopía electrónica. Todos los ratones de los grupos control y ABZ suspensión desarrollaron quistes, mientras que en uno de los ratones del grupo ABZ-P188 la infección no evolucionó. Se observó diferencia estadísticamente significativa en el peso de los quistes recuperados de los grupos control y tratados. En los ratones tratados con ABZ-P188 se encontró reducción significativa del peso de los quistes comparado con el grupo ABZ suspensión. Además, a nivel ultraestructural produjo mayor daño en la membrana germinativa. El uso de DSs utilizando P188 como carrier aumentó la velocidad de disolución del ABZ, incrementando la eficacia quimioprolifáctica de la droga.

282. (493) EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE GLICACIÓN AVANZADA (AGES) Y DEL RANELATO DE ESTRONCIO (RS) SOBRE LA TRANSDIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.

Fernández, J.; Molinuevo, M.; Sedlinsky, C.; Schurman, L.; Cortizo, A.; Mccarthy, A.

Laboratorio de Investigación en Osteopatía y Metabolismo Mineral, Facultad de Cs. Exactas, U.N.L.P.

La calcificación de la túnica media arterial es un evento prevalente del envejecimiento, así como de patologías como Diabetes mellitus e insuficiencia renal crónica. Las macroangiopatías presentes en estas condiciones pueden deberse a la acumulación tisular existente de AGEs. Se ha demostrado que los AGEs incrementan la transdiferenciación de miocitos arteriales hacia un fenotipo osteoblástico; un efecto que es contrario a la inhibición de la maduración osteoblástica que hemos descrito previamente. En este trabajo se evaluó el efecto del fármaco anti-osteoporótico RS, así como de los AGEs, sobre la proliferación, migración y transdiferenciación osteogénica de células de músculo liso vascular (miocitos), aislados de anillos de la túnica media de aorta de ratas Sprague-Dawley machos jóvenes. Los miocitos se incubaron en un medio de cultivo con 0,1mM RS, 100ug/ml albúmina sérica bovina (BSA) y/o 100ug/ml AGEs-BSA. La proliferación celular se midió con cristal violeta, y la migración mediante una lesión inducida sobre la monocapa celular en cultivo. La transdiferenciación se determinó luego de 7 días de cultivo en un medio osteogénico, midiendo: actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FAL), colágeno tipo 1 (Col1, con Sirius red) y depósito de mineral extracelular (Min, con rojo de alizarina). AGEs y RS estimularon la migración celular (110 y 120% vs BSA, $p < 0.05$, respectivamente), así como la proliferación celular después de 48h ($p < 0.05$ vs BSA). Luego del cultivo en el medio osteogénico, tanto AGEs como RS incrementaron la FAL (150 y 138 % vs BSA, $p < 0.01$, respectivamente), el Col1 (152 y 148% vs BSA, $p < 0.01$, respectivamente) y la Min (121 y 159% vs BSA, $p < 0.01$, respectivamente). Cuando RS se coincubó con AGEs, mostró una tendencia a potenciar los efectos de los AGEs. En conclusión, RS y AGEs estimulan significativamente la proliferación y migración de miocitos, así como su transdiferenciación in vitro hacia un fenotipo osteoblástico.

283. (815) ACCIÓN ESTABILIZADORA DE HIDROXITIRO-SOL Y OLEUROPEINA SOBRE LA ACTIVACIÓN DE MASTOCITOS EN UN MODELO IN VIVO DE INFLAMACIÓN Y LESIÓN GASTROINTESTINAL

Persia, A.; Mariani, M.; Aguilera, C.; Penissi, A.
Instituto de Histología y Embriología Mendoza. "Dr. Mario H. Burgos" IHEM. Facultad de Ciencias Médicas U.N. Cuyo-CONICET

Los mastocitos (Mc), células del sistema inmune, participan en procesos fisiológicos como la defensa de la mucosa del tracto gastrointestinal y patológicos como el desarrollo de úlceras pépticas. En trabajos previos hemos demostrado una acción inhibitoria de polifenoles del aceite de oliva en la activación de Mc. Considerando estos antecedentes, la hipótesis del presente trabajo plantea que los polifenoles, hidroxitiroso (HT) y oleuropeína (Olp), inhiben el desarrollo de úlceras gástricas inducidas por activación de Mc. Metodología: administración oral (O) a las 9:00 y 18:30 e intraperitoneal (IP) a las 9:30. Grupos: 1) Control (C) negativo (-): solución fisiológica (SF)(O) y SF (IP); 2) C positivo (+): SF(O), compuesto 48/80 (48/80; activador experimental de Mc.) (IP); 3) HT:HT [12mg/ml](O), SF (IP); 4) Olp: Olp [12mg/ml] (O), SF (IP); 5) HT+48/80: HT [12 ó 6 ó 3mg/ml] (O), 48/80 (IP); 6) Olp+48/80: Olp [12 ó 6 ó 3mg/ml](O), 48/80 (IP), 7) Cromoglicato de sodio (Cgto):Cgto [12mg/ml](O), SF (IP); 8) Cgto+48/80: Cgto [12mg/ml](O), 48/80 (IP). Se administró 0,225 µg de 48/80. Los animales fueron sacrificados y en los estómagos extraídos se calculó el índice ulcerogénico (IU) (escala de Marazzi-Uberti y Turba) y se realizó estudio histológico. Resultados: En grupo C- no se observó daño en mucosa gástrica (MG) (IU=0±0) comparado con el C+, donde se evidenció daño y presencia de úlcera en MG (IU=4,5±0,3). En HT+48/80 [12 y 6 mg/ml] (IU=0,5±0,3) se observó leve irritación en MG igual que Olp+48/80 [12mg/ml] (IU=0,5±0,3) y [6 mg/ml] (IU=0,75±0,2) y Cgto+48/80 [12mg/ml] mostrando una protección de la MG comparado con C+, HT+48/80 y Olp+48/80 [3 mg/ml] donde no se observó protección gástrica. En HT, Olp y Cgto no se observó irritación gástrica ($P \leq 0,05$). Los datos del análisis

histológico de los cortes se correspondieron con el análisis de los estómagos en fresco. Conclusiones: HT y Olp previenen la formación de úlceras gástricas inducidas por activación de mastocitos.

284. (135) LAS HISTONAS NUEVOS AGONISTAS DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

Carestia, A.¹; Rivadeneyra, L.¹; Romaniuk, M.¹; Fondevila, C.²; Schattner, M.¹

Laboratorio de Trombosis Experimental-Instituto de Medicina Experimental-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Servicio de Hematología. Clínica Bazterrica, Bs.As. Argentina.²

Las trampas extracelulares de DNA (NETs) son un nuevo mecanismo bactericida de los neutrófilos. Las histonas presentes en las NETs promueven la agregación plaquetaria y la generación de trombina dependiente de plaquetas destacando a estas moléculas como las responsables de la actividad protrombótica de las NETs. Como la activación plaquetaria mediada por histonas no está completamente dilucidada, exploramos la capacidad de las histonas recombinantes H1, H2A, H3 y H4 de inducir respuestas de activación plaquetaria. Encontramos que tres histonas promueven la adhesión (10 µg/ml, H2A:2±0.7; H3:16±3; H4:43±6 n° de células por campo n=3) y el spreading (microscopía), la unión del fibrinógeno (H1:74±24 H2A:150±35; H3:332±50; H4:510±57 intensidad media de fluorescencia (IMF), citometría n=5), la expresión de P-selectina (H1:18±6; H2A:26±9; H3:76±24; H4:123±46 IMF, n=5), la formación de agregados mixtos plaqueta-leucocito (H1:22±10; H2A:37±13; H3:135±69; H4:215±81, IMF n=5) y la liberación de FvW (H1:28.7±1; H2A:118±33; H3:144±35; H4:180±22 ng/ml n=3 ELISA). Sin embargo, la EC₅₀ de H1 y H2A (100±2 µg/ml) fue un orden mayor que la de H3 y H4 (10±1 µg/ml) en todas las respuestas plaquetarias. La expresión de P-selectina fue significativamente inhibida por dos bloqueantes específicos de NFκB (Ro 106-9920 y BAY 117082), de ERK (U 0126), de PI3K/AKT (Ly 294002), de P38 (SB 203580) y de PKC (Gö 6983). La preincubación de plaquetas con aspirina o dexametasona no modificó los niveles de P-selectina (n=5). En concordancia con los ensayos farmacológicos, los estudios de Western blot mostraron que las cuatro histonas inducen la fosforilación de NFκB, ERK, AKT y P38. Nuestros datos demuestran que las histonas son potentes agonistas de las respuestas hemostáticas y proinflamatorias de las plaquetas y señalan que la activación de las quinasas ERK, PI3/AKT, P38 y PKC junto con NFκB son las vías de señalización involucradas en la expresión de P-selectina mediada por las histonas.

285. (254) LA ACCIÓN CONJUNTA DE P38 Y NFκB INDUCE RESPUESTAS PRO-INFLAMATORIAS PLAQUETARIAS EN CONDICIONES DE ACIDOSIS

Etulain, J.¹; Carestia, A.¹; Rivadeneyra, L.¹; Fondevila, C.²; Schattner, M.¹

Lab. Trombosis Experimental. IMEX-CONICET. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires¹ Servicio de Hematología. Clínica Bazterrica. Argentina.²

La acidosis extracelular es una característica del microambiente inflamatorio. Nuestros estudios previos mostraron que el descenso del pH apaga las funciones hemostáticas de las plaquetas (PL) y promueve las respuestas inflamatorias mediadas por la expresión de P-selectina en la superficie plaquetaria. En este trabajo estudiamos las vías de señalización involucradas en las respuestas inflamatorias mediadas por PL en acidosis: expresión de P-sel, formación de agregados PL-leucocitos polimorfonucleares (PMN) (citometría) y migración de PMN (cámara de Boyden). Se utilizaron PL humanas lavadas estimuladas con trombina (0.05U/ml) a pH 7.4, 7.0 y 6.5 (n=3, $P < 0.05$ *vs pH 7.4, *vs sin inhibidor, resultados expresados a pH 7.4, 7.0 y 6.5 respectivamente). Mientras la fosforilación de algunas moléculas involucradas en la activación plaquetaria (ERK, Akt, Src) fue significativamente inhibida a menor pH, la de p38 no se modificó y la activación de NFκB aumentó con el descenso del pH (Western blot). El incremento en la expresión de P-sel observado en acidosis (36±3, 51±2*, 50±3* % cel +) se mantuvo en presencia

de inhibidores de ERK (U0126), PI3K/Akt (LY294002), Src (PP1), SB203580 (p38) y Ro1069920 (NFκB) individualmente. Sin embargo, este parámetro disminuyó significativamente con la presencia simultánea de SB203580 + Ro1069920 ($25 \pm 2^{\#}$, $25 \pm 2^{\#}$, $27 \pm 2^{\#}$ % cel +). La formación de agregados PL-PMN (25 ± 5 , $49 \pm 3^*$, $45 \pm 5^*$ % cel +) y la migración de PMN en presencia de PL (112 ± 5 , $145 \pm 4^*$, $140 \pm 7^*$ # PMN migrados) aumentó en acidosis, y ambos fenómenos se revirtieron por la presencia conjunta pero no individual de SB203580 y Ro1069920 (23 ± 6 , $22 \pm 4^{\#}$, $23 \pm 3^{\#}$ % cel +; 111 ± 3 , $105 \pm 5^{\#}$, $105 \pm 4^{\#}$ # PMN migrados). En conjunto, estos resultados indican que las respuestas proinflamatorias mediadas por PL en condiciones de acidosis requieren la activación simultánea de p38 y NFκB y plantean la posibilidad de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la inflamación.

286. (282) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ANGIOGÉNESIS MEDIADA POR PLAQUETAS

Etulain, J.¹; Negrotto, S.¹; Fondevila, C.²; Schattner, M.¹
Lab. Trombosis Experimental. IMEX-CONICET. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires¹ Servicio de Hematología. Clínica Bazterrica, Argentina.²

Las plaquetas (PL), además de ser elementos claves en la hemostasia y la trombosis, también inducen angiogénesis a través de la liberación de factores proangiogénicos. Considerando que este fenómeno no sólo es relevante en procesos fisiológicos sino también en la patogénesis de diversas enfermedades, estudiamos los mecanismos moleculares que regulan la angiogénesis mediada por PL. Se evaluó la proliferación de células endoteliales (MTT) y formación de estructuras tubulares (matrigel) inducida por sobrenadantes (Sn) de PL humanas lavadas estimuladas o no con trombina (0.05U/ml), en presencia o ausencia de inhibidores de las principales vías de señalización involucradas en la activación plaquetaria ($n=5$, $*p<0.05$). A diferencia de las PL no activadas, los Sn de PL estimuladas indujeron la formación de túbulos y aumentaron 2.3±3 veces la proliferación endotelial. Mientras la preincubación de PL con aspirina (ASA, inhibidor de ciclooxigenasa) disminuyó un 96±4% la proliferación, bloqueantes de PKC, p38, ERK, Src y PI3K/Akt inhibieron 60±6*, 63±4*, 60±5*, 33±7* y 15±9% respectivamente (resultados similares se obtuvieron en la formación de túbulos). Si bien el VEGF es considerada la principal molécula angiogénica plaquetaria, su secreción no fue afectada por ASA (3±3%) (ELISA). Más aún, el bloqueo del receptor de VEGF por anticuerpo inhibió sólo moderadamente la angiogénesis inducida por PL. Considerando que las PL contienen otras sustancias angiogénicas, mediante un *array* se demostró que ASA inhibió significativamente la secreción de IL1β, 2, 6 y 8, angiopoyetina 1 y 2, G-CSF, GM-CSF, TNFα, IGF1, EGF y ENA78, sugiriendo la relevancia de estas moléculas en la angiogénesis. En conclusión, los datos obtenidos señalan que la formación de nuevos vasos inducida por PL activadas es mediada por la acción conjunta de factores angiogénicos e independiente de VEGF, y nos permiten postular que la ciclooxigenasa plaquetaria es el principal modulador de este proceso.

287. (490) EXPRESIÓN PULMONAR Y HEPÁTICA DEL TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES (DMT1) Y DE FERRITINA EN UN MODELO ANIMAL DE ANEMIA POR FLEBOTOMÍA CRÓNICA CON Y SIN ESPLENECTOMÍA.

Giorgi, G. ; Roque, M.
Universidad Nacional del Sur

La distribución celular de DMT1 (importador de Fe) y de Ferritina (reserva de Fe) en tejidos clásicamente asociados al metabolismo del Fe, reflejan el rol de estas proteínas cuando se modifican las necesidades del micronutriente. Actualmente no existen evidencias claras de la expresión de DMT1 y Ferritina en pulmón y en hígado en anemia crónica sin bazo. Objetivo: estudiar en pulmón la expresión celular de DMT1 y de Ferritina relacionándolas con el hígado en flebotomía crónica con y sin bazo. Ratonos CF1 ($n=8$ /grupo) (diseño en

bloques) grupos: **1) esplenectomía+flebotomía; 2) esplenectomía sin flebotomía; 3) Sin esplenectomía+flebotomía; 4) Control: sin esplenectomía, sin flebotomía.** Flebotomía: extracción sanguínea del seno retroorbital/cada 3 días/32 días. Día 32: Hb (g/dl); Fe hepático (μmol/g). ANOVA $p<0.05$. Inmunohistoquímica: hígado/pulmón, anti-DMT1/anti-Ferritina. La Hb disminuyó en flebotomía sin bazo (8.8 ± 0.7) y con bazo (10.3 ± 0.3) respecto al control (15.2 ± 0.5). En el epitelio bronquio-alveolar y en macrófagos pulmonares DMT1 se expresó intracelular en esplenectomía y en el control. En flebotomía con y sin bazo, DMT1 se localizó apical en el epitelio bronquial e intracelular en alveolos y macrófagos. Ferritina se expresó en el epitelio bronquial y en macrófagos pulmonares en las cuatro condiciones, siendo mas evidente en macrófagos en flebotomía sin bazo. El Fe hepático disminuyó en flebotomía con bazo (4.0 ± 1.1) y no varió en flebotomía sin bazo (7.5 ± 1.5) respecto al control (9.7 ± 0.3). En hepatocitos la expresión de DMT1 y de Ferritina fue leve en flebotomía con bazo, siendo marcada en flebotomía sin bazo. La redistribución de DMT1 en células bronquiales en anemia crónica, evidencia su rol en la captación de Fe. En anemia crónica, con y sin bazo, la expresión diferencial de DMT1 y Ferritina hepática mostraría al hígado como principal órgano proveedor y de reserva de Fe. El modelo reflejó la movilidad intracelular del Fe pulmonar en anemia crónica por flebotomía.

MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR 2

288. (61) LA ACIDOSIS EXTRACELULAR INHIBE LAS RESPUESTAS PROANGIOGÉNICAS DE LOS PROGENITORES ENDOTELIALES

Negrotto, S.¹; Fondevila, C.¹; Boisson-Vidal, C.²; Schattner, M.¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ INSERM U765, Paris, Francia²

Previamente demostramos que el medio extracelular ácido induce apoptosis de progenitores hematopoyéticos (células CD34*). Teniendo en cuenta que los progenitores endoteliales (PE) constituyen una subpoblación dentro de las células CD34* y también son movilizados desde la médula ósea al sitio de injuria/isquemia participando en la regeneración/revascularización tisular, en el presente trabajo estudiamos el efecto del pH ácido en la biología de los PE. Las distintas funciones proangiogénicas fueron evaluadas *in vitro* en un medio suplementado con suero fetal bovino y un coctel de citoquinas que incluyó VEGF1, SDF1 y FGFb. Para evaluar el efecto de la acidosis, el pH del medio (normal 7.4) fue ajustado con una solución isotónica de HCl a valores de 7.0 y 6.6 ($n=3-5$, $*P<0.05$, ANOVA). Si bien la sobrevivencia de los PEs no fue afectada por el pH, la exposición por 24 horas al medio ácido inhibió la proliferación (18 y 26% de inhibición a pH 7 y 6.6 respectivamente, pNPP), migración (55* y 61%, cámara de Boyden), reparación de heridas (9 y 69%, daño mecánico de la monocapa) y formación de túbulos (58* y 77%, Matrigel). Además, evaluamos la capacidad de regeneración tisular en un modelo *in vivo* de isquemia de miembro inferior inducida por la ligadura de la arteria femoral de ratones *nude*. Para ello, los PE previamente incubados durante 24 horas a pH 7.4 o 6.5 fueron trasplantados por vía intravenosa 5 horas post cirugía. Luego de 7 días, el porcentaje de recuperación del flujo sanguíneo en el área isquémica fue analizado (Doppler). Mientras que en ratones no trasplantados la recuperación fue de un 49%, en aquellos que recibieron PE cultivados a pH 7.4 la recuperación fue del 78%. Sin embargo, cuando los PE fueron cultivados a pH 6.6, la recuperación fue similar a los animales no trasplantados (48%, $n=4$ por grupo). Nuestros resultados indican que el medio extracelular ácido inhibe las respuestas proangiogénicas *in vitro* y la capacidad regenerativa *in vivo* de los PE.

289. (171) EFECTOS DE LA HIPOXIA EN LA GENERACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS HUMANAS

Questa, M.^{1,2}; Solari, C.²; Losino, N.²; Romorini, L.¹; Bluggermann, C.¹; Fernández Espinosa, D.¹; Videla Richardson, G.¹; Sevelever, G.¹; Guberman, A.²; Miriuka, S.¹
Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular - FLENI¹ Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre, Depto. de QB, FCEN, UBA; IQUIBICEN, UBA-CONICET²

Las células somáticas humanas pueden ser reprogramadas a Células Madre Pluripotentes Inducidas (CMPi), las cuales pueden, a su vez, diferenciarse a cualquier célula adulta. Esta característica es de gran interés en medicina regenerativa y en el estudio *in vitro* de enfermedades genéticas. Para su validez se requieren ciertos criterios como morfología de células pluripotentes, auto-renovación ilimitada, expresión de marcadores de pluripotencia, *downregulación* de marcadores de diferenciación, independencia de los factores utilizados para su reprogramación y conformidad con pruebas de diferenciación. Los objetivos del presente trabajo fueron la reprogramación de fibroblastos humanos a CMPi bajo condiciones de normoxia e hipoxia a fin de comparar eficiencias, caracterizar las líneas obtenidas y analizar su identidad pluripotente en las distintas condiciones. La reprogramación se realizó introduciendo Factores de Transcripción embrionarios mediante un sistema lentiviral. Se establecieron las líneas de CMPi y se las validó, confirmando características morfológicas y proliferativas de células pluripotentes, alta expresión de marcadores de pluripotencia, capacidad de diferenciación a las tres capas germinales y formación de teratomas, confirmando pluripotencia *in vitro* e *in vivo*. Se comparó la eficiencia de su generación en hipoxia y normoxia y se evaluó la expresión de marcadores de pluripotencia y blancos de hipoxia en cultivo crónico o agudo al 5% de O₂. Se encontró que la generación de CMPi en hipoxia es menos eficiente que en normoxia, pero no se encontraron diferencias de pluripotencia entre las líneas generadas en normoxia y en hipoxia crónica. En cambio, se encontraron diferencias en la expresión de marcadores de pluripotencia durante el cultivo hipóxico agudo, en contraste con normoxia. En conclusión, la expresión de marcadores de pluripotencia no se ve aumentada al cultivar CMPi en hipoxia crónica, pero podría estarlo en hipoxia aguda.

290. (173) BIOCOMPATIBILIDAD DE MATRICES BASADAS EN POLIMEROS TAUTOMERICOS PARA REGENERACION DE TEJIDO OSEO

Lastra, M.¹; Molinuevo, M.¹; Giussi, J.²; Cortizo, M.²
Laboratorio de investigaciones en osteopatías y metabolismo mineral¹ INIFTA, Fac. de Cs Exactas, UNLP²

La ingeniería de tejido es un área de investigación interdisciplinaria que involucra tanto la ciencia de los biomateriales como el conocimiento de sistemas celulares. Previamente hemos desarrollado matrices basadas en polímeros que favorecen el crecimiento celular, demostrando que el balance de las propiedades hidrofóbicas/hidrofílicas es un requisito importante para estas aplicaciones. En este trabajo estudiamos la biocompatibilidad de matrices derivadas de un polímero sintético (estirenico) que posee grupos funcionales factible de tautomerizar (ceto-enol), según el medio en el que se encuentre y por lo tanto su polaridad cambiará acorde al mismo. Los estudios de biocompatibilidad han sido realizados sobre películas (M) obtenidas por el método de *casting*. Par ello el copolímero estirenico tautomerico se disolvió en cloroformo (5% p/v) y la solución se volcó en un molde de teflón. Se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente y finalmente en tambor de vacío hasta peso constante. Asimismo se determinaron las propiedades mecánicas: máxima resistencia a la tracción (49±6 MPa), modulo elástico (1700±200 MPa) y elongación al quiebre (8.9±0.05 %). Tanto el modulo elástico como la resistencia tensil de las películas están en el rango intermedio entre el del hueso cortical y el trabecular. La biocompatibilidad se estudió evaluando la adhesión celular (número de células / campo), la proliferación (nro de células / campo), la diferenciación osteoblástica (actividad de fosfatasa alcalina, FAL, nmol pNP/min/mg proteína) y colágeno tipo 1 (col1, ug/ml); como control se emplearon platos de cultivo celular (C). Encontramos que las células se adhieren (M 12±1; C 16±1) y proliferan (M 16±1; C 21±2) en forma similar al control.

La diferenciación osteogénica fue comparable respecto al control (FAL: M 10±2, C 12±1; Col1: M 17±2, C 18±1). En conjunto nuestros resultados preliminares indican que este material sería factible de aplicarse en la reparación de lesiones óseas.

291. (264) ESTUDIO DE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES HUMANAS AL HEPATOCARCINOMA DESARROLLADO EN UN MODELO ANIMAL DE FIBROSIS AVANZADA.

Bayo Fina, J.¹; Fiore, E.¹; Marrodan, M.¹; Sganga, L.²; Bolontrade, M.²; Malvicini, M.¹; Rizzo, M.¹; Piccioni, F.¹; Atorrasagasti, C.¹; Aquino, J.¹; Alaniz, L.¹; Andriani, O.³; Podhajcer, O.²; García, M.¹; Mazzolini, G.¹
Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Medicina, Universidad Austral.¹ Laboratorio de Terapia Molecular y Celular, Fundación Instituto Leloir.² Unidad de Hígado, Facultad de Medicina, Universidad Austral.³

El hepatocarcinoma (HCC) constituye entre el 85-90% de los tumores primarios de hígado. En nuestro país se estima que la incidencia es cercana a 5/100.000 habitantes, aunque se encuentra en aumento. El proceso de hepatocarcinogénesis involucra un intercambio de señales entre el tumor y su microambiente compuesto por diversos tipos celulares incluyendo las células estrelladas hepáticas. En particular, los factores solubles que median estas señales han sido descritos en la migración de las células mesenquimales del estroma (hMSC) hacia sitios de injuria y remodelamiento tisular. El objetivo de este trabajo es estudiar la capacidad migratoria *in vivo* de las hMSC de medula ósea hacia el HCC. Ensayos de migración *in vitro* en cámara de Boyden mostraron que las hMSC presentan una elevada capacidad de migrar hacia medios condicionados (MC) generados a partir de tumores de pacientes con HCC o generados en ratones nude BALB/c mediante la inoculación con células de HCC humano de un cultivo primario o de la línea celular HuH7. Para evaluar la migración *in vivo*, se inocularon de manera subcutánea u ortotópica células HuH7 en ratones nude BALB/c. Con el tumor establecido se administraron las hMSC y se monitorizó la biodistribución en un bioluminómetro. Las hMSC, tanto en animales sanos como en animales portadores de tumor se localizaron en pulmón 1 hora después de la administración, para luego localizar también en el bazo, hígado y tumor a días 3 y 7. No obstante, los animales con HCC ortotópico mostraron un mayor reclutamiento de las hMSC tanto en el hígado como en el propio tumor, lo cual fue confirmado mediante análisis por microscopía de fluorescencia. Los resultados sugieren que los factores expresados en el microambiente tumoral del HCC son capaces de inducir los mecanismos necesarios para reclutar a las hMSC, lo cual permitiría utilizarlas como vehículos celulares de genes antitumorales.

292. (413) INMOVILIZACIÓN DE FRAGMENTOS DE PTHRP A MATRICES HÍBRIDAS BIOACTIVAS

Mortarino, P.²; Lozano, D.³; Rocha Oliveira, A.⁴; Portal-Núñez, S.³; Pereira, M.⁴; Esbrit, P.³; Feldman, S.²
Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Rosario¹ LABOATEM Lab Biología Osteoarticular, Ing Tisular y Terapias Emergentes, Fac Cs Medicas UNR.² Lab de Metabolismo Mineral y Óseo, IIS-FJD, Instituto de Salud Carlos III-RETICEF, Madrid, España.³ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.⁴

Se investigó si la inmovilización de PTHrp1-37 y osteostatina en Matrices Híbridas de Poly-vinyl alcohol/vidrio bioactivo (MH) promovía efectos osteogénicos *in vitro* en cultivo de células osteoblásticas MC3T3-E, como potencial herramienta de reparación tisular frente a lesiones óseas. El proceso de inmovilización se llevó a cabo en buffer salino (PBS), a pH 7.4, con una concentración de cada péptido 100 nM, 24hs. Se determinó la capacidad de MH para retener cada péptido: la liberación de los mismos fue medida utilizando radio trazador y por espectrofotometría a 280 nm. El cultivo celular se realizó en α -MEM con 10% FBS, 50 μ g/ml ácido ascórbico y 10 mM β -glicerolfosfato, con o sin (control basal) los materiales testeados, conteniendo o no los péptidos.

Se determinó proliferación y viabilidad (medida por un ensayo de AlamarBlue), la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) y la mineralización de la matriz (rojo de alizarina). Resultados: El mayor porcentaje de carga de osteostatina y PTHrP 1-37 por el material fue del 15% y 30%, equivalentes a 0.2 µg y 0.1 µg péptido/g MH, respectivamente, después de 24 hs de carga. Las matrices liberaron 80% del péptido cargado hacia el medio en 1 h, y virtualmente el 100% a las 48 hs, para ambos péptidos. Las matrices con osteostatina incrementaron la proliferación y la viabilidad celular en un 75% y la actividad de la FAL en un 15% respecto a los controles al día 4, y la mineralización de la matriz aumento un 30% al día 10, respecto de los respectivos controles. Similares resultados se obtuvieron para PTHrP 1-37 ($p < 0.01$). Estos resultados indican que tanto la osteostatina como la PTHrP 1-37 inmovilizadas en MH ejercen efectos osteogénicos similares en células osteoblásticas. Nuestros hallazgos muestran que ambos péptidos poseen efectos osteogénicos y que no se ven afectados en su accionar biológico por el proceso de inmovilización a MH, avances que podrían considerarse en futuros estudios de regeneración ósea.

- 293. (434) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL SISTEMA DE DEFENSA FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS**
Solari, C.¹; Luzzani, C.¹; Waisman, A.¹; Losino, N.¹; Romorini, L.²; Miriuka, S.²; Barañao, L.¹; Guberman, A.¹
Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre, Depto. de QB, FCEN, UBA; IQUIBICEN, UBA-CONICET¹ Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLEN²

Las células madre (CM) embrionarias (CME) y las CM pluripotentes inducidas (CMPi) poseen un conjunto de mecanismos que aseguran la estabilidad genómica, evitando la propagación de daños genéticos. Uno de éstos involucra un complejo sistema de defensa contra el estrés oxidativo, compuesto por una serie de proteínas que actúan de manera coordinada manteniendo bajos niveles de especies reactivas de oxígeno. Se sabe que la actividad antioxidante disminuye a lo largo de la diferenciación. Sin embargo, no se conocen los mecanismos de regulación de la expresión de muchos de los genes involucrados. Nuestra hipótesis es que algunos de ellos serían regulados por los factores de transcripción (FT) propios de CM pluripotentes, Oct4, Sox2 y Nanog. En este trabajo seleccionamos genes del sistema de defensa ante el estrés oxidativo y analizamos *in silico* sus regiones promotoras en busca de secuencias consenso de unión de dichos FT. Mediante RT-PCR en tiempo real, estudiamos el perfil de expresión de los genes elegidos, en CME y en CMPi, tanto en estado indiferenciado como durante la diferenciación. Encontramos que el perfil de expresión coincide en muchos casos al comparar CME de ratón y humanas y, notablemente, en CME de ratón con CMPi de la misma especie. A partir de estos resultados seleccionamos un subgrupo de genes de acuerdo a su modulación. Actualmente, nos encontramos estudiando el efecto de la sobreexpresión de estos FT sobre los genes endógenos en sistemas heterólogos y la interacción de los mismos con los promotores de los genes seleccionados mediante ChIP. El estudio de esta regulación contribuirá a la comprensión de los mecanismos que poseen las CM para mantener la integridad de su genoma. Entendemos que estos conocimientos nos acercarán a la posibilidad de disponer en un futuro de terapias basadas en estas células, lo cual depende en gran medida de su habilidad para mantener el genoma intacto y de poder dirigir su diferenciación a los tipos celulares requeridos.

- 294. (656) MIGRACIÓN Y EFECTO TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES SOBRE LA FIBROSIS HEPÁTICA.**
Fiore, E.¹; Bayo Fina, J.¹; García, M.¹; Malvicini, M.¹; Lloyd, R.¹; Peixoto, E.¹; Solá, M.¹; Marrodan, M.¹; Piccioni, F.¹; Atorrasagasti, C.¹; Alaniz, M.¹; Bolontrade, M.²; Podhajcer, O.²; Aquino, J.¹; Mazzolini, G.¹
Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Cs. Biomédicas, Universidad Austral¹ Laboratorio de Terapia Mole-

cular y Celular, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina.²

La cirrosis es la primera causa de trasplante hepático en la Argentina, siendo éste su único tratamiento eficaz. Las células mesenquimales estromales (MSCs) tienen capacidad de migrar a sitios de lesión e injuria lo que las transforma en buenas candidatas para su aplicación en terapias celulares con fines regenerativos. El objetivo de este trabajo fue analizar la migración y/o el efecto terapéutico de MSCs de médula ósea y de células perivasculares de cordón umbilical humano (HUCPVCs) en modelos *in vitro* (cultivo de células estrelladas hepáticas) e *in vivo* (por aplicación crónica de tioacetamida) de fibrosis hepática. Para esto, se obtuvieron cultivos de diversos tipos de MSCs de origen humano y de MSCs de médula ósea provenientes de distintas cepas murinas. Los cultivos celulares presentaron las características fenotípicas y de multipotencialidad propias de estas células. Se observó que las MSCs utilizadas migraron muy significativamente hacia medios condicionados generados a partir de células estrelladas hepáticas activadas (línea celular humana, LX2) o de muestras de hígados de pacientes cirróticos. *In vivo*, mediante bioluminómetro se constató una mayor migración de las MSCs hacia el hígado en modelos de fibrosis hepática en comparación con controles sanos, encontrándose un pico en el reclutamiento hacia el hígado a los 3 días post-infusión. En los distintos experimentos, las MSCs fueron aplicadas por vía intravenosa o intraesplénica. Por último, al evaluar el efecto terapéutico *in vivo* de las MSCs de distinto origen, mediante tinción de cortes histológicos con rojo sirio y análisis morfométrico, se pudo comprobar en todos los casos una mejora en el grado de la fibrosis hepática desarrollada. Nuestros resultados nos permiten concluir que las MSCs se reclutan eficientemente en el hígado fibrótico donde ejercerían un efecto anti-fibrogénico, el cual podría ser superior si se utilizaran estas células como vehículo de genes terapéuticos antifibróticos.

ONCOLOGÍA 4

- 295. (41) TERAPIA DE CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE METÁSTASIS EN PULMÓN EN RATAS BDIX: ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN DE COMPUESTOS BORADOS**
Trivillin, V.^{1,2}; Garabalino, M.¹; Colombo, L.^{2,3}; Monti Hughes, A.¹; Pozzi, E.¹; Bortolussi, S.⁴; Altieri, S.⁴; Itoiz, M.^{1,5}; Aromando, R.^{1,5}; Nigg, D.⁶; Schwint, A.^{1,2}
Comisión Nacional de Energía Atómica¹ CONICET, Argentina² Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Argentina³ Dipart. Fisica Nucleare e Teorica, Univ. Pavia y 1^a Cát. Anatomía Patológ., Facult de Odont, UBA⁵ Idaho National Laboratory, EE.UU⁶

La Terapia de Captura Neutrónica en Boro (BNCT) se basa en la incorporación preferencial de compuestos borados a tumor y la irradiación con neutrones. Se propuso BNCT para el tratamiento de tumores difusos no resecables en pulmón. Buscando optimizar la eficacia de BNCT, el objetivo del presente estudio fue realizar estudios de biodistribución con nuevos protocolos empleando los compuestos borados borofenilalanina (BPA) y/o decahidrodecabato de sodio (GB-10), en un modelo experimental de metástasis pulmonares. Se inyectaron 3 a 6 x 10⁶/0.5 ml de células de carcinoma de colon (DHD/K12/TRb) *iv*, en ratas singéneas BDIX. Tres a 5 semanas post inoculación de las células, se evaluaron 5 protocolos de administración de compuestos borados en 3-5 ratas por grupo: 1. **BPA**, 18 mg de B/kg, *iv*, 2. **BPA**, 46,5 mg B/kg, *ip*; 3. **GB-10**, 50 mg de B/kg, *iv*, 4. **BPA**, 46,5 mg de B/kg, *ip* + **GB-10**, 20 mg de B/kg, *iv*, 5. **BPA**, 31 mg B/kg, *ip* + **GB-10**, 34,5 mg B/kg, *iv*. Tres horas después de la administración de los compuestos borados, se tomaron muestras de sangre, metástasis pulmonares, pulmón, y tejidos sanos de relevancia clínica para medición de boro. No se observaron efectos tóxicos con ninguno de los protocolos evaluados. Los 6 protocolos mostraron una relación de concentración de boro en tumor/pulmón sano ≥ 1 (1,2/1 a 1,9/1). La concentración media de boro en tumor para los protocolos 2,

4 y 5 osciló entre 23 y 76 ppm mientras que para los protocolos 1 y 3 fue ≤ 13 . Previamente determinamos que un protocolo de administración de compuestos borado/s tiene potencial terapéutico para BNCT si la concentración de boro en tumor/tejido normal ≥ 1 y la concentración media de boro en tumor es ≥ 20 ppm. Los protocolos 2, 4 y 5 son potencialmente útiles para estudios de BNCT *in vivo*. Los protocolos 4 y 5 que se basan en la combinación de compuestos borados contribuirían a la distribución homogénea de boro en tumor, aumentando la eficacia terapéutica de BNCT.

296. (156) LOS COCIENTES VEGF/SVEGFR-2 Y VEGF/TSP-1 PODRÍAN PREDECIR LA RESPUESTA A LA QUIMIO-TERAPIA METRONÓMICA CON CICLOFOSFAMIDA Y CELECOXIB EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA AVANZADO

Perroud, H.¹; Alasino, C.²; Rico, M.¹; Queralt, F.²; Pezzotto, S.³; Rozados, V.¹; Scharovsky, G.¹

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario¹ Instituto de Oncología de Rosario, Rosario² Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario³

La quimioterapia metronómica (QTM) con ciclofosfamida (Cy) 50 mg/día y celecoxib (Cel) 400 mg/día, vía oral, posee baja toxicidad y eficacia terapéutica en pacientes con cáncer de mama avanzado (PCMA). Hasta el momento no se han encontrado marcadores predictores de respuesta. Nuestro objetivo fue analizar y evaluar el rol predictor de respuesta de varios parámetros pro y anti angiogénicos en PCMA tratados con QTM con Cy+Cel (Protocolo aprobado por ANMAT). Se determinaron por ELISA las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la fracción C (VEGF-C), los receptores solubles 2 y 3 de VEGF (sVEGFR-2, sVEGFR-3) y de trombospondina-1 (TSP-1). Las muestras se tomaron al inicio y a lo largo del tratamiento. Se incluyeron 13 pacientes cuyo tiempo de permanencia varió de 4 a 64 semanas (mediana=13). Se observó enfermedad estable (EE) en 9/13 pacientes que duró de 12 a 64 semanas (mediana=18) y respuesta parcial (RP) en 1/13. La concentración de VEGF disminuyó en función del tiempo ($P=0,004$). Durante la respuesta, sVEGFR-2 aumentó ($P=0,0268$) y VEGF-C, sVEGFR-3 y TSP-1 no mostraron variaciones significativas. Los valores basales de VEGF y de los cocientes VEGF/sVEGFR-2 y VEGF/TSP-1 se correlacionaron significativamente con la duración de la respuesta ($P=0,029$, $P=0,015$, $P=0,014$, respectivamente). Se evaluó cuál de los valores basales era mejor predictor, siendo VEGF/sVEGFR-2 y VEGF/TSP-1 buenos predictores ($P=0,028$ y $P=0,029$, respectivamente), a diferencia de VEGF ($P=0,059$). Al considerar las tres variables en conjunto, la bondad de la predicción no se vio mejorada. Concluimos que los valores basales de los cocientes VEGF/sVEGFR-2, VEGF/TSP-1 podrían ser utilizados para estimar a priori la respuesta al tratamiento metronómico, lo que permitiría tratar solo pacientes con una expectativa razonable de respuesta al mismo. Los resultados deben confirmarse con un mayor número de pacientes.

297. (194) LA ACIL-COA SINTETASA-4 REGULA LA TRANSFORMACIÓN IN VITRO E IN VIVO DE UN FENOTIPO RECEPTOR DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA POSITIVOS EN NEGATIVO EN TUMORES DE CÁNCER DE MAMA. IMPLICANCIAS TERAPÉUTICAS

Orlando, U.¹; Maloberti, P.¹; Garona, J.²; Ripoll, G.²; Solano, A.¹; Alonso, D.²; Gomez, D.²; Podestá, E.¹

INBIOMED UBA-CONICET¹ Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes.²

El cáncer de mama altamente agresivo denominado triple negativo, receptores de estrógenos (RE), progesterona (RP) y HER2 negativos, es una de las enfermedades con mayor resistencia a la terapia. Previamente demostramos que la enzima acyl-CoA sintetasa 4 (ACSL4) juega un papel fundamental en la transformación de células humanas de cáncer de mama con un fenotipo poco agresivo a un fenotipo agresivo capaz de desarrollar tumores *in vivo* en ausencia de estrógenos. En este trabajo se estudio la regulación de la expresión del REalfa y RP en células MCF-7 que sobreexpresan ACSL4 en forma estable *in vitro* e *in vivo*. Además se estudio en

modelos *in vivo* el efecto de la sobreexpresión de ACSL4 sobre la expresión de REalfa y RP y el efecto del tratamiento de tumores triple negativos con inhibidores de la actividad de ACSL4 sobre la expresión de REalfa y RP. Los resultados *in vitro* muestran que la sobreexpresión de ACSL4 disminuye la expresión de REalfa analizado por RT-PCR, western blot o por inmunohistoquímica (0.75 ± 0.03 vs 0.55 ± 0.02 mRNA-RE alfa/L19, $p\leq 0-05$; 0.85 ± 0.04 vs 0.45 ± 0.03 $p\leq 0-01$ -REalfa/Btubulin). Esto se confirma para el RP y para el crecimiento de tumores ACSL4 dependientes *in vivo*. Concordante con estos resultados la inhibición de la actividad de ACSL4 revierte la inhibición en la expresión de REalfa y RP e inhiben el crecimiento tumoral. Estos resultados sugieren que ACSL4 controla negativamente la expresión del REalfa y RP y podría ser uno de los primeros eventos en la transformación de un fenotipo RE, RP positivos en negativo y concuerdan con el hallazgo en muestras de tumores humanos de mama en los cuales la expresión de ACSL4 correlaciona con la ausencia en la expresión de RE y sugieren que la inhibición en la expresión o actividad de ACSL4 podría ser un blanco terapéutico utilizado en forma coadyuvante a la hormono-terapia para contrarrestar la pérdida de hormono-dependencia en los tumores hormono-dependientes.

298. (291) EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL FGFR-2 SOBRE EL CRECIMIENTO IN VIVO DE LA LÍNEA TUMORAL MAMARIA HUMANA IBH-6

Pérez Piñero, C. ; May, M. ; Luthy, I. ; Lanari, C.

Instituto de Biología y Medicina Experimental - IBYME

El 75% de las pacientes presentan tumores de mama que expresan receptores hormonales, siendo susceptibles a terapias hormonales. Sin embargo, un porcentaje de las pacientes genera resistencia a las terapias. Por otro lado, se describió un polimorfismo del FGFR2 asociado a un aumento de cáncer de mama en pacientes cuyos tumores expresan receptores hormonales. Describimos anteriormente la interacción nuclear del receptor de progesterona y FGFR2 así como la adquisición de tumorigenicidad en la línea T47D transfectada con la mutante constitutivamente activa de FGFR2 en forma estable en ratones SCID/NOD. Las células IBH6 *wt* expresan receptores hormonales, los cuatro subtipos de FGFR (1 al 4) y crecen *in vivo* como xenotransplantes. El objetivo del trabajo fue evaluar el papel del FGFR2 sobre el crecimiento de las células IBH6 tanto *in vivo* como *in vitro*. Las células se transfectaron establemente con un plásmido diseñado para silenciar al FGFR2 (shFGFR2) y con el plásmido control (vector vacío). Se corroboró por *Western blot* el silenciamiento del receptor. No hubo diferencias significativas de proliferación celular en ambos tipos celulares creciendo *in vitro*. Luego, se inocularon 3.10^5 células en el flanco derecho de ratones (*nu/nu*). Los animales inoculados con las células IBH6 shFGFR2 presentaron tumores significativamente menores que los animales inoculados con las células control ($p<0,001$) observándose asimismo cambios morfológicos denotando la reducción de la agresividad de los mismos, así como también menor expresión de Ki67 (marcador de proliferación, $p<0,01$). Por *Western blot* se observó también una menor fosforilación de las proteínas Erk 1/2 y Akt con respecto a los controles ($p<0,05$). Podemos concluir que el FGFR2 cumple funciones claves que llevan al crecimiento tumoral *in vivo*, sugiriendo, como postulamos en trabajos previos, que es activado por factores estromales. Estos resultados apoyan el uso de inhibidores de FGFR2 en el tratamiento del cáncer de mama.

299. (546) EFECTO DE LA LIPOFECCIÓN DEL GEN INTERFERÓN-OMEGA EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO Y MELANOMA FELINO

Villaverde, M.¹; Targovnik, A.²; Baffico, R.¹; Miranda, M.²; Glikin, G.¹; Finocchiaro, L.¹

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires²

Los interferones son citocinas con actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora que modifican tanto la respuesta innata como adaptativa. El interferón omega felino (IFN ω) es el único interferón recombinante (rIFN ω) que posee licencia para el

tratamiento de diversas virosis felinas y caninas. La transferencia del gen de esta citokina constituiría una nueva herramienta farmacológica más tolerable y con similar o mayor efectividad que la proteína recombinante. Con el fin de explorar la transferencia genética de esta citokina, los objetivos de este trabajo fueron: a) clonar el gen *fIFN ω* , b) establecer líneas tumorales felinas, c) evaluar el efecto de la lipofección del gen *fIFN ω* en las líneas tumorales establecidas y d) comparar los resultados con el efecto de la proteína *rIFN ω* . Hasta el momento, (i) se clonó el gen *fIFN ω* en un vector plasmídico de alta expresión, (ii) se midió su actividad biológica y se reconoció mediante un anticuerpo policlonal específico en western blot; (iii) se estableció una línea de carcinoma mamario felino (Al) y una de melanoma felino (Rn), ambas cultivables como monocapas y esferoides (modelo más realista de la estructura tumoral). La lipofección del gen *fIFN ω* resultó altamente citotóxica para ambas líneas tumorales felinas (disminución de la actividad de la enzima fosfatasa ácida; $p < 0,001$ para monocapa y $p < 0,01$ para esferoides). Este efecto fue similar al del agregado de la proteína *rIFN ω* (1000 UI/ml). Tanto el gen *fIFN ω* como la proteína *rIFN ω* no resultaron citotóxicos en la línea CRFK (riñón felino normal). Dada su alta efectividad *in vitro*, se propone continuar con el estudio del gen *fIFN ω* como terapia antitumoral felina, estrategia que podría resultar ventajosa e innovadora para el tratamiento de neoplasias u otras patologías felinas. Próximamente, evaluaremos los efectos antitumorales del gen *fIFN ω* en el marco de un protocolo clínico veterinario para el tratamiento de tumores que aún no cuentan con una terapia adecuada.

300. (787) USO DE UN ADENOVIRUS REPLICATIVO EN UN MODELO PRECLÍNICO DE ADENOCARCINOMA DE OVARIO

Lopez, M.¹; Cuneo, N.²; Viale, D.¹; Bravo, I.⁴; Curiel, D.³; Podhajcer, O.¹

Instituto Leloir¹ Hospital Municipal de Oncología Marie Curie² Universidad de Alabama at Birmingham³ Hospital Eva Perón⁴

El cáncer de ovario es una de las principales enfermedades malignas a nivel mundial. Si bien las terapias convencionales como la cirugía, quimioterapia y radiación han progresado mucho, la sobrevida a los 5 años de los pacientes en estadios avanzados es aun baja. Con el propósito de mejorar el tratamiento de esta neoplasia resistente a las terapias convencionales proponemos la utilización de la viroterapia. Esta disciplina utiliza un virus que al replicarse elimina específicamente a las células tumorales. En este trabajo mostramos el desarrollo y la caracterización de un adenovirus oncolítico (CRAD) modificado para replicarse tanto en el estroma como en las células epiteliales malignas de un tumor (AdF512v1). Dicho vector posee una modificación en su fibra para aumentar la infección en las células de ovario (fibra quimera Ad5/3), un mutante del gen viral E1A que no puede unir la proteína celular retinoblastoma (Rb) para atenuar su acción en células normales y su replicación esta dirigida por el promotor de la proteína SPARC. AdF512v1 fue capaz de replicarse en 4 líneas celulares de cáncer de ovario y 9 muestras de tumores primarios y metástasis de ovario de pacientes, mientras que fue incapaz de replicarse en 5 muestras quirúrgicas de ovarios humanos normales. Cuatro inyecciones intraperitoneales de 5×10^{10} pv de AdF512v1 eliminaron el 50% de los tumores humanos implantados en el peritoneo de ratones inmunodeprimidos. En este trabajo estudiamos el clearance del virus *in vivo* en el peritoneo de los ratones y observamos su permanencia en los tumores comparados con otros órganos como el hígado. La replicación del CRAD aumento 15-40 veces en los modelos tumorales que contenían células estromales. En conclusión este estudio presenta evidencias de la capacidad lítica del CRAD y demuestra la importancia de hacer blanco en el tejido estromal además del maligno para lograr la regresión tumoral.

301. (534) BRCA1 INDUCE LA TRANSCRIPCIÓN DE HO-1 EN XENOTRANSPLANTES DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Labanca, E.; De Luca, P.; Zalazar, F.; Vazquez, E.; De Siervi, A.

Depto de Química Biológica, FCEN, UBA - IQUBICEN CONICET

El supresor tumoral BRCA1 es clave en el mantenimiento de la integridad genómica, previniendo la acumulación de daño en el ADN. Recientemente demostramos que BRCA1 tiene un rol central en la modulación de genes asociados con la sensibilidad a agentes genotóxicos. Así, determinamos que BRCA1 aumenta significativamente la transcripción de Hemo oxigenasa 1 (HO-1), una enzima antioxidante involucrada en la carcinogénesis prostática. El objetivo de este trabajo fue profundizar en el mecanismo de regulación por BRCA1 de la expresión y función de HO-1 en el cáncer de próstata. Utilizando un panel de líneas tumorales de próstata que tienen aumentada o disminuida la expresión de BRCA1 encontramos que esta proteína reprime genes regulados negativamente por HO-1 como MMP9, uPA y Ciclina D1. Además, con el objetivo de estudiar la regulación de HO-1 por BRCA1 *in vivo*, establecimos un modelo de ratones xenotransplantados con células PC3 que tienen disminuida la expresión de BRCA1 o células control. Los tumores con expresión disminuida de BRCA1 mostraron un volumen tumoral 3 veces mayor que los controles. Más aún, la tasa de crecimiento tumoral de los xenotransplantes shRNA BRCA1 (5,98 mm³/día) resultó 12 veces mayor a la tasa de crecimiento observada en los xenotransplantes shRNA Scramble (0,50 mm³/día). Sorprendentemente, cuando analizamos por RT-qPCR estos tumores comprobamos que presentaban bajos niveles de HO-1 e inducción de la expresión de sus genes blanco: MMP9, uPA y Ciclina D1. Estos resultados sugieren que BRCA1 podría cumplir su rol protector contra el estrés oxidativo a través de la co-regulación transcripcional de HO-1, implicando así a BRCA1 en una nueva vía que se asocia a su función supresora de tumores.

302. (761) REPUESTA AL ANTIPROGESTÁGENO MIFEPRISTONA DE XENOTRANSPLANTES DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO QUE EXPRESAN ALTERNATIVAMENTE LA ISOFORMA A O B DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

Sequeira, G.; Rojas, P.; May, M.; Lanari, C. IByME

El 70% de los cánceres de mama expresan receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) y son susceptibles a beneficiarse con una terapia hormonal. En trabajos previos del laboratorio utilizando un modelo experimental murino demostramos que el antiprogéstágeno Mifepristona (MFP) induce regresión en tumores que tienen una mayor expresión de isoforma A del RP (RPA) con respecto a la isoforma B (RPB). Sin embargo, existen trabajos que informan que el efecto de la MFP es independiente del RP. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la MFP en xenotransplantes con la línea celular de cáncer de mama humano T47D, modificada para expresar sólo RPA (T47D-YA) o RPB (T47D-YB) que fueron generadas en el laboratorio de Kathryn B. Horwitz (Denver, Colorado). Brevemente, se inyectaron 5×10^6 células de cada línea celular con matrigel en los flancos derecho e izquierdo de cada ratón hembra NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ en forma simultánea. Todos los animales recibieron una semana antes un pellet de 17 beta estradiol de 0.5 mg. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 40 mm², luego de 10 días, se les implantó un pellet placebo o de MFP (6 mg). Sólo se observó una disminución del tamaño tumoral luego de 7 días de tratamiento en los tumores T47D-YA tratados con MFP ($p < 0,05$). La regresión tumoral fue acompañada por cambios a nivel histológico mostrando un aumento de estroma esclero-hialino y de focos tanto necróticos como apoptóticos. Asimismo, en una gran cantidad de células el citoplasma se encontró finamente vacuolado. No se observaron diferencias ni de tamaño ni de morfología en tumores T47D-YB bajo el mismo tratamiento. En conclusión, demostramos que la MFP induce regresión tumoral en este modelo de cáncer de mama humano, al igual que en el modelo murino a través del RP, más específicamente a través de su isoforma A. Este factor de transcripción activado por MFP actuaría como supresor tumoral independientemente de la presencia o no de RPB.

INMUNOLOGÍA TUMORAL 2

303. (126) EFECTOS DE LA PROGESTERONA SOBRE CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS Y CÉLULAS NK DURANTE LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

Spallanzani, R., Dalotto, T., Raffo Iraolagoita, X., Ziblat, A., Avila, D., Domaica, C., Fuertes, M., Salatino, M., Zwirner, N.

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET.

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) es un análogo sintético de la progesterona empleado como anticonceptivo y en terapias de reemplazo hormonal. Estudios clínicos y modelos experimentales han demostrado efectos pro-tumorales del MPA en cáncer de mama. Sin embargo, se desconoce si el MPA afecta a las células NK, las que son críticas para la inmunidad anti-tumoral debido a su capacidad citotóxica y la producción de IFN- γ . Con el objeto de evaluar los efectos del MPA sobre el sistema inmune en un contexto de crecimiento de tumor mamario, desafiamos ratones BALB/c con el tumor mamario murino 4T1, ya que éste no expresa los receptores clásicos de progesterona, hace metástasis en pulmón y promueve el reclutamiento de células mieloides supresoras (MDSCs) Gr1⁺CD11b⁺. Animales portadores del tumor tratados con MPA presentaron, respecto de animales portadores de tumor no tratados con MPA, a) un crecimiento del tumor primario idéntico; b) un aumento en el porcentaje (60,4%±6,6 vs 48,2%±12,3; $p < 0,001$) y número absoluto ($555 \times 10^6 \pm 89 \times 10^6$ vs. $260 \times 10^6 \pm 45 \times 10^6$; $p < 0,05$) de células Gr1⁺CD11b⁺ con predominio de MDSCs granulocíticas (G-MDSCs) en bazo, c) un aumento del porcentaje de MDSCs en pulmón (72,0±4,3 vs. 54,8±16,2; $p > 0,05$), d) un aumento en el porcentaje (1,30±0,03 vs. 0,92±0,08; $p < 0,05$) y número absoluto (2,6±0,3 vs. 1,3±0,3; $p < 0,05$) de células NK en bazo; e) un mayor número de metástasis en pulmón (15,8±1,7 vs. 7,2±1,6; $p < 0,01$); y f) un menor porcentaje de células NK en pulmón (0,25±0,07 vs. 0,37±0,07; $p > 0,05$). Además, en bazo de ambos grupos de animales se detectaron porcentajes similares de células NK productoras de IFN- γ cuando se re-estimularon *in vitro* con IL-12, IL-15 e IL-18 (21,0±1,3 vs. 21,0±1,6). Concluimos que el MPA promueve el reclutamiento de MDSCs y suprime el reclutamiento de células NK en pulmón, alterando la migración de células NK y que a través de este mecanismo podría contribuir al desarrollo de metástasis en pacientes bajo tratamiento con MPA.

304. (133) POLI AU, UN LIGANDO DE TLR3, ES UN EFECTIVO INDUCTOR DE RESPUESTA TH1 ESPECÍFICA CONTRA ANTÍGENOS TUMORALES IN VIVO, PROMUEVE UNA DISMINUCIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL E INCREMENTA LA SOBREVIDA DE LOS ANIMALES TRATADOS

Nocera, D., Núñez, N., Gatti, G., Zacca, E., Morón, G., Maccioni, M.

CIBICI-CONICET

El uso de análogos sintéticos de ARN doble cadena viral ha cobrado gran interés en la inmunoterapia contra el cáncer. El ácido poliadenilico poliuridílico (pAU) es un ligando específico de TLR3 y un fuerte inductor de IFN tipo I. En este trabajo se evaluó el efecto del tratamiento intratumoral (i.t.) con pAU en el desarrollo de una respuesta inmune específica contra antígenos del tumor. Células de melanoma murino B16 que expresan establemente Ovalbúmina (Ova) fueron inoculadas s.c. en ratones C57BL/6, IL12p40^{-/-}, Foxp3-GFP y *nude*. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medible (día 10 p.i.), éstos fueron tratados i.t. con 4 dosis de 50 μ g de pAU (B16-pAU) o PBS (B16-PBS) cada dos días (n=10 por grupo). Los ratones C57BL/6 y Foxp3-GFP del grupo B16-pAU mostraron una disminución significativa en el crecimiento tumoral así como un aumento en su supervivencia respecto al grupo B16-PBS ($p < 0,001$, n=10). Este efecto no se observó en ratones tratados de las cepas IL12p40^{-/-} y *nude*. El infiltrado intratumoral de células CD45⁺ en ratones del grupo B16-pAU evidenció un incremento en la frecuencia de células CD11c⁺ (3x, $p < 0,05$) y una disminución en la frecuencia tanto de células CD11b⁺ GR1⁺ (1.5x, $p = ns$) como de células Foxp3-GFP⁺ (2x, $p = 0,05$). Al evaluar la respuesta inmune contra Ova, células CD8⁺ de ratones OTI

marcadas con CFSE fueron transferidas adoptivamente a ratones portadores de tumores de ambos grupos. Luego de 72 hs post transferencia (p.t.) se observaron similares curvas de proliferación en ganglio drenante de ratones de ambos grupos. Sin embargo, luego de 6 días p.t. hubo un aumento en la frecuencia de células OTI IFN γ ⁺ (85.3±18.6 vs 23.3±16.5 %, $p < 0,05$) y OTII IFN γ ⁺ (83.8±11.3 vs 28.4±14.5 %, $p < 0,05$) infiltrando tumores del grupo B16-pAU vs. B16-PBS. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento i.t. con pAU induce un perfil de respuesta Th1 *in vivo* que promueve el control del crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia de los ratones.

305. (204) EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES PARA LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO (S1P) EN LINFOCITOS LEUCÉMICOS DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B (LLC)

Borge, M.^{1,3}, De Los Ríos Alincandú, M.¹, Nannini, P.^{1,3}, Morande, P.^{1,3}, Bezares, R.², Giordano, M.^{1,3}, Gamberale, R.^{1,3}
Instituto de Medicina Experimental IMEX-CONICET¹ Hospital T. Álvarez y Hospital Bancario, Buenos Aires, Argentina² Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA, Argentina³

La LLC se caracteriza por la acumulación de linfocitos B clonales en circulación y en órganos linfoides (OL). El clon leucémico se activa y prolifera en los OL por señales que brindan linfocitos T activados, células estromales y *nurse like cells* (NLC). Numerosos trabajos estudiaron los receptores que median el ingreso de las células LLC a los OL pero no hay estudios sobre los responsables de su egreso. En este trabajo determinamos en células LLC la expresión y funcionalidad de los receptores para S1P, un lisofosfolípido natural que regula el egreso de los linfocitos de los OL y evaluamos su modulación por estímulos que activan al clon leucémico. Mediante RT-PCR encontramos que las células LLC expresan dos de los cinco receptores para S1P: S1PR1 y 5 (n=15). Empleando Transwells, observamos que migran frente a 10 nM de S1P (n=12, $p = 0,003$). Luego cultivamos 24hs a células LLC con CXCL12, CpG, fibroblastos CD40L⁺ (fCD40L) o NLC autólogas y encontramos que las células LLC activadas con dichos estímulos mostraron una menor migración al S1P que las LLC de los cultivos controles (n=10, $p < 0,05$). Nuestros resultados sugieren que las señales activadoras presentes en el microambiente tumoral pueden estar inhibiendo la respuesta al S1P favoreciendo la retención del clon leucémico dentro de los órganos linfoides y en última instancia la progresión de la enfermedad.

306. (449) LA QUIMIOTERAPIA CON TEMOZOLOMIDA NO REDUCE LA EFICACIA ANTITUMORAL DE UNA ESTRATEGIA INMUNOTERAPÉUTICA EN MODELOS MURINOS DE CÁNCER DE CEREBRO

Candolfi, M.^{1,2}, Yagiz, K.², Wibowo, M.², Ahlsadeh, G.², Puntel, M.^{2,3}, Lowenstein, P.^{2,4}, Castro, M.^{2,4}

Instituto de Investigaciones Biomedicas, Facultad de Medicina, UBA¹ Board of Governors Gene Therapeutics Research Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles² Terapias regenerativas y protectoras del Sistema Nervioso, Fundación Instituto Leloir³ Department of Neurosurgery, Department of Cell and Developmental Biology, University of Michigan⁴

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más agresivo y frecuente. La incorporación de quimioterapia con temozolomida (TMZ) al tratamiento quirúrgico y la radioterapia ha incrementado la supervivencia mediana de los pacientes de ~6 a ~20 meses, pero la supervivencia a 3 años sigue siendo menor al 5%. La administración intratumoral de vectores adenovirales que expresan la citoquina Flt3L y la molécula citotóxica timidina quinasa (TK) desencadena una respuesta inmune antitumoral que induce regresión tumoral en modelos preclínicos de GBM. Dado que la quimioterapia puede resultar en inmunosupresión, es importante determinar si el tratamiento con TMZ afecta la eficacia de la inmunoterapia propuesta. Evaluamos el efecto de la TMZ en ratones portadores de tumores intracerebrales (GBM: GL26 y

GL261; y melanoma metastático: B16). El tratamiento intratumoral con Ad.TK+Ad.Flt3L indujo regresión tumoral y sobrevida a largo plazo (100 d) en ~40% de los ratones portadores de tumores cerebrales (p<0.05, Log-rank test). La administración sistémica de TMZ no solo no impidió el efecto antitumoral de Ad.TK+Ad.Flt3L, sino que incrementó en los 3 modelos el porcentaje de ratones sobrevivientes (~55-60%). La administración de TMZ redujo levemente la infiltración intratumoral de macrófagos (p<0.05, ANOVA), pero no afectó el reclutamiento de linfocitos T y células dendríticas inducido por Ad.TK+Ad.Flt3L. El efecto antitumoral de Ad.TK+Ad.Flt3L+TMZ parece requerir un sistema inmune intacto, ya que el tratamiento falló por completo en ratones implantados con tumores GL26 que carecían de linfocitos (CD4^{-/-}, CD8^{-/-} Rag1^{-/-}, Igh^{-/-}) o células dendríticas (CD11c^{-/-}) o que no producían IFN-gama (IFN-gama^{-/-}). Nuestros resultados contradicen la noción de que la quimioterapia es invariablemente inmunosupresora y sugieren que la administración de TMZ no afectaría el desarrollo de inmunidad antitumoral inducido por Ad.TK+Ad.Flt3L.

307. (513) EVALUACIÓN DE LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ CIRCULANTES EN ANIMALES CBI SUSCEPTIBLES Y CBI- RESISTENTES AL ADENOCARCINOMA DE MAMA M-406

Pagura, L.¹, Cardinale, A.¹, Di Masso, R.^{1,2}, Scharovsky, O.^{1,2}, Rico, M.¹, Rozados, V.¹
Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, UNR¹ CIC-UNR²

El adenocarcinoma de mama M-406 surgió espontáneamente en una hembra de la línea CBI y desde entonces se lo mantiene *in vivo* por injertos intraperitoneales en su huésped singéico, en el que presenta 100% de letalidad (susceptibilidad). CBI es la línea testigo de un experimento de selección artificial por conformación corporal de la que deriva la línea CBI⁻. Cuando los ratones CBI⁻ son desafiados con M-406, éste crece y regresa en el 100% de los individuos (resistencia). La inmunosupresión actúa en diferentes niveles del sistema inmunológico. La administración prolongada de inmunosupresores aumenta el riesgo de cáncer, mediado por varios mecanismos. Con el objetivo de evaluar si el sistema inmune sería el responsable de la resistencia observada en los animales CBI⁻, se desafiaron con M-406 (Día 0) animales CBI, CBI⁻ y CBI⁻ inmunosuprimidos (CBI⁻I) con dexametasona (150 ug/día, Día -5). Se extrajo sangre venosa, el Día 0 y se determinó por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ circulantes. El tumor creció en el 100% de los animales CBI y CBI⁻I. El volumen tumoral (mm³), en el día 25 (media ± EE) fue mayor en CBI (1072±892,0) y CBI⁻I (1087±969,5) que en CBI⁻ (10,93±12,17) (ANOVA, P<0,001). En el día 34 el 100% de los animales CBI⁻ rechazaron el tumor. No se encontraron diferencias en el % de linfocitos CD8⁺ pero el % de linfocitos CD4⁺ (mediana y rango) fue menor (P<0,001; test Kruskal-Wallis) en los animales CBI [52,80 (21,50-61,90)] (P<0,001) y CBI⁻I [47,95 (36,30-71,00)] (P<0,05) comparados con los animales CBI⁻ [82,70 (74,50-88,00)] (test de Dunn). Puede concluirse que la inmunosupresión de los animales CBI⁻ provoca la disminución del % de linfocitos CD4⁺ hasta valores similares a los de la línea susceptible (CBI), con pérdida de la resistencia a M-406. Por lo tanto, el mayor valor porcentual de linfocitos CD4⁺ sería responsable, al menos en parte, de la resistencia observada en CBI⁻ ante el desafío con el tumor.

REPRODUCCIÓN 3

308. (28) INTERRELACIÓN DE IL-15 Y ESTRÓGENOS DURANTE LA PREÑEZ PORCINA TEMPRANA

Koncurat, M.¹, Williamson, D.¹, Yaful, G.²
Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLPam¹ Escuela de Veterinaria - UNRN²

El establecimiento de la preñez requiere de interacciones entre el conceptus y el endometrio gestante que involucra hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. La IL-15 está involucrada en el desarrollo y mantenimiento de células efectivas

del sistema inmune, tanto innato como adquirido, estimula la producción de citoquinas, de NK y promueve la expansión y diferenciación de células T y B. El embrión porcino sintetiza estrógenos (E2) a partir de los 5 días de preñez, quienes actúan como señal de reconocimiento materno fetal en la gestación porcina. Se sugiere que en especies con placenta hemocorial, deciduada, tales como murina y humana, la expresión del ARNm de la IL-15 es regulada por hormonas esteroideas. La placenta porcina es epiteliochorial, difusa, adecidua, plegada y no invasiva. El objetivo de este trabajo fue determinar posibles interrelaciones entre la concentración de IL-15 y E2 en suero durante la gestación temprana porcina. Se recolectaron (n= 40) muestras séricas de cerdas vacías (n=8) y en tres períodos de gestación: 5 días, 15 a 20 días y 23 a 49 días de preñez. La determinación de IL-15 se realizó por ELISA y la de E2 por quimioluminiscencia y los resultados fueron analizados por ANOVA. Las concentraciones séricas de IL-15 (pg/ml) en cerdas vacías en fase folicular fueron de 747,70; en fase luteal: 631,47; en cerdas gestantes de 5 días: 689,59; de 15 a 20 días: 343,23 y de 23 a 49 días: 644,33. Con respecto a las concentraciones de E2 (pg/ml) se hallaron los siguientes valores: vacías 19,36; 5 días: 34,85; 15-20 días: 10,56 y 23-49 días de gestación: 24,04. Las concentraciones de IL-15 y de estrógenos séricos se mantienen elevadas durante el transcurso de la gestación temprana porcina, salvo a los 15 días de preñez donde se observa un descenso significativo de ambos valores (p<0,01). En conclusión, se podría sugerir que la expresión de IL-15 está regulada por la concentración sérica de estrógenos durante la gestación temprana porcina.

309. (48) LA EXPOSICIÓN A BISFENOL A ALTERA LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATAS MACHOS

Kass, L. , Altamirano, G. , Manfroni-Ghibaudo, E. , Durando, M. , Luque, E. , Muoz-De-Toro, M.
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL

El bisfenol A (BPA), compuesto sintético de uso muy difundido es un perturbador endocrino (PE) con actividad estrogénica y/o antiandrogénica. Previamente, demostramos que la exposición perinatal a BPA disminuye la elongación ductal y el número de estructuras terminales (ETs) en la glándula mamaria (GM) de ratas machos de 30 días de edad (DPN30). En este estudio, evaluamos si estas alteraciones morfológicas podrían ser consecuencia de modificaciones en la proliferación celular y/o expresión de receptores de hormonas esteroideas. Ratas Wistar preñadas se asignaron a dos experimentos. Exp1: las madres fueron expuestas a BPA (0, 25 y 250 ug/kg/día) mediante bombas osmóticas sc desde el día 8 de gestación (DG8) hasta el parto. Exp2: las madres recibieron BPA (0 y 50 ug/kg/día) en el agua de bebida desde el DG9 hasta el destete. En DPN30, las crías machos de ambos experimentos recibieron bromodeoxiuridina (BrdU) previo al sacrificio y se obtuvieron muestras de GM. En conductos y ETs se cuantificó la incorporación de BrdU (índice de proliferación celular) y la expresión de los receptores de estrógenos alfa (RE), progesterona (RP) y andrógenos (RA). En DPN30, a diferencia de lo que ocurre en la hembra, el parénquima mamarario de los machos controles no expresa RP y si presenta niveles detectables de RA. Independientemente de la vía de administración, la exposición a BPA no modificó la actividad proliferativa, ni la expresión de RE y de RP; sin embargo, disminuyó la expresión de RA. En el Exp1, la dosis más alta de BPA produjo una disminución significativa en la expresión de RA en las células epiteliales de los conductos y en el porcentaje total de expresión de este receptor. En el Exp2, la dosis de BPA utilizada durante la gestación y lactancia fue suficiente para producir la disminución del RA tanto en los conductos como en las ETs. Las alteraciones morfológicas observadas en la GM de los machos podrían deberse a modificaciones en la vía androgénica inducidas por el PE.

310. (49) ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE MEDIAN LOS EFECTOS DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA PLACENTARIA

Gambino, Y.^{1,2}, Pérez-Pérez, A.³, Calvo, J.^{2,4}, Sánchez Margalef, V.³, Varone, C.^{1,2}
 Depto Química Biológica-FCEN-UBA¹; IQIBICEN-CONICET² Depto Bioquímica Médica y Biología Molecular U. Sevilla³, IByME⁴

La leptina es una proteína placentaria que regula la fisiología reproductiva. Durante el embarazo tendría efectos sobre la implantación y el desarrollo embrionario. Sin embargo, aún no se conoce totalmente cómo se regula su expresión en células trofoblásticas. Resultados previos indican que el estradiol (E₂) regula la expresión de leptina placentaria a nivel transcripcional, a través de receptores de estrógenos (ERs) nucleares y de membrana. Un análisis *in silico* del promotor del gen LEP mostró posibles sitios de unión de factores de transcripción (FT) que median la acción de los ERs, tales como CREB, AP-1, NFκB y SP1. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de estos FT en la expresión de leptina placentaria regulada por E₂, empleando células BeWo como modelo experimental. Mediante transfecciones transitorias, la expresión de mutantes dominantes negativas de CREB, c-Jun o c-Fos disminuyó la actividad del promotor del gen LEP inducida por E₂. CREB también regularía la expresión basal de leptina, e interactuaría con un elemento CRE localizado en la región promotora comprendida entre -1951 y -1546 pb, la cual responde a E₂. Por otro lado, tanto la sobreexpresión de p65 como la inhibición farmacológica de la vía NFκB disminuyeron los efectos del E₂ sobre la expresión de leptina, sugiriendo la participación de este factor en la regulación de leptina. Por último, se observó que la sobreexpresión de SP1 incrementó la actividad basal del promotor de leptina. Este efecto depende de los niveles de ERα, sugiriendo una interacción entre ambas proteínas. Sin embargo, en estas condiciones disminuyó la acción del E₂ sobre dicho promotor, por lo que esta interacción se vería afectada en presencia de ligando. En conjunto, estos resultados proveen nuevas evidencias acerca de los mecanismos por los cuales el E₂ regula la expresión de leptina placentaria. Futuros ensayos permitirán estudiar en detalle los complejos proteicos formados en el promotor de leptina en respuesta a E₂.

311. (110) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A SOBRE LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL DEL ÚTERO DE RATAS ADULTAS CON TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO

Vigezzi, L., Bosquiazzo, V., Muoz-De-Toro, M., Luque, E.
 Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, FBCB, UNL.

Previamente demostramos que la exposición temprana a bajas dosis de Bisfenol A (BPA) alteró la histomorfología uterina en ratas adultas tratadas con estrógenos. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la exposición perinatal (gestación+lactancia) a BPA sobre la expresión de moléculas implicadas en la diferenciación funcional del útero de ratas adultas con terapia hormonal de reemplazo con 17β-estradiol (E2). Ratas preñadas (*Wistar*) 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 E2 durante 3 meses. Se disecaron los cuernos uterinos para incluirlos en parafina o conservarlos a -80° C. Se estudió la expresión de receptores hormonales (receptor de estrógenos alfa -REα- y beta -REβ-, y receptor de progesterona -RP) por inmunohistoquímica en el estroma subepitelial del útero. Mediante RT-PCR en tiempo real se evaluó la expresión del ARNm del factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I) y su receptor (IGF-IR), Wnt7a, Wnt5a y β-catenina. En los animales expuestos a BPA50 la expresión de REα y de RP disminuyó con respecto al control (REα: control 13,03±0,41 vs. BPA50 10,83±0,51; RP: control 14,53±1,0 vs. BPA50 11,04±0,77; p<0,05). Las hembras expuestas a BPA0.5 presentaron menor expresión de IGF-I e IGF-IR (p<0,05). La expresión de Wnt7a y Wnt5a aumentó en los animales expuestos a BPA50 y disminuyó en los expuestos a BPA0.5 (Wnt7a: control 1 vs. BPA50 2,95 y BPA0.5 0,48; Wnt5a: control 1 vs. BPA50 1,85 y BPA0.5 0,5; p<0,05). La expresión

de β-catenina fue mayor en los animales expuestos a BPA50 (p<0,05). Los resultados demuestran que la exposición temprana a BPA altera la respuesta uterina al tratamiento con E2 en la adultez. La expresión de las moléculas estudiadas difirió según la dosis de BPA administrada perinatalmente, sugiriendo distintas vías de acción para cada dosis de BPA.

312. (112) AGONISTAS DEL RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES ALFA (PPARA) COMO REGULADORES DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN EL PULMÓN DE FETOS DE RATAS DIABÉTICAS

Kurtz, M., Martnez, N., Mazzucco, B., Capobianco, E., Jawerbaum, A.
 Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, CEFYBO - CONICET

El pulmón fetal es afectado por la diabetes materna. Nuestros trabajos previos identificaron una sobreproducción de óxido nítrico (NO) en el pulmón de fetos de ratas diabéticas, que podría provocar daño tisular vinculado a un estado pro-inflamatorio. El receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa (PPARA) es un factor de transcripción que regula la expresión de diversos genes involucrados en procesos anti-inflamatorios, metabólicos y de desarrollo. **Objetivo:** evaluar el efecto de agonistas de PPARα sobre la producción de NO y la expresión de PPARα y NO sintasa inducible (iNOS) en el pulmón de fetos a término de ratas control (C) y diabéticas (D). La diabetes se indujo por administración neonatal de estreptozotocina. El efecto de los agonistas de PPARα fue evaluado por: a) administración intrafetal de leucotrieno B₄ (LTB₄), agonista endógeno de PPARα, en los días 19, 20 y 21 de preñez y b) el tratamiento de las ratas gestantes con alimento suplementado con 6% de aceite de oliva rico en ácido oleico agonista de PPARs. Los fetos se explantaron al día 21 de preñez. Se evaluó en el pulmón fetal la producción de NO y la expresión de PPARα e iNOS (PCR). **Resultados:** La administración intrafetal de LTB₄ aumentó la expresión de PPARα en los pulmones de fetos hembra de ratas D (p<0.01) y la disminuyó en el grupo C (p<0.01); disminuyó la expresión de iNOS en el pulmón de fetos machos (p<0.05) y hembras (p<0.01) del grupo D y en los pulmones de los fetos macho (p<0.05) del grupo C. El tratamiento dietario aumentó la expresión de PPARα en los fetos hembra en el grupo D (p<0.01) y la disminuyó en el grupo C (p<0.01). Esta dieta también redujo la producción de NO en pulmones de fetos macho (p<0.001) y hembra (p<0.01) del grupo D a valores similares al C. **Conclusiones:** la activación de PPARα regula en el pulmón fetal su propia expresión y la de iNOS en forma género dependiente y previene la sobreproducción de NO inducida por la diabetes materna.

313. (118) EL EFECTO DEL LPS EN LA REABSORCIÓN EMBRIONARIA (RE) MURINA ESTA MEDIADO POR EL RECEPTOR DE CANNABINOIDES TIPO 1 (CB1)

Wolfson, M., Aisemberg, J., Domnguez Rubio, A., Vercelli, C., Franchi, A.
 Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

Los endocannabinoides son mediadores lipídicos que mimetizan los efectos centrales y periféricos inducidos por el THC, el principal compuesto psicoactivo de la marihuana. La Anandamida (AEA), uno de los endocannabinoides más estudiado, es un agonista endógeno de los receptores de cannabinoides tipo 1 y 2 (CB1 y CB2). Aunque la AEA es necesaria para la implantación, niveles elevados de la misma han sido asociados con abortos tempranos. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de aborto temprano en ratones BALB/c inducido por lipopolisacárido (LPS) en el día 7 de preñez, donde se observó una disminución de los niveles séricos de progesterona y aumento del óxido nítrico (NO). También demostramos que en útero y decidua de animales en el día 7 de preñez los efectos del LPS *in vitro* sobre el NO y el daño tisular son bloqueados por un antagonista de los CB1. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación del receptor CB1 en la RE inducida por

LPS utilizando en ratones CD1 que carecen de este receptor (KO). Se administró LPS a ratones CD1 wild type (WT) y KO en el día 7 de preñez. Los animales fueron sacrificados en el día 9, se retiraron los cuernos uterinos y se calculó el porcentaje de RE (sitios de implantación reabsorbidos/total de los sitios de implantación x 100). Se observó que los ratones WT tratados con una dosis de 1µg/gr de peso tuvieron una RE del 82,0 ± 11,9%, valor similar de RE al obtenido en el modelo BALB/c. Pero cuando se administró la misma dosis a ratones KO la RE fue del 28,5 ± 3,0%. Además, los ratones WT tratados con LPS 0,5µg/gr tuvieron una RE del 69,4 ± 22,0%, pero en los animales WT la RE fue solo del 3,4 ± 1,4%. Por otro lado, los ratones KO tratados con LPS 0,5µg/gr finalizaron la preñez y las crías tuvieron un aspecto saludable, aunque con un menor peso que los ratones KO de animales controles (p<0,05). Estos resultados nos sugieren que el sistema endocannabinoide participa de la reabsorción embrionaria inducida por LPS.

314. (241) VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LOS ARN MENSAJEROS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO Y PROGESTERONA DURANTE LA PREÑEZ EN LA VIZCACHA (*LAGOSTOMUS MAXIMUS*)

Charif, S., González, C., Insera, P., Villarreal, F., Saucedo, L., Halpern, J., Vitullo, A., Dorfman, V.

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico, Universidad Maimónides

El estradiol (E₂) actúa dualmente como activador o inhibidor del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG), a través de sus receptores cerebrales alfa (RE_α) y beta (RE_β). El RE_α funciona como factor de transcripción de los receptores de progesterona (RPG), mientras que el RE_β actúa como regulador de la actividad del RE_α, controlando así la expresión de RPG. La vizcacha presenta características reproductivas únicas como poliovlulación natural y pseudo-ovulación durante la gestación. Recientemente hemos descrito diferencias en la expresión de progesterona y de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) durante la gestación. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión del ARN mensajero de RE_α, RE_β y RPG en el hipotálamo de vizcacha. Se utilizaron hembras adultas preñadas ovulando (PO) y sin ovular (PNO), y no preñadas ovulando (NPO) y sin ovular (NPNO), (n=4 / grupo). Se extrajo el hipotálamo y se lo subdividió en las regiones anterior (HA) y posterior o Medio Basal (HMB). Mediante PCR en Tiempo Real se determinó que el HA presentó un aumento significativo (63%) en la expresión del RE_α en PO vs PNO (p<0.05), el mensajero de RE_β incrementó significativamente su expresión 5 veces en NPO vs NPNO, y 15 veces en PO vs PNO (p<0.05), y el RPG aumentó en NPO vs NPNO (56%) y en PO vs PNO (2 veces, p<0.05). En HMB no se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados en ninguno de los tres receptores. Además, mediante la técnica de ELISA se determinó un aumento significativo de 3 veces en el nivel de E₂ sérico en los animales PO vs los PNO. El incremento en la expresión de los ARN mensajeros con la ovulación, y particularmente durante la preñez, en la región de síntesis de GnRH, unido al aumento del E₂ sérico, sugiere una función activa del eje HHG durante la gestación. Esta actividad le brindaría al ovario el ambiente endócrino necesario para un funcionamiento particular.

315. (274) INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF_α, TGF_β E IL-13 EN PLACENTA HUMANA POR EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS

Guiazu, N.¹, Bulgaroni, V.¹, Rivero-Osimani, V.¹, Rivero, V.², Magnarelli, G.¹

IDEPA-CONICET, LIBIQUIMA, FAIN, Universidad Nacional del Comahue¹ CIBICI-CONICET, Dto Bioq. Clin, FCQ, Universidad Nacional de Córdoba²

La información epidemiológica y de modelos experimentales, indica que los plaguicidas organofosforados (OF) afectan al sistema inmune. Durante la gestación las citoquinas modulan el crecimiento de la placenta y la invasión, y la proliferación/apoptosis del trofoblasto. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la expresión de citoquinas en la placenta se modifica por exposición a OF. Previo

consentimiento informado, se colectaron placentas a término (n=82) de pacientes según criterios de inclusión/exclusión: residentes urbanas -ZU- no expuestas (control) y rurales -ZR- durante período de pulverización (PP) y receso (PR). La exposición a OF se determinó en base a la actividad de carboxilesterasa en placenta (disminución significativa en ZR en PP). Se estudió la expresión por RT-PCR del transcrito de las citoquinas anti-inflamatorias IL-13, IL-10, TGF_β, y pro-inflamatorias IL-8, IL-6, TNF_α. Se observó que un incremento en la frecuencia de expresión de TNF_α (p=0,04) y TGF_β (p=0,001) en ZR vs ZU. Adicionalmente, la co-expresión de ambas citoquinas se asoció significativamente (p=0,001). Sin embargo, tanto la expresión de TNF_α como TGF_β no mostraron cambios entre PP y PR. Por otra parte, la citoquina anti-inflamatoria IL-13 mostró un incremento en la frecuencia de expresión sólo en ZR durante PP (p=0,0002) y no se detectó en el grupo control. No se halló diferencia en la frecuencia de expresión de IL-10, IL-8 e IL-6. Estos resultados indican alteraciones del balance de citoquinas en la placenta de la población rural. En particular, resulta relevante la expresión de IL-13, ya que es conocido que sólo se expresa en la placenta temprana. Sin embargo, su inducción se podría asociar a la reparación de los tejidos y la respuesta fibrótica, característica histológica detectada en modelos animales expuestos a OF. Agradecimientos: Méd. G. Álvarez, Hospital Castro Rendón. Obstétrica C. Romero, Hospital G. Roca. Subsidios de UNComahue, CONICET, FONCYT y SACYT.

316. (288) LA LEPTINA PLACENTARIA POSEE UN EFECTO INHIBITORIO SOBRE LOS NIVELES DE P53

Toro, A.¹, Maymó, J.¹, Pérez Pérez, A.², Calvo, J.¹, Sánchez Margalet, V.², Varone, C.¹

Depto de Química Biológica, FCEN, UBA, IQUIBICEN-CO-NICET¹ Depto de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla²

Durante la implantación embrionaria se genera un dialogo 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. Observamos que la leptina tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de Caspasa-3 en células. 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 confirmó en explantos placentarios la inhibición de Caspasa-3 por leptina. Se analizó la expresión de p53, regulador clave del ciclo celular. Se detectó por Western blot una disminución en la expresión de p53 en células BeWo como en Swan y en explantos placentarios generada por leptina. La actividad de p21, target de p53, tiende a disminuir en presencia de leptina; reforzando el resultado obtenido previamente. Se estudió también la expresión de p53 en presencia de un inhibidor de MEK1/2 (PD 98059). En presencia de PD no se observó el efecto inhibitorio de leptina, indicando que las MAPKs podrían estar involucradas en la acción de leptina sobre p53. 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.

317. (343) METABOLISMO LIPÍDICO EN EL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO

Heber, M., Velez, L., Ferreira, S., Motta, A.
CEFYO, Laboratorio de Fisiopatología ovárica

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) está asociado a dislipidemia. Si bien la etiología de SOP no se conoce, se postula que una hiperandrogenización prenatal (HA) induciría un ambiente intrauterino desfavorable y reprogramación fetal. **Objetivo:** Analizar el alcance de la HA en el metabolismo lipídico en diferentes etapas del desarrollo: prepuberal y puberal. Ratas preñadas Sprague-Dawley se inyectaron entre los días 16 a 19

de gestación con 2 mg (T2) de testosterona ó aceite (control: C). Las crías hembras se pesaron y sacrificaron a los 21 (prepuberal) y 60 (puberal) días de edad. **Resultados:** El perfil lipídico en suero: colesterol total (CT), HDL y LDL colesterol y triglicéridos (TG) se cuantificó por kits de *Winer lab*. A los 21 días, el grupo T2 presentó valores de CT y el LDL mayores que en los C (CT: C=69±5 mg/dl, T2=81±7 mg/dl; LDL: C=9,95±1,3 mg/dl, T2=47±4 mg/dl) y de HDL menor que C (C=40±9 mg/dl, T2=14±5 mg/dl). No se observaron diferencias en la concentración de TG. A los 60 días, el grupo T2 presentó dos fenotipos, uno ovulatorio (T2O) y otro anovulatorio (T2A) detectados por seguimiento del ciclo estral por extendido citológico vaginal. El CT no varió entre los grupos, el HDL fue menor en el grupo T2 y no se vio variación entre T2O y T2A (C=50,85±1,3 vs T2O=43,9±4,5 mg/dl, T2A=45,9±5,5 mg/dl) el LDL T2O=38,66±1,26 y T2A=52,73±2,74 aumentó respecto de C: 19,4 ±3,4 mg/dl; y fue significativamente mayor en el grupo T2A. TG fue mayor en los grupos T2 (C: 16,3±3,0 mg/dl vs T2O=71,77±7,54, T2A=84,66±1,23) dentro del grupo T2, fue mayor la concentración para T2A. La acumulación de lípidos en el ovario se cuantificó por tinción con Red Oil Stain mostrando en el grupo T2 de 21 días un aumento del 39% de las grasas en el ovario y en el T2 de 60 días del 83%. Concluimos que la HA altera el perfil lipídico, que se hace más importante con la edad y mas aún en el fenotipo anovulatorio.

318. (360) PROGRAMACIÓN INTRAUTERINA DE ALTERACIONES METABÓLICAS Y DAÑO PRO-INFLAMATORIO EN EL CORAZÓN DE LA DESCENDENCIA HEMBRA Y MACHO DE RATAS CON DIABETES MODERADA

Pelesson, M., Higa, R., Forn, D., Jawerbaum, A., Capobianco, E.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CONICET

Las anomalías metabólicas de la madre diabética se vinculan con la programación intrauterina de enfermedades que serán evidentes en la vida adulta de la descendencia. Entre ellas, las enfermedades metabólicas y cardíacas son de gran prevalencia. **Objetivos:** Estudiar el impacto de un modelo experimental de diabetes moderada en la gestación sobre el metabolismo y marcadores pro-inflamatorios/pro-oxidantes en el corazón de la cría, identificando posibles diferencias género-dependientes. **Metodología:** Se determinaron los niveles de trigliceridemia y colesterolemia en el plasma de ratas Wistar sanas (C) y diabéticas (D), obtenidas mediante inyección neonatal de estreptozotocina 90mg/kg, glucemia entre 180 y 220 mg/dl) en el día 21 de gestación. Las crías de las ratas C y D de 4 meses de edad fueron pesadas, sexadas y sacrificadas. El corazón fue pesado y guardado a -80°C para la evaluación de óxido nítrico (dosaje de sus metabolitos estables, nitratos/nitritos) y de TBARS (índice de lipoperoxidación). En el plasma de las crías se determinó la glucemia, la colesterolemia y la trigliceridemia (mediante equipos comerciales). **Resultados:** Además de la hiperglucemia, las ratas D gestantes presentaron mayor trigliceridemia y colesterolemia (p<0,05) en comparación a las ratas C. La glucemia de las crías hembra y macho de ratas D se incrementó al compararse con C (p<0,05). La colesterolemia fue similar en el plasma de las crías C y D, y la trigliceridemia mayor en las crías de rata D comparado con C (p<0,05), sin evidenciarse diferencias género-dependientes. En el corazón de las crías hembra y macho de ratas D los niveles de nitratos/nitritos y TBARS son mayores que en las crías de ratas C (p<0,05). Dichos parámetros no mostraron diferencias género-dependientes. **Conclusiones:** Alteraciones moderadas de la glucemia y trigliceridemia materna afectan dichos niveles en la cría adulta. Asimismo, se evidencia un incremento en los niveles de parámetros pro-inflamatorios/pro-oxidantes en el corazón, posiblemente vinculados a la inducción de enfermedades cardíacas de la descendencia de ratas D. **CONCLUSIONES:** Los resultados obtenidos de los experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren que el LPA y su receptor LPA3 participan de la decidualización y la vascularización en el útero de rata.

319. (766) ESTUDIO IN VITRO DE DOS TERAPÉUTICAS NATURALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS: RESVERATROL Y EGCG

Ricci, A.¹, Olivares, C.¹, Bilotas, M.¹, Bastón, J.¹, Singla, J.², Alvarado-Díaz, C.³, González Ramos, R.³, Meresman, G.¹, Barañao, R.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Hospital de Clínicas "José de San Martín", Buenos Aires, Argentina.² Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Santiago, Chile.³

La endometriosis (EDT) es una enfermedad crónica, con altos grados de recidivas luego de la terapéutica médica habitual estrógeno-supresora. Antecedentes previos de nuestro laboratorio demostraron que el resveratrol (Res), una fitoalexina presente en las uvas, y el galato de epigallocatequina (EGCG), catequina más abundante del té verde, poseen un efecto inhibitorio *in vivo* en el desarrollo de la EDT. Se ha visto además que ambos polifenoles poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de estos polifenoles naturales sobre la proliferación y la apoptosis de células epiteliales endometriales humanas, y su posible mecanismo molecular a través de la vía de NF-κB. Para ello, se realizaron cultivos primarios de células epiteliales endometriales humanas (CEE) partiendo de biopsias de endometrio eutópico de pacientes con EDT y mujeres controles. A las 48 h se estimularon con distintas dosis de Res o EGCG. A las 24 h se evaluó la proliferación celular utilizando el kit de reducción de MTS y los índices de apoptosis celular utilizando un kit de TUNEL con fluoresceína. Por otra parte, se evaluaron en una línea celular de carcinoma endometrial (ECC-1) los niveles de proliferación celular utilizando la metodología mencionada anteriormente, y los niveles de activación de NF-κB sobre extractos nucleares mediante el ensayo de TransAM. Observamos que ambos compuestos indujeron una inhibición de la proliferación de CEE (p<0.05) y de ECC-1 (p<0.01), y un aumento de la apoptosis de CEE (p<0.05). Por otra parte, los niveles de NF-κB (p65) activado disminuyeron con ambos tratamientos respecto del basal (p<0.05). Nuestros resultados sugieren un efecto inhibitorio de Res y EGCG sobre el crecimiento del tejido endometrial, el cual al menos en parte estaría dado por una inhibición de la activación de NF-κB, y avalan seguir investigando estos compuestos como estrategias novedosas para tratar la EDT.

320. (606) LA EXPOSICIÓN PERINATAL (PRENATAL/POST-NATAL) A BISFENOL A (BPA) ALTERA LA TASA DE OVULACIÓN/LUTEINIZACIÓN EN LA VIDA ADULTA

Santamara, C.¹, Abud, J.¹, Rivera, O.², Muoz De Toro, M.¹, Luque, E.¹, Rodriguez, H.¹

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes¹ Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora.²

Previamente demostramos que la exposición neonatal de ratas hembras a BPA vía sc., altera el desarrollo folicular y la sobrevivencia de los embriones implantados. Sin embargo, la vía oral es la más representativa de la exposición de humanos a BPA. Nuestro objetivo fue evaluar si la exposición a BPA por vía oral provoca disfunciones ováricas asociadas con la fertilidad. Ratas Wistar preñadas fueron tratadas vía oral desde el día 9 de gestación hasta el destete con 50µg/kg.día(BPA50), 0.5 µg/kg.día (BPA0.5) o vehículo. De un grupo de crías se obtuvieron los ovarios en día postnatal 90(DPN90), y se calculó el volumen de los ovarios usando el principio de Cavalieri y la dinámica folicular [(densidad de volumen de cada población folicular, n° de ovocitos totales/mm³, presencia de folículos multiovocitarios e incidencia de cuerpos luteos(CL)]. Se evaluó la expresión de receptor de estrógenos alfa y beta, de andrógenos (RA) y p27 por inmunohistoquímica. Para estudiar la respuesta del ovario a gonadotropinas, a otro grupo de crías se les realizó un tratamiento superovulatorio (SO) en DPN30, obteniéndose los ovarios 7 y 22 horas post-hCG, determinando el n° de folículos antrales (FA) totales, sanos y atrésicos a las 7 hs y el n° de ovocitos ovulados, el tamaño de CL y la expresión del marcador de luteinización P450scc por PCR, a las 22 hs. En BPA50 y BPA0.5 detectamos una disminución en la densidad de folículos activados. La expresión RA disminuyó en los folículos de

BPA50 (primarios, preantrales y antrales) y BPA0.5 (primarios), y aumentó en folículos primordiales de BPA0.5. En hembras SO de BPA50 se observó un menor n° de FA totales y sanos, un menor n° de ovocitos ovulados y menor tamaño de los CL. En conclusión, la exposición perinatal por vía oral a dosis de BPA definidas como seguras inhiben el desarrollo folicular asociado a una menor expresión de RA en la vida adulta; y disminuye la respuesta *per se* de los folículos a gonadotrofinas reduciendo la tasa de ovulación.

321. (619) PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO Y SU RECEPTOR LPA3 EN LOS PROCESOS DE DECIDUALIZACIÓN Y VASCULARIZACIÓN EN EL ÚTERO DE RATA

Beltrame, J., Sordelli, M., Dymitrenko, A., Cella, M., Sales ME, Franchi, A., Ribeiro, M.
CEFYBO

Introducción: Ratones deficientes en el receptor LPA3, uno de los receptores del ácido lisofosfatídico (LPA), presentan aberraciones en el espaciado de los embriones y un retraso en el inicio de la implantación. Previamente, en nuestro laboratorio observamos que el LPA aumenta la producción de prostaglandina E2 proveniente de la vía de la ciclooxigenasa-2 e incrementa la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible en el útero de rata. Tanto la prostaglandina E2 como el óxido nítrico son conocidos mediadores de los procesos de decidualización y vascularización durante la implantación embrionaria. Objetivo: Investigar la participación del LPA y su receptor LPA3 en la decidualización y vascularización. MÉTODOS: El útero proveniente de hembras Wistar en día 5 de gestación (ventana de implantación) se incubó con LPA en presencia y en ausencia de DGPP (antagonista del LPA3). Se determinó la expresión de IGFBP-1 e IL-10 (RT-PCR), marcadores de decidualización y vascularización, respectivamente. Además, hembras en día 5 de gestación recibieron una dosis única intrauterina de DGPP (0.08 mg/kg). Los animales se sacrificaron en los días 8 y 15 de preñez. Se estudiaron parámetros vinculados con la decidualización y la vascularización.

Resultados: El LPA, a través del receptor LPA3, aumentó la expresión del IGFBP-1 y de la IL-10 ($p < 0.001$). El tratamiento in vivo con DGPP produjo un 70% de reabsorción embrionaria. También se observaron alteraciones en la estructura morfológica de la decidua acompañados con signos de muerte celular, una marcada infiltración leucocitaria y extravasación eritrocitaria. Además, el DGPP disminuyó la longitud transversal de la arteria uterina y de la primera bifurcación de la arteria arcuata ($p < 0.001$).

NEUROCIENCIAS 3

322. (88) DURACIÓN DE LA RESACA ALCOHÓLICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE EXPOSICIÓN AGUDA AL ETANOL

Karadayian, A.; Mesquiatti, D.; Busso, M.; Cutrera, R.
Laboratorio de Neurobiología y Ritmos, Depto. Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina-UBA

La resaca alcohólica es el período que tiene lugar luego de una ingesta copiosa de alcohol, cuando la alcoholemia es cercana a cero. En humanos, los síntomas principales incluyen astenia, cefalea, ataxia, sed y pérdida de la concentración. Demostramos recientemente que, en el ratón, al inicio de la resaca alcohólica (6 hs posinyección (p.i.) alcohólica aguda), se manifiestan signos símil-ansiedad y disminución de la coordinación neuromuscular. Sin embargo, se desconoce cuál es la duración de los signos y síntomas de la resaca. Objetivo: determinar el período de recuperación de los síntomas estudiando la coordinación neuromuscular y los signos símil-ansiedad a lo largo del tiempo. METODOS: Se utilizaron ratones machos adultos Swiss criados en un fotoperíodo de ZT (Zeigebert time) 12:12; L:O donde el apagado de las luces fue a las 7 p.m. (ZT12). Los animales recibieron una inyección i.p. de etanol 3,8 g/kg (grupo resaca, n=10) o salina (grupo control, n=10). Se evaluó la coordinación neuromuscular (*Tightrope test*), signos

de ataxia (*Footprint test*) y el comportamiento símil-ansiedad (*Elevated plus maze test*). Las pruebas se realizaron en 12 horarios distintos entre ZT1 (8 a.m.) y ZT3 (10 a.m. del día posterior), finalizando así a las 26 hs p.i. Los resultados fueron analizados mediante pruebas de ANOVA de medidas repetidas y T-student. Resultados: los ratones en resaca presentaron una disminución ($p < 0.001$) en la coordinación neuromuscular durante las 22 hs p.i. de etanol recuperando los niveles basales de coordinación a las 26 hs p.i. Asimismo, durante la resaca, se observaron signos de ataxia dados por el aumento de variabilidad y solapamiento de pasos en la marcha ($p < 0.05$) y se manifestaron signos símil-ansiedad durante las 16 hs p.i. ($p < 0.05$) que desaparecieron por completo a las 24 hs p.i. CONCLUSIÓN: la resaca alcohólica, al menos bajo estos parámetros, tiene una duración de 18 hs (24 hs p.i. alcohólica, inicio de resaca: 6 hs p.i.).

323. (149) DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN SISTEMA DE ANÁLISIS DE CONTROL DE ENTRADA SENSORIAL AUDITIVA EN RATAS INMADURAS Y ADULTAS JÓVENES

Yodice, A.¹; Tardivo, A.¹; Hess, L.¹; Scremin, O.^{1,2,3}; Chialvo, D.^{1,2,4}
UNR¹ CONICET² School of Medicine, UCLA, USA.³ UCLA, Lab. de Neurofisiología.⁴

La entrada sensorial al sistema nervioso central (SNC) esta controlada por compuertas neurales que pueden alterarse en diversas condiciones fisiológicas y patológicas. Resulta esencial estimar la condición de dichas compuertas en forma cuantitativa. El reflejo auditivo de alerta (RAA) consiste en una reacción motora del animal expuesto a un sonido breve de alta intensidad (AA) que puede ser parcialmente inhibida por la presencia de un sonido de menor intensidad (PP) que lo preceda por 100 milisegundos, fenómeno conocido en la literatura como inhibición por pre-pulso (IPP). **Objetivo:** Diseño, construcción y validación de un sistema para la medición de RAA y IPP en ratas. El sistema consiste en 4 cámaras oscuras y aisladas de sonido conteniendo cada una un cilindro de plástico de 10 cm de diámetro, donde se coloca el animal, y longitud ajustable con tabiques removibles entre 10 y 16 cm, en cuya base se encuentra un acelerómetro (DE-ACCM-3D, DimensionEngineering.com) conectado a una placa conversora dígito-analógica (DAQ Card TM-6062E, National Instruments). Un programa escrito en MATLAB^{®2007} se utilizó para generar el espectro, duración, intensidad y orden de los pulsos sonoros, así como el análisis de la respuesta motora del animal. Se estudiaron 2 grupos de ratas de edades: A=28 días, n=20; y B=118 días, n= 10, alternando en forma pseudo-aleatoria 20 unidades de 3 secuencias de estimulación en cada rata, S1(AA= 92dB), S2(PP=73dB, AA=92dB) y S3(PP=84dB, AA=92). Las respuestas fueron, en edad A, S1: (media±error standard) 9.1±0.4; S2: 7.0±0.2[#]; S3: 3.2±0.2[#] y en edad B, S1: 9.6x±1.3; S2: 7.9±1.2; S3: 6.7±0.6^{*}. (*)=Significant (P<0.025) by ANOVA and Scheffe tests between age groups and from S1(#). El sistema demostró similares RAA para las dos edades y atenuación significativa para las dos intensidades de PP en animales inmaduros, pero sólo atenuación no significativa estadísticamente en adultos jóvenes.

324. (117) REDUCCIÓN DEL DAÑO CEREBRAL ISQUÉMICO EMPLEANDO UN DERIVADO MEJORADO DE ERITROPYETINA

Mattio, M.¹; Caltana, L.²; Ceaglio, N.¹; Oggero, M.¹; Kratje, R.¹; Etcheverrigaray, M.¹; Brusco, A.²
Laboratorio de Cultivos Celulares- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- UNL¹ Instituto de Biología Celular y Neurociencias- Facultad de Medicina- UBA²

Los accidentes cerebrovasculares son la tercera causa de muerte a nivel mundial. La restauración del flujo sanguíneo cerebral y la limitación del daño neuronal son los objetivos terapéuticos. De este modo, los efectos neuroprotectores que la eritropoyetina ha demostrado en diversos ensayos, impulsaron estrategias para su aplicación clínica. Dado que su acción hematópoyética constituye un factor indeseable, en nuestro laboratorio

se desarrolló una combinación de glicoisofomas de eritropoyetina recombinante humana (rhEPO) con actividad hematopoyética prácticamente nula, denominada neuroepoetin (rhNEPO). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto neuroprotector de rhEPO y rhNEPO en un modelo de isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media en ratones Balb/c. Transcurridos 15 minutos de dicho procedimiento, los animales recibieron una dosis de 39,5 µg/kg de las variantes de rhEPO o del vehículo, continuando luego con dosis diarias hasta el día previo al sacrificio. Para evaluar el daño, se midió el índice de déficit neurológico. El día 7 post lesión los animales se fijaron y los cortes de cerebros se procesaron para analizar la respuesta glial (GFAP) y neuronal (MAP-2 y NF-200) por inmunohistoquímica. Los animales que recibieron ambas variantes de rhEPO mostraron un mejor estado neurológico luego del daño ocasionado respecto a los animales que sólo recibieron el vehículo. A nivel morfológico, se pudo observar que la astrogliosis reactiva no se modificó luego de los tratamientos con rhEPO o rhNEPO, pero sí se observó un aumento de la expresión de MAP2 y NF-200. Estos resultados indicarían que los tratamientos con rhEPO y rhNEPO permiten una recuperación de la arborización dendrítica y una preservación de la estructura neuronal, las cuales fueron significativamente reducidas en los animales que recibieron sólo vehículo. Estas evidencias presentan a la rhNEPO como un potencial candidato terapéutico para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares.

325. (172) DOSIS TÓXICAS DE PARACETAMOL INDUCEN LA MUERTE DE CÉLULAS PRECURSORAS DE OLIGODENDROCITOS EN UN CULTIVO PRIMARIO MIXTO DE CÉLULAS GLIALES E IN VIVO

Peréz, M.¹; Tallis, S.²; Novak, A.²; Delfante, A.²; Rubio, M.³; Ghanem, C.⁴

Instituto de Química y Físicoquímica Biológica, IQUIFIB-CONICET¹ Cátedra de Fisiopatología, FFyB. UBA.² Instituto de Investigaciones Farmacológicas, ININFA-CONICET.³ Cátedra de Fisiopatología, FFyB. UBA.-Instituto de Investigaciones Farmacológicas, ININFA-CONICET.⁴

El daño cerebral asociado a la sobredosis de paracetamol (P) se ha adjudicado a una encefalopatía hepática, secundaria a la insuficiencia hepática, por lo cual sus efectos directos han sido escasamente estudiados. Objetivo: Estudiar el efecto de una dosis tóxica de P sobre la viabilidad de células cultivo mixto de células gliales y el efecto de una dosis tóxica sobre células precursoras de oligodendrocitos (CPO) *in vivo*. Materiales y métodos: *In vitro*: cultivos primarios de células gliales mixtas se obtuvieron según McCarthy y Vellis de (1980). Las células fueron tratadas con vehículo (DMSO) o P (1 y 20 mM). Después de 48 h la viabilidad celular se evaluó por el ensayo de MTT, la expresión del marcador (PDGFR-alfa) para la marcación específica de CPO se evaluó a través de Western-Blot (WB) e inmunocitoquímica *in vitro*. *In vivo*: Ratas Wistar macho (250-300 g) fueron inyectadas con una dosis tóxica de P (1g/kg). Se estudio la expresión de PDGFR-alfa en homogenato cerebral. Resultados: La dosis de 1 mM de P no modifica la viabilidad celular mientras que la dosis de 20 mM disminuye en un 40% la viabilidad celular (P<0.001). La dosis de 1mM produce la muerte de 25% (p<0.05) de las células PDGFR-alpha positivas y la de 20 mM del 90% de los CPO presentes en el cultivo. El WB realizado sobre proteínas totales obtenidas de los cultivos muestra una disminución del 25% y del 89% para las dosis de 1 y 20 mM respectivamente del marcador PDGFR-alpha (P<0.05). La administración de dosis tóxicas de P en ratas producen una disminución del contenido cerebral en 74% PDGFR-alpha, marcador específico de CPO, en comparación con las ratas controles (p<0.05). Conclusión: Estos resultados demuestran que el P produce efectos tóxicos directos per se, sobre las células gliales caracterizados por la muerte dosis dependiente de los CPO, independientemente de la función hepática y que este efecto se observa tanto *in vitro* como *in vivo*.

326. (180) LA ASTROGLÍA EN EL PERIODO PRESINTOMÁTICO DE UN MODELO DE DEGENERACIÓN DE MOTONEURONA, EL RATÓN WOBBLER

Meyer, M.¹; González Denisse, M.^{1,2}; Gargiulo-Monachelli, G.^{1,3}; Lima, A.¹; Roig, P.¹; De Nicola, A.^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Departamento de Bioquímica Humana Facultad de Medicina (UBA)² Hospital Fernández³

La astrogliosis que ocurre en todos los estadios de la degeneración de motoneurona del Wobbler (Wr) podría ser un evento tanto primario como secundario de la enfermedad. Los astrocitos patológicos dañan a las neuronas, y a su vez, las neuronas en degeneración aumentan la astrogliosis, estableciéndose un círculo vicioso. Investigamos la astrogliosis en el periodo presintomático (PPS postnatal) previa a la aparición de patología neuronal, mediante el análisis de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y la enzima glutamina sintetasa (GS) en la médula cervical (MC) en Wr y controles (Ctl). Se emplearon Wr genotipificados de 6 días en PPS y sus Ctl. Se estudió el número de células GFAP+/área en el asta anterior de la médula espinal mediante inmunofluorescencia y el procesador ImageJ. Los resultados demostraron astrogliosis en Wr(399.2±77.19) vs. Ctl(115.5±41.10) p< 0,01. La densidad de células GS+ en sustancia gris de la MC estudiadas por inmunofluorescencia, fue significativamente menor en Wr(369.9±17.51) vs. Ctl(539.8±37.14) p<0,001. Mediante inmunofluorescencia doble y microscopía confocal estudiamos el número de células GS+/GFAP+. El Ctl presenta >% de células colocalizadas con respecto al Wr (Ctl 324.9±28.34 vs. Wr 247.9±13.65) p<0,01 si tomamos al 100% de población a las células GFAP+. Por el otro lado, si tomamos como el 100% a la población de células GS+, el Ctl presenta un <% de células colocalizadas GFAP+/GS+ con respecto al Wr (Ctl 101.3±13.36 vs. Wr 178.2±10.86) p<0,001. Estos resultados nos estarían indicando que los controles tienen > número de células colocalizadas con < número de células GFAP+, o sea que en Ctl los astrocitos GFAP+ serían GS+. Si lo analizamos desde el lado del Wr, éste tendría un < número de células colocalizadas con un >número de astrocitos GFAP+, sugiriendo que el WR expresa una población minoritaria GFAP+/GS+ y otra mayoritaria GFAP+/GS-, estando la última impedida de detoxificar glutamato para convertirlo en glutamina.

327. (192) PLASTICIDAD DE RECEPTORES DE GABA EN LINFOCITOS

Dionisio, L.; Bouzat, C. ; Esandi, M.

INIBIBB-CONICET, Universidad Nacional del Sur

La propiedad de los receptores neuronales de modificar su composición frente a diferentes estímulos se denomina plasticidad. Previamente hemos descrito la presencia de receptores ionotrópicos de GABA en linfocitos humanos. En este trabajo evaluamos si el fenómeno de plasticidad ocurre también para los receptores presentes en células inmunes. Para inducir plasticidad, se incubaron células Jurkat con 100 µM GABA y luego se determinó, mediante RT-qPCR, el nivel de expresión de subunidades de GABA. Mientras que la expresión de $\alpha 1$, $\beta 3$, $\gamma 2$ aumentó y disminuyó luego de 15 y 40 hs de incubación respectivamente, la expresión de δ no se modificó. El aumento de ARNm de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 3$ se correlacionó con un aumento de las correspondientes proteínas determinado por Western Blot. Luego se evaluó la activación de la vía de Akt, involucrada en la fosforilación de subunidades β y translocación de receptores a membrana. Se observó aumento de Akt activada y una mayor expresión en membrana de la subunidad $\beta 3$ a las 15 hs de incubación. Coincidentemente, utilizando la técnica de patch clamp se detectó un mayor porcentaje de células que responden a la aplicación de GABA luego de 15 hs de incubación. De 50 células evaluadas por condición, el 6, 21 y 8% exhibieron corrientes macroscópicas luego de 0, 15 y 40 hs de exposición a GABA respectivamente. Por último, evaluamos otros estímulos como la exposición a progesterona (0,1 µM) e insulina (0,5 µM). Detectamos una disminución del ARNm de la subunidad δ a las 15 hs de exposición con progesterona, mientras que con insulina observamos mayor expresión en membrana de la subunidad $\beta 3$, luego de 15 min de exposición. Estos resultados coinciden con los descritos en neuronas frente a los mismos estímulos. Concluimos que los receptores

de GABA presentes en células inmunes exhiben el fenómeno de plasticidad. Esta propiedad podría ser importante para el desarrollo de nuevos blancos de modulación farmacológica de la respuesta inmune

328. (222) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA A ANFETAMINA SOBRE RESPUESTAS CONDUCTUALES, FISIOLÓGICAS Y NEUROQUÍMICAS INDUCIDAS POR ANGIOTENSINA II ICV

Casarsa, B.¹; Marchese, N.²; Marinzalda, M.¹; Baiardi, G.¹; Bregonzio, C.²

Lab. Neurofarmacología, FCQ, Universidad Católica de Córdoba-CONICET¹ Dep. Farmacología, FCQ, Universidad Nacional de Córdoba, IFEC-CONICET²

Las acciones de Ang II (Angiotensina II) cerebral están mediadas principalmente por la estimulación de los R-AT1 (Receptor tipo 1 de Ang II). Existen numerosas evidencias sustentando un rol clave del SRA (Sistema Renina Angiotensina) cerebral en el funcionamiento normal (consolidación de la memoria, etc) y en patologías cerebrales (demencia, etc), proponiendo así el uso de bloqueantes de los R-AT1 e inhibidores de la enzima convertidora de Ang I como potenciales herramientas terapéuticas. Por otro lado la activación del SRA por depleción de sodio, presenta sensibilización cruzada con Anfetamina (ANF). Nuestro objetivo fue estudiar las respuestas conductuales, fisiológicas y neuroquímicas a Ang II intracerebral en animales tratados con ANF y bloqueante de los R-AT1 (Candesartán). Se usaron ratas Wistar macho (250-320g), pretratadas con Candesartán (3mg/kg v.o)/vehículo por 10 días. Inyectamos ANF (2.5mg/kg i.p)/salina del día 5 al 10. El día 10 o 26, se colocaron las cánulas icv. El día del experimento (día 18 o 32), recibieron salina icv. y 24 hs después Ang II (4nmol/4ul icv.), inmediatamente se realizaron las pruebas de Apetito al Sodio (libre elección agua y NaCl 2%), Plus Maze y posteriormente inmunomarcación de c-fos en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa. Resultados: El pretratamiento con ANF disminuyó el Apetito al Sodio inducido por Ang II icv., 7 y 21 días después de la exposición a ANF, el bloqueo AT1 revirtió esta respuesta a los 21 días. De igual manera la exposición a ANF redujo la reactividad neuronal inducida por Ang II icv., a los 7 días post-ANF. Por otro lado en el test de Plus Maze se observó un efecto ansiolítico duradero en el tiempo en el grupo Candesartán-ANF (tanto a los 7 como a los 21 días). Concluimos que la exposición repetida al psicoestimulante induce cambios neuroadaptativos sobre el SRA cerebral, que se evidencian hasta 21 días post-ANF.

329. (240) REGULACIÓN DE ANSIEDAD Y RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES Y MINERALOCORTICOIDES EN HIPOCAMPO EN UN MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TIANEPTINA

Trujillo, V. ; Durando, P. ; Suárez, M.

Cátedra de Fisiología Animal - Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales - U.N.C.

Los receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) están involucrados en la fisiopatología de los desórdenes relacionados al estrés, tales como ansiedad y depresión. El hipocampo expresa gran cantidad de GR y MR y es vulnerable a los efectos de las hormonas de estrés, a menudo elevadas en pacientes depresivos. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del tratamiento crónico con el antidepresivo tricíclico modificado tianeptina (10 mg/Kg) sobre los índices de ansiedad y la expresión de MR y GR en el hipocampo dorsal. Se utilizaron ratas derivadas de la cepa Wistar machos, separadas de la madre diariamente durante 4,5 hs en las primeras 3 semanas de vida y sometidas a un protocolo de estrés crónico variable a partir del día postnatal 50 y durante 24 días. Para conocer el nivel de ansiedad se realizó el test Plus Maze. Los niveles de GR y MR fueron determinados por inmunohistoquímica en las capas CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado del hipocampo dorsal. También se determinaron los niveles de corticosterona plasmática de los animales controles y estresados a fin de corroborar el impacto provocado por el estrés sobre estos animales. En los animales criados con la madre, el

estrés aumentó la corticosterona plasmática y también las células inmunoreactivas a GR y MR en hipocampo. Por otro lado, en los animales separados de la madre y estresados en la etapa adulta se observó una disminución de la inmunoreactividad a MR y a GR y un aumento de la ansiedad, mientras que tianeptina revirtió las alteraciones encontradas en la expresión de estos receptores y disminuyó el balance MR/GR. Nuestros resultados demuestran que los eventos de la vida temprana producen en el adulto alteraciones a nivel de los GR y MR hipocampales y de los niveles de ansiedad. En tanto el antidepresivo tianeptina atenúa esta desregulación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal.

330. (244) PUEDE EL TÉ DE HYPERICUM PERFORATUM (HIERBA DE SAN JUAN) REGULAR LOS NIVELES DE SEROTONINA EN UN MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN?

Devetak, M. ; Trujillo, V. ; Suárez, M.

Facultad de Cs.Ex.Fis. y Naturales UNC

Los estímulos estresantes cuando son crónicos pueden inducir a depresión. El papel del *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan) puede ser tan valioso como el de los antidepresivos convencionales porque inhiben la recaptación de Serotonina. El objetivo fue estudiar el efecto de tratamiento con la infusión de esta hierba (té) en ratas adultas sometidas a un modelo de depresión, sobre las neuronas inmunoreactivas a Serotonina en el Núcleo Dorsal del Rafe y la actividad neuronal del mismo. También se evaluará, índices de anhedonia, plasticidad sináptica a través de memoria y de aprendizaje y los índices de ansiedad. Se utilizaron ratas machos derivadas de la cepa Wistar, de 50 días de edad, que fueron sometidas al modelo de depresión por 24 días. Durante este lapso se les suministró extracto acuoso de la Hierba de San Juan (1g/Kg de Peso Corporal). Para calcular los índices de ansiedad, se realizó el test del laberinto en cruz elevada en estos animales. Los índices de anhedonia se evaluaron con la preferencia y consumo de sacarosa. El estudio de la memoria y aprendizaje fue realizado a través del test de evitación inhibitoria. El análisis de serotonina se logró por medio de la técnica de inmunohistoquímica, doble marca Fos-5HT. Los resultados demostraron que el estrés crónico, produjo una disminución de Serotonina en el Núcleo Dorsal del Rafe ($p < 0,05$). *Hypericum perforatum* actuó de manera esperada, llevando ese neurotransmisor a los niveles de los animales controles ($p < 0,05$). Por otro lado el estrés también produjo mayor índice de ansiedad ($p < 0,05$) pero esto no fue revertido con la infusión de té. El tratamiento con *Hypericum Perforatum* produjo una tendencia a aumentar la memoria a largo plazo en los animales estresados, sin observarse diferencias en los parámetros de anhedonia. En conclusión el té de Hierba de San Juan actuaría a nivel del sustrato neurobiológico, Núcleo Dorsal del Rafe, y produciría un efecto facilitador de la memoria a largo plazo.

331. (279) HMGB-1 Y LOS RECEPTORES TOLL-LIKE (TLR2 Y TLR4) PARTICIPAN EN LA GLIOSIS REACTIVA? EVIDENCIAS DE ESTUDIOS IN VITRO

Rosciszewski, G.¹; Lukin*, J.¹; Villarreal, A.¹; Angelo, F.¹; Thierry, R.²; Ramos, A.¹

Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof E de Robertis¹ Centre Hospitalier Unversitaire Vaudois, Switzerland²

La difusión de mediadores DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*) como HMGB-1 desde el tejido cerebral en degeneración produce una respuesta inflamatoria que incrementa la muerte neuronal. Los astrocitos reaccionan ante una injuria cerebral con una respuesta genérica de gliosis reactiva, que puede ser benéfica para la sobrevida neuronal o generar un entorno proinflamatorio neurodegenerativo. Para estudiar la participación de HMGB-1, TLR2 y TLR4 en la gliosis reactiva proinflamatoria, utilizamos cultivos primarios astrogiales puros o cultivos hipocampales mixtos (glia+neuronas) que fueron expuestos a privación de oxígeno y glucosa (OGD, modelo de isquemia in vitro) o recibieron HMGB-1 (500 ng/ml) respectivamente. Los astrocitos o células de glioma C6 fueron transfectados con plásmidos que inducen la sobreexpresión

de TLR2 y TLR4. HMGB-1 indujo la retracción de las proyecciones neuronales y la transformación de los astrocitos hacia un fenotipo fibrilar. La sobreexpresión de TLR2 o TLR4 en astrocitos expuestos a OGD no tuvo efectos significativos, aunque la coexpresión de TLR2 y TLR4 produjo una retracción de prolongaciones hacia un fenotipo glial poligonal. En condiciones control, la sobreexpresión de TLR2 indujo un aumento en la extensión de las prolongaciones gliales, resultados similares fueron obtenidos con el glioma C6. Nuestros resultados indican que la exposición de HMGB-1 induce en las neuronas hipocámpicas una pérdida de prolongaciones típica de los estadios iniciales de la neurodegeneración, que se acompaña de una gliosis reactiva demostrada por la conversión glial hacia el fenotipo estrellado. La sobreexpresión de TLR2 induce el alargamiento de las proyecciones gliales en cultivos control, mientras que en OGD la co-expresión de TLR2 y TLR4 induce una retracción de prolongaciones gliales, que indicaría su de-diferenciación hacia un fenotipo inmaduro. Subsidios: PICT 2008-1590, UBACYT, PIP CONICET. (*) GR y JL contribuyeron igualmente.

332. (661) BLANCOS MOLECULARES DE LA VÍA PI3K/AKT EN NEURONAS DE HIPOCAMPO SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO

Uranga, R.; Giusto, N.; Salvador, G.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca

La vía PI3K/Akt tiene un reconocido rol en la señalización intracelular involucrada en la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal. Los objetivos de este trabajo fueron: i) caracterizar un modelo de neurodegeneración inducido por Fe^{2+} , y ii) estudiar la participación de la vía PI3K/Akt y su relación con distintos blancos moleculares tales como GSK3 β y los factores de transcripción FoxO en los eventos disparados durante la injuria neuronal oxidativa. En este trabajo se utilizó la línea neuronal de hipocampo de ratón HT22, la cual fue expuesta a diferentes concentraciones de Fe^{2+} durante 24 h. Los niveles de especies reactivas de oxígeno (medidos con la sonda DCF) se vieron incrementados por la exposición al metal, de igual manera que los productos de peroxidación lipídica (cuantificados por TBARS). La morfología celular mostró alteraciones características del daño: cuerpo celular redondeado con disminución del número de proyecciones neuronales. Las enzimas antioxidantes presentaron un perfil diferencial frente al estrés oxidativo: los niveles de SOD1 disminuyeron, los de catalasa no mostraron cambio, y los de SOD2 y HO1 aumentaron. Simultáneamente, Akt y GSK3 β exhibieron un incremento en sus niveles de fosforilación. Además, se estudió en las fracciones nuclear y citosólica la presencia de las formas fosforiladas (inactivas) de FoxO3a y FoxO1, las cuales aumentaron de manera dependiente de PI3K en la fracción citosólica de las células tratadas con Fe^{2+} . Coincidentemente, el contenido de FoxO3a total disminuyó en la fracción nuclear. Asimismo, se observó la translocación nuclear de PI3K y Akt en respuesta al Fe^{2+} . Estos resultados demuestran que nuestras condiciones experimentales reproducen un modelo de estrés oxidativo incipiente inducido por Fe^{2+} en neuronas de hipocampo, y que en este modelo, la vía PI3K/Akt se activa, transloca al núcleo, y promueve la fosforilación, inactivación y exportación nuclear de FoxO3a/FoxO1.

333. (316) UN ANÁLOGO DE LA HORMONA ALFA-MELANOCITO ESTIMULANTE MODULA LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES NUCLEARES PPARs Y LA LIBERACIÓN DE TGF-B EN CÉLULAS GLIALES

Carniglia, L.; Durand, D.; Caruso, C.; Lasaga, M.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)

Numerosas patologías del sistema nervioso central cursan con un fuerte componente inflamatorio. Los astrocitos y la microglia son capaces de activarse e inducir la secreción de mediadores que participan de la respuesta inflamatoria y promueven su resolución. Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) han sido ampliamente asociados a la regulación de respuestas inflamatorias. La hormona alfa-melanocito estimulante (a-MSH) posee efectos inmunomoduladores y actúa en astrocitos a través de los receptores de melanocortinas (MCR) tipo 4.

Previamente hemos demostrado que el análogo de a-MSH [Nle⁴, D-Phe⁷]-a-MSH (NDP-MSH) ejerce efectos anti-inflamatorios en astrocitos vía MC4R. En este estudio evaluamos el efecto de NDP-MSH sobre la liberación de TGF-b, un factor neuroprotector, y sobre la expresión génica y proteica de PPAR-g y PPAR-b en cultivos primarios de astrocitos y microglia. NDP-MSH 0.1 mM incrementó los niveles de PPAR-g (100% en astrocitos $p < 0.05$; 400% en microglia $p < 0.05$) y redujo los niveles proteicos de PPAR-b (93% en astrocitos $p < 0.05$; 98% en microglia $p < 0.001$) sin modificar los niveles de ARNm de PPAR-g o PPAR-b en ambos tipos celulares. Los efectos de NDP-MSH sobre PPAR-b en microglia y sobre PPAR-g en astrocitos no se observaron al inhibir la vía de ERK-1/2, sugiriendo una posible participación de ERK-1/2 en los efectos de NDP-MSH. Por otro lado, NDP-MSH 0.1 mM aumentó la liberación de TGF-b en astrocitos (100% $p < 0.001$). Nuestros datos indican que NDP-MSH modula la expresión proteica de PPAR-g y PPAR-b de forma post-transcripcional y estimula la liberación de TGF-b en células gliales. Estos mecanismos podrían formar parte de las vías de acción responsables de los efectos anti-inflamatorios de las melanocortinas vía MC4R y aportan nuevas evidencias que sustentan la acción protectora de estos neuropéptidos y su potencialidad en el desarrollo de terapias orientadas a modular la inflamación a nivel central.

ENDOCRINOLOGIA 3

334. (111) LA EXPERIENCIA MATERNA COMO FACTOR MODULADOR DE LA ESTEROIDOGÉNESIS HIPOCÁMPICA

Rossetti, M.^{1,2}, Varayoud, J.¹, Muñoz-De-Toro, M.¹, Luque, E.¹, Ramos, J.^{1,2}

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, FBCB, UNL.¹ Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, FBCB, UNL.²

La experiencia reproductiva parece contribuir a un mejoramiento de la memoria y el aprendizaje, aunque poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares intervinientes. Particularmente, se han señalado propiedades neuroprotectoras y neurotróficas de algunas hormonas asociadas a los períodos de preñez y lactancia (prolactina, progesterona y estradiol). El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la experiencia reproductiva (multiparidad) sobre la expresión de las enzimas esteroideogénicas, los receptores de estrógenos alfa (RE α) y progesterona (RP) y los marcadores de plasticidad sináptica en el hipocampo de la rata hembra. Para ello se compararon ratas adultas de 15 meses de edad con 3 preñeces completas y sus respectivas lactancias (Hembras Multiparas: HM) frente a ratas vírgenes de la misma edad (HV). Los hipocámpos se disecaron y almacenaron a -80°C para posterior extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real. En el grupo HM, los niveles de ARNm correspondientes a las enzimas P450scc, P450arom, P450(β 11)-2 y 5 α -reductasa aumentaron significativamente con respecto al grupo control HV (HM vs HV; $p < 0.05$). En el mismo sentido, se detectó un aumento en la expresión de espinofilina en el grupo HM (HM vs HV; $p < 0.05$). Sin embargo, no se detectaron cambios en la expresión de los receptores ER α y PR (HM vs HV; $p > 0.05$). Estos resultados muestran que la experiencia reproductiva modifica la expresión de las enzimas esteroideogénicas y los marcadores de plasticidad sináptica en el hipocampo. Según nuestra hipótesis, la misma podría atenuar la caída en la expresión de las enzimas esteroideogénicas asociada a la edad, manteniendo niveles adecuados de síntesis de neuroesteroides favoreciendo la plasticidad neuronal hipocámpica.

335. (189) EL ANTIOXIDANTE N-ACETIL CISTEÍNA PREVIENE LOS EFECTOS DEL ARSÉNICO SOBRE LA VIABILIDAD Y LA LIBERACIÓN HORMONAL DE LAS CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS

Ronchetti, S., Nudler, S., Cabilla, J., Duvilanski, B.
INBIOMED (UBA-CONICET)

La exposición al arsénico inorgánico (iAs) es uno de los mayores problemas sanitarios a nivel mundial. En Argentina existen

grandes áreas endémicas de contaminación con este metaloide, afectando a casi el 7% de la población. Si bien se han reportado efectos adversos del iAs sobre la función reproductiva, poco se conoce de sus acciones sobre la liberación hormonal y la fisiología adenohipofisaria. Previamente hemos demostrado que el iAs 25 μ M reduce la liberación de prolactina y la viabilidad celular adenohipofisaria e induce un aumento temprano de las especies reactivas del oxígeno. Nuestro objetivo fue evaluar la temporalidad de estos efectos e investigar si los mismos involucran un proceso de estrés oxidativo en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata. La exposición al iAs 25 μ M disminuyó la viabilidad celular (actividad celular, técnica de MTT) a partir de las 9h de tratamiento (Abs. 600nm, % del control (C): 9h: 83.6 \pm 2.8*, 18h: 82.2 \pm 5.4*, 24h: 70.3 \pm 2.6***; *p<0.05; ***p<0.001 vs. C). Sin embargo, 6h fueron suficientes para reducir la liberación de prolactina (PRL) medida por radioinmunoensayo ([PRL] % del C: 6h: 53.6 \pm 4.3***; 9h: 44.7 \pm 3.2***; 18h: 27.6 \pm 2.8***; 24h: 25.1 \pm 2.9***; ***p<0.001vs.C). La preincubación con N-acetil cisteína (NAC) 2 mM previno parcialmente el efecto citotóxico del iAs evaluado mediante la tinción con anexina V-ioduro de propidio (células apoptóticas tempranas, % del C: iAs 234.9 \pm 13.3**; NAC+iAs: 180.5 \pm 5.3^*; *p<0.05; **p<0.01 vs. C; ^p<0.05 vs. iAs), mientras que previno totalmente el efecto inhibitorio del iAs sobre la liberación de PRL ([PRL] % del C: iAs: 50.6 \pm 6.1**; NAC+iAs: 90.9 \pm 7.5^*; **p<0.01vs.C; ^ p<0.01 vs. iAs). Estos resultados indican que la inducción de estrés oxidativo es uno de los mecanismos por los cuales el iAs afecta la fisiología adenohipofisaria. La disminución de la liberación de prolactina podría ser un signo temprano de daño celular o un efecto directo sobre la secreción de esta hormona.

336. (381) ESTUDIO DE LA VIA WNT EN MODELOS EXPERIMENTALES DE PROLACTINOMAS. ROL DE β -CATENINA

Demarchi, G.^{1,2}, Gazza, E.^{1,2}, Torres, M.^{1,2}, Becu-Villalobos, D.³, Cristina, C.^{1,2}

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires UNNOBA¹ Laboratorio de Fisiopatología de la Hipófisis CEBIO-UNNOBA² Laboratorio de Regulación Hipofisaria IBYME-CONICET³

En las células madre, progenitores multipotentes descriptos en tejidos adultos en condiciones fisiológicas y patológicas, la vía de señalización de Wnt se asocia a autorrenovación y diferenciación celular. Han sido descritas tres vías para este sistema: la vía Wnt/ β -catenina (canónica), Wnt/quinasa Jun N-terminal, Wnt-calcio y una cuarta vía involucrada en la miogénesis. La vía Wnt/ β -Catenina es la mejor caracterizada. Wnt estabiliza a β -Catenina en el citoplasma evitando su degradación, permitiendo su translocación al núcleo y acción como coactivador de la transcripción de genes diana (PITX2, ciclinaD1). Por otro lado β -Catenina es un componente de adhesión celular. Existen evidencias de señalización desregulada de Wnt en cáncer, pero en tumores hipofisarios los datos son limitados. Nos proponemos como objetivos caracterizar las vías Wnt de células madre en prolactinomas experimentales y relacionarla con β -catenina para determinar su función en el desarrollo, mantenimiento y proliferación de los tumores hipofisarios, secreción hormonal y/o adhesión celular. Se generaron prolactinomas experimentales administrando subcutáneamente Decanoato de Haloperidol (30mg/kg) y Cipionato de Estradiol (0,2mg/kg) una vez por semana durante 3 semanas en ratones hembra cepa C57 de dos meses de edad. El grupo control se inyectó con aceite de ricino. Se analizaron localización y expresión de β -catenina por Inmunohistoquímica en cortes histológicos de adenohipófisis, observándose un aumento de núcleos (P= 0,038) y una disminución de membranas (P= 0,043) β -catenina positivos sobre células totales en los grupos tratados respecto a sus controles (Estradiol y Haloperidol vs. Control N=3, 3 y 4 respectivamente). Por PCR en tiempo real se determinó el nivel de transcripción de β -catenina sin encontrarse diferencias significativas en los tratamientos vs. Control (P> 0,05), y de PITX2, que mostró un incremento no significativo en el grupo Estradiol vs. Control (P> 0,05). Concluimos que la

vía Wnt/ β -catenina participaría en el desarrollo y mantenimiento de prolactinomas experimentales

337. (431) EL EJERCICIO MODERADO PREVIENE CAMBIOS FUNCIONALES EN LA HIPÓFISIS DE RATAS CON INSULINO-RESISTENCIA (IR) INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN SACAROSA (DRS)

Mercau, M.^{1,2}, Giordanino, E.^{1,2}, Martínez Calejman, C.^{1,2}, Sanchez, R.^{1,2}, Arias, P.³, Cymeryng, C.^{1,2}

Universidad de Buenos Aires - Facultad de Medicina - CEFyBo CONICET¹ CEFyBo - CONICET² Cátedra de Fisiología Humana - Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario³

Demostremos previamente en animales con IR inducida por una DRS menor peso y tamaño de las glándulas adrenales, mayor corticosteronemia basal y disminución de la expresión del receptor MCR2 y de la respuesta a ACTH exógena, y que dichas alteraciones son corregidas por la realización de actividad física. En el presente trabajo nos propusimos estudiar los efectos de la alimentación con DRS y del ejercicio físico (EF) moderado sobre la función hipofisaria en ratas con IR. Ratas Wistar macho adultas recibieron sacarosa al 30% con el agua de bebida (DRS) o agua sin sacarosa (controles). La mitad de los animales de ambos grupos fue sometidos a EF moderado en cinta continua. Se evaluó la magnitud de la IR mediante una prueba de tolerancia a la insulina (PTI; 0.75 U/kg de insulina i.p.). Los animales fueron sacrificados en la semana 9, determinándose en homogenizados de adenohipófisis los niveles de Akt fosforilada, COX-2 y HO-1 por Western blot, y de los ARNm para PPAR γ y POMC por RT-PCR en tiempo real. Los animales alimentados con DRS mostraron menores niveles de Akt fosforilada (p<0.01 vs. Control, ANOVA + test de Tukey). En paralelo se observó un incremento en los niveles proteicos de HO-1 (p<0,05 vs. Control) sin cambios en los de COX-2, mientras que los niveles de ARNm de PPAR γ y POMC se encontraron significativamente disminuidos (p<0.05 vs. control, ANOVA). El EF normalizó los resultados de la PTI y revirtió las alteraciones observadas a nivel hipofisario en animales tratados con DRS. Los resultados obtenidos sugieren que en la hipófisis de los animales con IR se produce un aumento del estrés oxidativo que lleva a la inducción del sistema antioxidante de HO-1. En paralelo se inhibirían vías de proliferación y lipogénesis, con un posible impacto sobre la producción hormonal de la glándula. El EF moderado en animales con IR aumentó su insulinosensibilidad y previno la aparición de las alteraciones funcionales observadas a nivel hipofisario.

338. (708) EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS DE UNIÓN A TGF β LATENTE (LTBPS) EN HIPÓFISIS NORMALES Y TUMORALES. REGULACIÓN POR DOPAMINA Y ESTRÓGENOS

Recouvreur, M., Camilletti, M., Lapyckyj, L., Becú-Villalobos, D., Díaz-Torga, G.

IBYME-CONICET

Luego de su síntesis, TGF β 1 y su propéptido LAP se acoplan a las proteínas de unión a TGF β latente (LTBPs) responsables del correcto plegamiento y secreción de la citoquina y de la disponibilidad extracelular y activación de TGF β . Una vez secretado dentro de este complejo TGF β 1 permanece inactivo y acoplado a la matriz extracelular. El objetivo general de nuestro proyecto es encontrar terapias alternativas para prolactinomas resistentes a drogas dopaminérgicas. Al ser TGF β 1 un inhibidor de las funciones del lactotropro, proponemos al sistema TGF β 1 como blanco terapéutico para terapias alternativas en estos tumores. Con ese objetivo nos abocamos a caracterizar en detalle el sistema TGF β 1 local, en hipófisis normales y prolactinomas experimentales generados en ratones hembra deficientes de receptor dopaminérgico tipo 2 (Drd2^{-/-}). Como parte de ese objetivo general, en el presente trabajo describimos por primera vez en la literatura la expresión hipofisaria (por PCR en tiempo real) de las diferentes isoformas de LTBPs. Las 3 isoformas que unen TGF β 1 (LTBP1, 3 y 4) se encuentran expresadas en hipófisis, y presentan regu-

lación diferencial por dopamina y estrógenos. Encontramos que solo LTBP1 presentó una regulación dopaminérgica positiva. Su expresión se encontró disminuida en hipófisis *Drd2^{-/-}*, y fue inhibida frente a un tratamiento con sulpiride (10 mg/kg, 24hs, antagonista dopaminérgico) en hembras *Drd2^{+/+}*. Un tratamiento de 24hs con estradiol 0.1u g/kg (E2) disminuyó los niveles locales de ARNm de LTBP1 y 3 en ambos genotipos. La descripción de las LTBPs, y su regulación por dopamina y estrógenos nos ayudan a avanzar en la caracterización detallada del sistema TGFβ1 hipofisario en búsqueda de terapias alternativas para prolactinomas resistentes a dopaminérgicos. Con el apoyo de CONICET y ANPCYT.

339. (572) POSIBLE ROL INHIBITORIO DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO β SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR ADENOHIPOFISARIA

Pérez, P., Sabatino, M., Petiti, J., De Paul, A., Torres, A., Gutiérrez, S.

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. INICSA. Universidad Nacional de Córdoba

Considerando que el rol del REβ en el control proliferativo hipofisario no ha sido completamente esclarecido se propone analizar la expresión del REβ en células adenohipofisarias normales, en el desarrollo de un proceso hiperplásico/adenomatoso y en células tumorales GH3B6 y correlacionarla con la proliferación celular. Se utilizaron cultivos primarios adenohipofisarios de rata hembra Wistar y de la línea celular GH3B6. El modelo hiperplásico/adenomatoso fue obtenido en ratas implantadas con cápsulas de benzoato de estradiol por 20, 40 y 60d. Los REα y β fueron inmunomarcados y observados por microscopía confocal (MC) y su expresión cuantificada por citometría de flujo (CF) y Western Blot (WB). Además, se determinó la progresión del ciclo celular por CF. Análisis estadístico ANOVA-Tuckey. Por MC los REα y β fueron detectados en células adenohipofisarias normales, mientras que en GH3B6 se identificó el REα pero no el REβ. La cuantificación del subtipo β por CF determinó que el 16.6±2.2% de las células adenohipofisarias normales expresan REβ, disminuyendo significativamente durante el desarrollo hiperplásico/adenomatoso: a los 20d de estimulación estrogénica la población REβ+ fue del 10.7±2.2%, mientras que a partir de los 40d se observó una pérdida casi total en la expresión de este subtipo de RE (40d: 1±0.6; 60d: 2±0.6%). Sin embargo, la expresión del REα determinada por CF y WB no mostró variaciones en los diferentes tiempos de estímulo estrogénico analizados. El contenido de ADN reveló que en la población control el 1.57±0.1% se encontró en fase S/G2M, a los 20d se duplicó (3.45±0.3%), manteniéndose a los 40d y 60d de estimulación (2.86±0.3% y 2.43±0.3). Estos resultados indican que la glándula adenohipofisaria normal expresa ambos subtipos de RE y que la expresión del subtipo β cae significativamente durante el desarrollo tumoral, sugiriendo que el REβ podría ser un potencial inhibidor de la proliferación celular en esta glándula endocrina.

340. (666) ESTUDIO DE POSIBLES ACTIVADORES LOCALES DE TGFβ1 EN HIPÓFISIS NORMALES Y PROLACTINOMAS EXPERIMENTALES

Recouvreux, M., Camilletti, M., Lapyckyj, L., Becú-Villalobos, D., Díaz-Torga, G.
IBYME-CONICET

Los prolactinomas son tumores benignos que en general responden bien al tratamiento con drogas dopaminérgicas. Sin embargo el 20% presentan resistencia a ese tratamiento y al presente no existen terapias alternativas. Al ser TGFβ1 un inhibidor de las funciones del lactotrofo, proponemos al sistema TGFβ1 como blanco terapéutico para terapias alternativas en prolactinomas resistentes. Con ese objetivo nos abocamos, en primer lugar, a caracterizar el sistema TGFβ1 hipofisario y sus activadores locales en el modelo de prolactinoma causado por ausencia del receptor dopaminérgico D2 (ratones hembra *Drd2^{-/-}*). Luego de su síntesis TGFβ1 permanece inactivo acoplado a la matriz extracelular. La activación es un proceso finamente regulado. Los activadores son tejido-específicos y no han sido estudiados aún en hipófisis. En el presente trabajo estudiamos la expresión y regulación de posibles activadores locales de TGFβ1. Por PCR en tiempo

real encontramos disminuidos los niveles de ARNm de MMP2, MT1-MMP, trombospondina-1 (TSP1), integrina-β6 y caliceína en hipófisis *Drd2^{-/-}*, acorde a los menores niveles de TGFβ1, activo y total, encontrados en este genotipo. Por zimografía detectamos solo las formas inactivas de las MMPs, Pro-MMP2 y Pro-MMP9, en homogenatos de hipófisis normales (*Drd2^{+/+}*) y tumorales. Un tratamiento de 24hs con valerato de estradiol 0.1mg/kg (E2) redujo los niveles de ARNm de ambas integrinas y de MMP2, pero incrementó marcadamente los niveles de TSP1 y caliceína en ambos genotipos, en forma concomitante con un incremento de TGFβ1 activo. Los bajos niveles de MMPs se condicen con el hecho de que los prolactinomas son tumores benignos. Solo los niveles de TSP1 y caliceína correlacionaron con los niveles de TGFβ1 activo en ambos genotipos y frente a un estímulo con estrógenos. Por lo tanto, postulamos a estas dos proteínas como posibles activadores locales de TGFβ1. Con el apoyo de CONICET y ANPCYT.

341. (628) MOVILIZACIÓN DEL NICHOS DE CÉLULAS STEM/PROGENITORIAS RELACIONADO CON CAMBIOS DINÁMICOS DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS

Vaca, A.¹, Guido, C.¹, Sosa, L.¹, Petiti, J.¹, Alvarez-Villamarin, C.², Torres, A.¹

Centro de Microscopía Electrónica-Facultad de Ciencias Médicas-Universidad Nacional de Córdoba.¹ Escuela de Fisiología-Facultad de Medicina-Universidad de Santiago de Compostela, España.²

Las células adenohipofisarias están sometidas a ajustes dinámicos para responder a las demandas hormonales durante la adultez. El estrógeno ejerce acciones tróficas sobre hipófisis siendo uno de los responsables del incremento del número de lactotropas en preñez y lactancia. Esta evidencia permite hipotetizar que el turnover hipofisario que ocurre fisiológicamente, podría producirse por reclutamiento y diferenciación de células stem/progenitoras (CS). El objetivo de este trabajo fue evaluar posibles cambios de marcadores asociados a células en diferentes estadios de diferenciación: stem (*Sox2*, *Oct-4*), progenitoras (*GFRa2*), comprometidas a un linaje (*Sox9*) o diferenciadas (*PROP-1* y *pit-1*) al término de la preñez y en lactancia activa. Se utilizaron hipófisis de ratas hembras Wistar: A término de la preñez (AT), día cero de lactancia (D0L) y día cuatro de lactancia (D4L). Las variaciones de los niveles de ARNm de los marcadores mencionados fueron evaluadas mediante qRT-PCR. La expresión de *Sox2*, *Oct-4*, *GFRa2* y *Sox9* fue cuantificada por inmunomarcación ultraestructural utilizando Image J. Estadística: ANOVA-Tukey o T-test. Los niveles del ARNm de *Sox2* mostraron un ligero incremento en D4L, siendo significativamente superiores los correspondientes a *PROP-1* y *pit-1* ($p < 0.05$) comparados con AT. Sin embargo, los niveles del ARNm de *GFRa2* en D4L disminuyeron con respecto a AT ($p < 0.01$). La expresión de *Sox2* y *Oct-4* mostró un aumento ($p < 0.01$) durante D4L con respecto a AT y D0L, mientras que la observada para *Sox9* fue más elevada ($p < 0.05$) en D0L comparado con D4L y AT. La expresión de *GFRa2* disminuyó ($p < 0.01$) en D0L y D4L comparado con AT. Las variaciones observadas en los marcadores cuantificados serían indicativas de la movilización del nicho de CS. Estas células manifestarían divisiones sucesivas dando origen a poblaciones celulares en distintos estadios de diferenciación, participando activamente en el recambio dinámico de la población de células adenohipofisarias.

342. (336) AUTOINMUNIDAD TIROIDEA EN LA MUJER EN EDAD FÉRTIL

Melillo, C.¹², Prener, P.¹³, Cabral, A.¹⁴, Suescun, M.¹⁴
Cátedra de Endocrinología .Facultad de Ciencias Exactas. UNLP¹ Instituto Médico Mater Dei, La Plata² Laboratorio Central Hospital San Juan de Dios, La Plata³ Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, IMBICE⁴

Varios estudios demuestran que la autoinmunidad y la disfunción tiroidea se relacionan con las complicaciones obstétricas de la mujer en edad fértil. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la eventual asociación entre autoanticuerpos (aa) y perfil tiroideo

en una población de mujeres eutiroideas e hipotiroideas y su posible relación con abortos espontáneos, nacimiento pretérmino y subfertilidad. Se reclutaron pacientes eutiroideas con aa positivos (EP, n: 280), aa negativos (EN, n: 250) y un grupo de 200 hipotiroideas en tratamiento con Levotiroxina sódica (H); con edades comprendidas entre 20 y 40 años. Se determinaron los niveles séricos de Tirotrófina (TSH), Tiroxina libre (T4L), aa anti-tiroperoxidasa (a-TPO) y anti-tiroglobulina (a-TG) por Quimioluminiscencia (Acces-Beckman y DPC-Immunit). La TSH promedio fue significativamente mayor en EP respecto de EN y H ($X \pm ES$; EP: 3.10 ± 0.74 , EN: 1.23 ± 0.55 y H: 2.40 ± 0.70 $\mu\text{UI/mL}$, $p < 0.05$). Sin embargo los valores medios de T4L no mostraron diferencias significativas. En EP y H se documentó mayor frecuencia de abortos y nacimientos pre-término que en EN (18% y 7% vs 3%; 26% y 15% vs 5% respectivamente). La mayor frecuencia de abortos se observó en las pacientes con títulos de aa significativamente más elevados y valores de TSH en la mitad superior del rango de referencia (2.50-4.50 $\mu\text{UI/mL}$). La tasa de embarazos espontáneos fue 35% en EN, 15% en EP y 20% en H. Los resultados indican una estrecha relación entre aa tiroideos, subfertilidad y complicaciones obstétricas, sugiriendo la participación de los aa tiroideos como predictores de disfunción tiroidea y el rol potencial protector del tratamiento sustitutivo en estas pacientes.

- 343. (115) ROL DE LOS MICRORNAS (MIRS) EN LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA FUNCIÓN TIROIDEA**
Salvarredi, L.¹, Rossich, L.³, Thomasz, L.¹, Pisarev, M.²³, Fusco, A.⁴, Juvenal, G.¹³
Comisión Nacional de Energía Atómica¹ FACULTAD DE MEDICINA-UBA² CONICET³ Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale-CNR, Nápoles, Italia⁴

Introducción: El yodo es utilizado por la glándula tiroides para sintetizar hormonas tiroideas pero además cumple un rol regulatorio a través de la síntesis de lípidos iodados como el 2-iodohexadecanal (2-IHDA). Los miRs son una clase de RNAs no codificantes involucrados en procesos celulares como la proliferación celular, el desarrollo y la apoptosis. **Objetivo:** Investigar el rol de los miRs como mediadores del efecto del 2-IHDA sobre el crecimiento tiroideo **Metodología y Resultados:** Líneas celulares FRTL-5 fueron tratadas con concentraciones crecientes de 2-IHDA o KI en presencia de TSH durante 24h. Se realizó el análisis de expresión de miRs mediante el uso de microarray. La incubación de 2-IHDA 5 μM resultó en la expresión diferencial de 20 miRs respecto al control ($p < 0.05$). A partir de una selección de miRs asociados a la regulación del crecimiento celular se propuso a let-7f como un potencial mediador. El incremento de let-7f se validó por qPCR (3.27 veces) y el análisis funcional se hizo sobreexpresando let-7f mediante la transfección con miRNA mimics. Se observó una inhibición del 25,2% y del 23% ($p < 0.05$) sobre la proliferación celular luego de 48 y 72hs del tratamiento respectivamente. In vivo se determinó la expresión de let-7f en ensayos de prevención de bocio usando ratas Wistar tratadas 10 días con MMI, MMI+2-IHDA. Se detectó una disminución de 3.71 veces en el tratamiento con MMI y el 2-IHDA revirtió parcialmente este efecto correlacionándose con el peso glandular (1.69) veces. A partir de biopsias humanas de Bocio Multinodular (BMN), Carcinoma Papilar (CP) y metástasis (Me) se cuantificó la expresión de let-7f. El miR se encontró 3 y 5 veces disminuido en BMN y Me respectivamente mientras que en CP los resultados fueron dispares. **Conclusiones:** Let-7f constituye un posible mediador del 2-IHDA sobre la inhibición de la proliferación celular tanto in vitro como in vivo. Asimismo es un potencial marcador de desdiferenciación en tumores tiroideos.

- 344. (511) EL HIPERTIROIDISMO INDUCE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS MODULADORES (NCOR Y RXR) DE LOS RECEPTORES TIROIDEOS EN HIPOTÁLAMO MEDIO BASAL DE RATAS EN GESTACIÓN Y LACTANCIA TEMPRANA**
Pennacchio, G.¹, Ayala, C.², Soaje, M.¹², Carreño, N.¹, Jahn, G.¹, Valdez, S.¹³

IMBECU- CCT-CONICET Mendoza¹ UNCUYO Facultad de Ciencias Médicas² ICB Instituto de Ciencias Básicas UNCUYO³

El Hipertiroidismo (HiperT) ocasiona luteólisis y parto precoz al final de la gestación de la rata y lactancia deficiente. También induce adelantos en la secreción de PRL sérica y en la caída de tiroxina hidroxilasa, expresión disminuida del ARNm del receptor (R) tiroideo (RT) $\beta 1$ y modulación diferencial de los R de progesterona (P) y estradiol al final de la gestación. Los RTs forman heterodímeros con los RX retinoides (RXR) favoreciendo la unión de T_3 al receptor, disminuyendo su afinidad por coreceptores y aumentándola por los coactivadores. Por otro lado, NCoR (nuclear receptor CoR) silencia la actividad basal de los RTs en ausencia de ligando. Continuando con el estudio de los mecanismos hipotalámicos por los que el HiperT afecta la secreción de PRL determinamos la expresión del ARNm (PCR en tiempo real respecto al gen S16) de los moduladores NCoR y RXR alfa y gama en hipotálamo medio basal de ratas controles e HiperT al final de la gestación y en lactancia temprana. Se trataron ratas Wistar con T_4 0.25 mg/kg/día s.c. (HiperT) o vehículo (Co) hasta el sacrificio en días 20, 21 de gestación (G20 y G21) y 2 de lactancia (L2) a las 12 h (n=6-8). Los resultados se correlacionaron con PRL y P séricas (medidas por RIA) y con la expresión de los RTs. En las ratas Co no hubo cambio en la expresión de NCoR mientras que en las HiperT se detectó un aumento ($p < 0.05$) en L2 vs G20 y 21. La expresión de RXRalfa en las Co disminuyó en G21 ($p < 0.01$) mientras que en las HiperT la expresión cayó en G20 ($p < 0.01$) y volvió a aumentar en L2 ($p < 0.01$). El RXRgama mostró un patrón de expresión similar a la isoforma alfa. En conclusión, el HiperT adelanta la disminución de la expresión de RXR alfa y gama concomitantemente con la caída de RT $\beta 1$, por lo que estos cambios podrían relacionarse con la caída precoz de P; Mientras que en el posparto los niveles elevados de los moduladores podrían estar interfiriendo con la señalización de PRL y el feedback corto que regula su secreción.

- 345. (802) LAS HORMONAS TIROIDAS Y LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO α DESREGULAN EL CRECIMIENTO CELULAR EN UN MODELO DE INDUCCIÓN-PROMOCIÓN HEPÁTICO DE RATAS TRATADAS CON HEXACLOROBENCENO**
Romero Caimi, G.¹, Chiappini, F.⁴, Pontillo, C.⁴, Randi, A.¹⁴, Castilla, R.³⁴, Burgos, I.¹⁴, Obregon, M.², Kleiman De Pisarev, D.¹⁴, Alvarez, L.¹
Facultad de Medicina, UBA¹ Universidad Autónoma de Madrid, España² Instituto Taquini, UBA³ Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas⁴

La desregulación de la homeostasis de las hormonas tiroideas (HT) es un proceso importante en el inicio de las transformaciones neoplásicas. El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida y es promotor tumoral hepático en ratas. El TGF- $\beta 1$ regula el crecimiento hepático y la expresión de la deiodinasa tipo III (DIII) en varios tejidos. La T_3 regula la expresión de los receptores de estrógenos alfa ($RE\alpha$). Hemos demostrado que el HCB altera las HT e induce proliferación celular y la apoptosis en hígado normal de rata. Altera los niveles de mRNA de TGF- $\beta 1$ y los de p-ERK $\frac{1}{2}$ en hígado de rata normal e inducido. Estudiaremos: 1-En un modelo de iniciación-promoción en hígado de rata, [dietilnitrosamina (DEN) (50mg/kg) y HCB(100mg/kg de p.c.)] el efecto del HCB sobre: a) la homeostasis de las HT; b) los niveles proteicos del $RE\alpha$; c) la anatomía vascular hepática. 2-En células Hep-G2, si la quinasa ERK1/2 está involucrada en el aumento de la proliferación celular generada por el HCB (5, 50, 500 y 5000 nM). Se evaluaron: Niveles proteicos de PCNA, TGF- $\beta 1$, $RE\alpha$, ERK $\frac{1}{2}$ fosforilado y total (Western blot); expresión de ARNm de TGF- $\beta 1$, DI y DIII (RT-PCR); niveles tisulares de HT (RIA) y morfología hepática, vasculatura portal y centrolobulillar (inmunohistoquímica). Se observó en el grupo (DEN+HCB) vs. DEN: PCNA incrementó 60% ($p \leq 0,001$), TGF- β 50% ($p \leq 0,01$) y p-ERK $\frac{1}{2}$ 46% ($p \leq 0,001$). T_4 aumentó 38% ($p \leq 0,01$) y T_3 disminuyó 37% ($p \leq 0,01$). El mRNA de DIII aumentó 30% ($p \leq 0,01$) y DI disminuyó 41% ($p \leq 0,01$). Los

niveles proteicos de RE α disminuyeron 38% ($p \leq 0,05$). En los cortes histológicos aumentó la vasodilatación centrolobulillar y la hiperplasia portal. En Hep-G2, PCNA y p-ERK 1/2 aumentaron en función de la dosis. Conclusión: El TGF- β 1, DIII y los RE α estarían involucrados en el aumento de la proliferación celular en el modelo de inducción-promoción. ERK 1/2 mediaría el aumento de la proliferación celular inducido por HCB en las células Hep-G2.

346. (166) EL 2-iodohexadecanal modula negativamente a NIS a través de los PPARs

Rossich, L.¹, Nazar, M.², Thomasz, L.¹, Salvarredi, L.¹, Nicola, J.², Pisarev, M.¹³, Masini-Repiso, A.¹, Juvenal, G.¹
Comisión Nacional de Energía Atómica¹ Depto de Bqca Clínica - Facultad de Ciencias Qcas - Universidad Nacional de Córdoba² Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires³

Introducción: La tiroides capta yodo para sintetizar hormonas tiroideas, el cual además cumple un rol autoregulatorio a través de la síntesis de lípidos iodados. De estos se han identificado dos: la 6-iodo-lactona y el 2-iodo-hexadecanal (2-IHD). **Objetivo:** Determinar y comparar el efecto del yodo y del 2-IHD y sus posibles intermediarios en la regulación de la expresión y actividad de NIS. **Metodología y Resultados:** Se realizaron ensayos de captación de ¹²⁵I sobre células FRTL-5. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de KI o 2-IHD, en presencia de TSH. Se observó que ambos disminuyen la captación del halógeno. Los datos obtenidos fueron correlacionados con ensayos de WB para el gen NIS. Se observó que ambos modularon negativamente la síntesis de NIS. Se extrajo ARN total de células FRTL-5 que fueron tratadas con dosis crecientes de KI, 2-IHD, durante 24 hrs. en presencia de TSH y se realizó PCR cuantitativa. Se observó una regulación negativa sobre la expresión de los genes tiroideos NIS, PAX8, FOXE1 y positiva la expresión de TTF-1 por parte de los dos compuestos confirmando mediante transfección de plásmidos conteniendo regiones promotoras de NIS, TTF-1, TTF-2 y Pax-8. Se observaron diferencias entre las construcciones de NIS que contienen la región promotora más el potenciador vs el potenciador únicamente. Análisis informáticos llevados a cabo con el programa PROMO 3.0 permitieron identificar que la construcción del potenciador de NIS no contiene un posible sitio de unión de PPAR. Por tanto se utilizaron plásmidos reporteros de actividad de los tres PPAR conocidos (α , β y γ); siendo activados por el KI y el 2-IHD sólo PPAR α y PPAR γ . Se determinó que agonistas para ambos PPAR (fenofibrato y rosiglitazona) mimetizan los efectos del KI y del 2-IHD sobre los parámetros antes mencionados. **Conclusión:** El 2-IHD modulando la actividad de los PPARs es un posible intermediario del yodo en el mecanismo autorregulatorio de la tiroides.

INMUNOLOGÍA INNATA E INFLAMACIÓN 2

347. (17) OPTIMIZACIÓN DE TAQMAN REAL TIME RT-PCR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL EN CÉLULAS BOVINAS

Marín, M.², Pérez, S.², Quintana, S.³, Leunda, M.¹, Odeón, A.¹
Laboratorio de Virología, Grupo Sanidad Animal, INTA EEA Balcarce¹, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas², Fares Taie Instituto de Análisis³

Dada la importancia de los receptores tipo toll (TLRs) en la defensa innata del huésped, existe una necesidad creciente de optimizar las técnicas para cuantificar su expresión. El objetivo de este trabajo fue desarrollar ensayos de expresión génica de TLRs bovinos mediante Taqman Real Time RT-PCR. Inicialmente se optimizó la extracción de ARN total con Trizol a partir de células blancas sanguíneas (linfocitos 86%, neutrófilos 12%, monocitos 2%) y distintos sectores de sistema nervioso (cerebro, cerebelo, médula oblonga y ganglio trigémino) de 6 bovinos clínicamente sanos y de la línea celular de riñón bovino MDBK. El ARN extraído fue digerido con DNasa I y se sintetizó ADNc a partir de 1 μ g de ARN. Se diseñaron cebadores y sondas para los TLR3, 7, 8

y 9 bovinos utilizando el software Primer Premier y se analizaron su especificidad *In Silico* y las características termodinámicas mediante programas bioinformáticos. Para las ampliificaciones se emplearon 800 nM de cebadores específicos, 200 nM de sonda, 1x Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems) y 1 μ l de ADNc. Se efectuaron curvas estándares para cada gen determinándose que la eficiencia de amplificación se encontraba dentro de los parámetros recomendados para realizar estudios de expresión génica. Mediante esta técnica se logró detectar la expresión de los cuatro TLRs bovinos estudiados en células blancas sanguíneas y en los distintos sectores de sistema nervioso analizados. Por el contrario, como en otras líneas celulares establecidas, las células MDBK no expresaron dichos receptores. Para corroborar la ausencia de inhibidores en la reacción de PCR se determinó paralelamente en todas las muestras la expresión del gen endógeno GAPDH. Estas nuevas herramientas moleculares serán de utilidad para el estudio de los perfiles de expresión génica de TLRs en distintos tejidos bovinos y bajo distintas condiciones fisiológicas, contribuyendo al conocimiento de la inmunidad innata contra las enfermedades del ganado.

348. (509) ANÁLISIS DE LA RESPUESTA FUNCIONAL FRENTE A AGONISTAS TLR EN DISTINTAS REGIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO

Errea, A., González Maciel, D., Hiriart, Y., Rumbo, M.
LISIN- Laboratorio de Investigación del Sistema Inmune

Los receptores TLR son claves para la orquestación de la respuesta inmune en la mucosa respiratoria. Sin embargo aún no está claramente dilucidado en qué forma distintas regiones del tracto respiratorio responden a la presencia de sus respectivos agonistas. El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta desencadenada *in vivo* por la activación de TLR-3, TLR-4 y TLR-5 en distintas localizaciones de las vías aéreas. Para ello, ratones Balb/c recibieron por vía intranasal 1 μ g de LPS, 1 μ g de flagelina y 50 μ g de Poly IC. La respuesta de tráquea, pulmón, epitelio bronquial y bronquiolar y parénquima pulmonar obtenidos por microscopía de disección láser fue evaluada por determinación de los niveles de expresión de IL-6, CXCL1, CXCL2 y CXCL10 mediante qPCR. A las 2 hs post-tratamiento la expresión de los distintos marcadores aumentó en todas las regiones analizadas (entre 35 y 1200 veces de incremento relativo IR), con diferencias de intensidad y perfil de respuesta según la región y el agonista considerado. Tanto para Poly IC como para LPS y flagelina los niveles de inducción en tráquea para todos los marcadores fueron significativamente menores respecto a los pulmonares ($p < 0,05$). A pesar de una menor exposición a los agonistas, la respuesta bronquiolar fue mayor a la de los bronquios principales para todos los agonistas y marcadores, excepto para IL-6. Los niveles de inducción en parénquima pulmonar fueron comparables a los bronquiolares con ciertas variaciones de acuerdo al marcador analizado. Todos los agonistas indujeron el reclutamiento de neutrófilos al espacio bronquioalveolar dentro de las 24h post-tratamiento ($p < 0,05$). Los resultados encontrados señalan la existencia de diferencias en las respuestas establecidas en distintas regiones dependiendo del agonista en cuestión. Este tipo de estudios resulta de interés para la elección de estrategias vacunales que empleen agonistas TLR como agentes adyuvantes por vía intranasal.

349. (151) OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA CULTIVOS PRIMARIOS DE ENTEROCITOS MURINOS

Di Claudio, F.¹, Orsini Delgado, M.¹, Grigera, J.², Muglia, C.¹, Docena, G.¹
Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune¹, Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos²

El epitelio intestinal es un sistema altamente dinámico, de gran interés para estudios de toxicidad, patogenicidad, respuesta intracelular a diferentes estímulos, inflamación, etc. Sin embargo, en general las células epiteliales que se emplean para estudios *in vitro* son líneas que se obtienen a partir de células tumorales. En el presente trabajo se optimizaron las condiciones de cultivo

de enterocitos de duodeno de ratón utilizando membranas sintéticas de colágeno para controlar la sobrevida. Se aislaron células epiteliales a partir de intestino de ratón mediante incubación con DTT y EDTA. Las células se incubaron en DMEM-Glutamax con 20% SFB y antibióticos sobre membranas de colágeno estriado o sobre plástico. Se monitoreó la viabilidad celular en el tiempo mediante recuento celular con azul de tripán, y por microscopía de fluorescencia con bromuro de etidio y naranja de acridina. Se caracterizaron las células mediante microscopía óptica, actividad de fosfatasa alcalina (FA), de lactato deshidrogenasa (LDH), y se evaluó la expresión génica de Lgr5 y Akp3. Luego de 24 horas en cultivo las células permanecieron adheridas a la membrana, manteniendo un fenotipo compatible con el de enterocitos, a diferencia de lo que ocurre sobre células incubadas sin membrana ($P < 0.01$), formando arreglos ordenados tipo empalizada, siguiendo la simetría de las fibras de colágeno presentes en la membrana. Las células se mantuvieron viables, evidenciándose un aumento de los núcleos apoptóticos con el tiempo (7 ± 2 núcleos naranjas por campo microscópico al día 14 de cultivo vs $0,3 \pm 0,2$ al día 7; $P < 0,05$), siendo productoras de FA (5 ± 1 UA/mg), manteniéndose el valor de LDH en el sobrenadante de cultivo constante (1200 ± 100 UI). Las células se congelaron en nitrógeno líquido durante distintos tiempos y al descongelarlas y plaquearlas sobre la membrana de colágeno, se observó una muy alta tasa de sobrevida, un fenotipo conservado y una marcada capacidad de proliferación en cultivo. Estos resultados constituyen un importante aporte para el establecimiento de cultivos primarios de enterocitos murinos, y de esta manera poder crío-preservarlos y crearlos para su empleo en ensayos de varios días de duración.

350. (389) CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LOS EFECTOS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS CECT7121 SOBRE CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Molina, M.¹, Díaz, A.¹, Núñez, G.¹, Berod, L.², Sparwasser, T.², Manghi, M.¹, Castro, M.¹

Laboratorio de Modulación de la Respuesta Inmune, IDEHU (CONICET-UBA)¹, Institut für Infektionsimmunologie (Twincore, MHH-HZI, Deutschland)²

La cepa probiótica *Enterococcus faecalis* (Ef) CECT7121 ejerce efectos benéficos en diversos modelos biológicos, no sólo actuando a nivel de la microbiota intestinal, sino también sobre la respuesta inmune sistémica y de mucosas. Actualmente, intentamos demostrar cómo esta bacteria estimula el sistema inmune innato e induce un sesgo de la inmunidad adaptativa hacia un perfil Th1 con una mayor producción de IFN γ . Así, proponemos a las células dendríticas (DCs) como blanco central de acción del probiótico, las cuales activan la respuesta adaptativa y la direccionan hacia el perfil efector correspondiente. El presente trabajo intenta caracterizar los efectos de Ef CECT7121 sobre DCs generadas a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 de diferentes cepas: *wild type*; MyD88 ko; hSIGN tg; MR ko; MyD88 ko + hSIGN tg; y MR ko + hSIGN tg. Para ello, fueron estimuladas con Ef CECT7121 a diferentes tiempos (0, 6, 12, 24, 48 h) y diversas relaciones bacteria:DC (1:1, 10:1, 100:1). Se determinaron los niveles de IL-6, TNFa, IL-12, e IL-10 liberados al sobrenadante de cultivo (ELISA), así como también la expresión de las moléculas de superficie CD11c, CMH-II, y CD80 (citometría de flujo). Nuestros resultados demuestran que este probiótico activa las DCs in vitro de manera dosis-dependiente, estimulando la expresión de CMH-II y CD80 e induciendo la producción de todas las citoquinas testeadas ($*p < 0.05$). Esta activación es totalmente dependiente de la señalización a través de los receptores de tipo *Toll*, dada la falta de producción de todas las citoquinas en DCs de animales *knock-out* para MyD88. Por otra parte, la señalización a través de las lectinas DC-SIGN o MR (receptor de manosa) no alteraría las respuestas testeadas. En conclusión, nuestros resultados sientan las bases para el estudio de los mecanismos desencadenados por Ef CECT7121, contribuyendo además a dilucidar los mecanismos de acción gatillados por los probióticos en general.

351. (486) EL BLOQUEO DE LA SEÑALIZACIÓN POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO AFECTA LA CAPACIDAD

MODULATORIA DE LA RESPUESTA INNATA DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS PERO NO DE LEVADURAS PROBIÓTICAS

Romanin, D.¹, Garrote, G.², Rumbo, M.¹

Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune¹, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos²

En trabajos previos hemos demostrado la capacidad de diferentes microorganismos, bacterias y levaduras, para modular la respuesta inflamatoria disparada por flagelina en un modelo in vitro empleando un sistema reportero basado en cultivo de células de epitelio intestinal Caco ccl20:luc. Algunas cepas de bacterias, no así las levaduras, son capaces de inducir significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) in vitro sobre una línea celular de epitelio intestinal. En el presente trabajo se utilizaron estos mismos sistemas para evaluar el bloqueo de la capacidad inductora de ROS mediante el uso de N-acetil-Cisteína (NAC), un amortiguador de las ROS producidas y difenilenedionio (DPI), un inhibidor de NADPH oxidasa y otras oxidasas involucradas en la generación de la ROS. Los resultados indican que entre las 10 cepas bacterianas probadas, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSMZ 20174, CIDCA 83114, L kefir ATCC 8007 y *L. acidophilus* JCM 1059 pierden total o parcialmente su capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria en presencia de NAC, en correlación con la capacidad inductora de producción de ROS en las células epiteliales. Por otra parte, ninguna de las cinco levaduras ensayadas fue capaz de inducir significativamente la producción de ROS y su capacidad moduladora es indiferente a la presencia de NAC, poniendo de manifiesto la diferencia de mecanismos de modulación ejercidos por los diferentes tipos de microorganismos. La selección de microorganismos para el presente trabajo se realizó de manera que las especies comúnmente utilizadas como probióticos estuvieran representadas. Tanto la capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria como la de inducción de la producción de ROS muestran un comportamiento cepa-dependiente.

352. (557) INFLUENCIA DE LA LUZ Y EL TNF- α EN LOS RITMOS BIOLÓGICOS DE LA INMUNIDAD INTESTINAL

Barrios, B., Melián, S., Pedrotti, L., Correa, S.

Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, CIBICI-CONICET. FCQ. UNC

En mamíferos los ritmos circadianos están regulados por relojes moleculares alojados en el hipotálamo. Señales del medioambiente como la luz, entrenan el reloj en ciclos de 24 hs que regulan ritmos en sistemas periféricos y cuya alteración se asocia a patologías. Para caracterizar ritmos de la inmunidad intestinal, ratones C57BL/6 se mantuvieron en Luz/Oscuridad (L/O) 12/12 hs, O continua o L continua. A las 6, 12, 18 y 24 hs se obtuvo intestino delgado (ID) y grueso (IG) y se realizó cultivo de explantos de duodeno, yeyuno, íleon y colon durante 48 hs. En sobrenadantes se midió la producción de ON, TNF- α y TGF- β y se evaluó la histología en secciones representativas (H&E y PAS). Se observó que en ratones L/O 12/12 la producción de ON se limitó al IG ($p < 0,05$), con niveles máximos a las 6 y 18 hs. A estos tiempos los niveles de TNF- α liberados fueron mayores en algunas secciones del ID y en IG, en tanto que a las 6 y 18 hs, todos los segmentos produjeron TGF- β , con valores mayores al comienzo del período de L. En ratones expuestos a L continua, la producción de ON en IG fue menor ($p < 0,05$), la liberación de TNF- α aumentó progresivamente en ID hacia íleon ($r = 0,8$; $p < 0,03$) y se redujo la secreción de TGF- β en todos los segmentos. En O continua se observó disminución en los niveles de ON y TNF- α , mientras que los niveles de TGF- β fueron similares comparados con ratones 12/12. Experimentos con ratones TNF- α R ko mantenidos en L/O y O continua mostraron ausencia de ON en todos los tiempos y segmentos y producción de TNF- α a las 6 y 12 hs en ID y a las 6, 12 y 24 hs en IG; los valores en O continua fueron 2- 4 veces mayores. La producción de TGF- β disminuyó de ID a IG a las 6 y 12 hs ($r = -0,78$; $p < 0,02$) en O continua. Estos resultados muestran que la producción de mediadores claves para la

homeostasis responde a patrones rítmicos propios y sugiere que tanto señales locales como del ambiente que modifican los relojes centrales pueden afectar la liberación de los mismos.

353. (646) ALTERACIONES INMUNOHISTOLÓGICAS EN INTESTINO DELGADO EN UN MODELO MURINO DE ESTRÉS SONORO

Zgajnar, N., Toledo, P., Roux, M., Miranda, S.
Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Prof Dr Alberto C Taquin

Trabajos previos permitieron identificar mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de manifestaciones inflamatorias en el útero de hembras pertenecientes a la cruda abortadora de ratones CBA/J x DBA/2 y en su agravamiento por efecto de un estímulo por estrés sonoro. En este trabajo investigamos si el estrés sonoro afecta también al intestino. Para ello se emplearon hembras CBA/J vírgenes de 3 meses de edad (n=12). Los animales permanecieron en el bioterio 3 semanas en condiciones estandarizadas. Posteriormente se dividieron en dos grupos: "control" (sin estrés) y "estrés". El estímulo de estrés fue aplicado por un dispositivo que emite a 300 Hertz en intervalos de 30s y que se coloca dentro de la jaula durante 24hs. En este lapso, los animales fueron mantenidos en ayunas con agua a voluntad. El grupo "control" permaneció en iguales condiciones sin recibir el estímulo sonoro. Seguidamente, todos los animales fueron sacrificados. Se aislaron los intestinos delgados y se procesaron para obtener los cortes de tejido embebidos en parafina, en los que se realizó una coloración de hematoxilina-eosina para observación histológica y se investigó la expresión de TECK e IL-17 y la presencia de linfocitos TCR $\gamma\delta$ mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. Todas las hembras sometidas a estrés mostraron importantes alteraciones morfológicas en las vellosidades intestinales: pérdida del patrón organizado, ruptura y disminución de contenido celular en lámina propia (n=6). Asimismo, todas presentaron una muy incrementada expresión de IL-17 en vellosidades y criptas (n=6) y mayor contenido de linfocitos TCR $\gamma\delta$ en vellosidades, criptas y lámina propia (n=3). No se observaron hasta el momento diferencias significativas en la expresión de TECK en ambos lotes (n=3). Estos hallazgos indican que el intestino delgado también es susceptible al estímulo de estrés sonoro, resultados que nos estimulan a proseguir analizando los mecanismos involucrados.

354. (712) ROL CLAVE DE TASA EN LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO POR LA BACTERIA PROBIÓTICA BACILLUS SUBTILIS

Moreno, J.¹, Abraham, N.¹, Goñi, A.², Salvarrey, M.¹, Saball, E.¹, Grau, R.¹²
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR¹, CONICET²

En trabajos anteriores demostramos que *Bacillus subtilis*, bacteria Gram (+) formadora de esporas, es capaz de gatillar la respuesta inmune innata a través de la estimulación del Sistema de Complemento (C) y el rol regulador clave de *sinR* en la activación del mismo. En el presente trabajo analizamos las moléculas de superficie de BSN y sus variaciones en las distintas mutantes respecto a su capacidad de activar la VÍA CLÁSICA de C. Para ello se construyeron las mutantes en *tasA*, *eps* y *yuaB* (10⁹ CFU/ml), se incubaron con 1 ml de SHN durante 30 minutos a 37°C y se estudió i) en el sobrenadante su capacidad de activar C por consumo (método hemolítico) respecto de un SHN incubado en ausencia de bacterias, utilizando GR de carnero sensibilizados y ii) en las bacterias sedimentadas la generación de productos de activación (iC3b) por ELISA fijando las mismas a placas de poliestireno en buffer bicarbonato 0.1M, pH 9 (10⁹CFU/pocillo) empleando el anticuerpo monoclonal dirigido a los neoantígenos expresados en iC3b como consecuencia de la activación. En todos los casos se realizaron, al menos, 3 experimentos independientes por duplicado. Los resultados muestran que la mutación en *tas* es capaz de abolir el consumo de C (0%) demostrado para la cepa salvaje (55±4.5%) y que es responsable del 76% del mismo (*eps*

42±3.5%); *yuaB* que expresa Tas y EPS consumió 52±4.2% no difiriendo significativamente de *wt*. Los ensayos realizados en fase sólida también demuestran el dramático efecto que la mutación en *tas* provoca en la activación de C (iC3btasA Abs 0.045±0.003), como así también que TasA es responsable del 71% del iC3b (iC3beps Abs 0.574±0.04; iC3byuaB Abs 0.583±0.05) generado por BSN (iC3bwt Abs 0.805±0.06). Estos resultados ponen en evidencia el rol clave de TasA en la activación de la VÍA CLÁSICA anticuerpo independiente por parte de *Bacillus subtilis* natto y refuerzan la importancia de esta bacteria como probiótica a través de la estimulación de la respuesta innata.

355. (267) DEFECTO EN LA MADURACIÓN DE CÉLULAS NK HUMANAS APOYA LA HIPÓTESIS DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS CD56^{BRIGHT} A CÉLULAS CD56^{DIM} IN VIVO

Domaica, C.², Fuertes, M.², Uriarte, I.³, Girart, M.², Sardaons, J.³, Comas, D.³, Di Giovanni, D.³, Gaillard, M.³, Bezrodnik, L.³, Zwirner, N.²
Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental¹, Unidad de Inmunología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"², Buenos Aires, Argentina

Aproximadamente un 90% de las células NK humanas de sangre periférica presentan un fenotipo CD3⁺CD56^{dim}, mientras que el resto posee un fenotipo CD3⁺CD56^{bright}. Evidencias *in vitro* sugieren que las células CD56^{dim} provienen de las células CD56^{bright}, aunque no existen evidencias *in vivo* de esta diferenciación. En este trabajo estudiamos un paciente que a los 12 años padeció un melanoma y una criptococosis pulmonar en el lapso de 1 año, lo que hizo sospechar la existencia de una inmunodeficiencia. El paciente presentó un fenotipo estable caracterizado por una reducción en la frecuencia de células CD56^{dim} y un aumento en la frecuencia y número absoluto de células CD56^{bright} en sangre. Ambas subpoblaciones mostraron una expresión normal de perforina, CD16, CD57, CD158 (KIRs), CD16, NKp46, NKG2D, DNAM-1, 2B4 y CD94/NKG2A, produjeron IFN- γ cuando se estimularon con citoquinas, y las células CD56^{dim} degranularon normalmente en respuesta a citoquinas o células K562. Sin embargo, luego de la estimulación con IL-2 o IL-15, una fracción importante de células CD56^{dim} no aumentó la expresión de CD57 y CD158, se redujeron los porcentajes de células NK CD16⁺ y las células CD56^{bright} no disminuyeron la expresión de CD62L. Estos datos sugieren que las células CD56^{dim} no pueden adquirir un fenotipo de diferenciación terminal y que las células CD56^{bright} no madurarían normalmente hacia células NK CD56^{dim}. Además, la expresión aumentada de CD62L en células CD56^{bright} podría resultar en un patrón de migración alterado. Estos datos apoyan la idea de que las células NK de este paciente presentan un defecto que impediría la normal diferenciación de células NK CD56^{bright} hacia células NK CD56^{dim}, las que además no pueden adquirir un fenotipo de diferenciación terminal. Nuestros resultados constituyen la primera evidencia que indica que *in vivo* las células CD56^{bright} se diferencian en células CD56^{dim}, lo que contribuye a un mejor entendimiento de la ontogenia de las células NK humanas.

356. (328) EFECTO DE ACETILCOLINA ENDÓGENA SOBRE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y MONOCITOS HACIA CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS Y CONTRIBUCIÓN A UN PERFIL TOLEROGÉNICO

Paparini, D.¹², Gori, S.², Grasso, E.¹, Scordo, W.³, Ramhorst, R.¹, Salamone, G.², Pérez Leirós, C.¹
Laboratorio de Inmunofarmacología, Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA, IQUIBICEN-CONICET¹, Academia Nacional de Medicina, IMEX-CONICET², Servicio de Medicina Transfusional, Hospital Italiano de Buenos Aires³

La generación y desarrollo de la interfase materno-placentaria es un proceso dinámico que involucra la acción concertada de células y mediadores favoreciendo un ambiente tolerogénico. Células dendríticas (CD) y macrófagos, son reclutados y "educados" por células trofoblásticas (Tb) para promover el crecimiento fetal. Las células inmunes y la placenta presentan un sistema colinérgico no neuronal, sin embargo, su participación en la inducción del

ambiente tolerogénico en la interfase temprana no se ha aclarado aún. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de acetilcolina (ACh) endógena en la interacción de Tb con CD y monocitos (Mo). Se purificaron Mo de sangre periférica de mujeres voluntarias sanas en edad reproductiva por técnicas inmunomagnéticas (pureza >95%). Para obtener CD, los Mo se diferenciaron 5 días con IL-4/GM-CSF. Se evaluó la expresión de colina acetil transferasa (ChAT), acetilcolinesterasa (AChE) y receptores muscarínicos M1-M5 en la línea celular trofoblástica Swan-71 por RT-PCR y WesternBlot. Mediante co-cultivo de células inmunes con Tb, se analizó la migración de CD y Mo hacia Tb, su interacción, y el efecto de ACh endógena por citometría y detección de MCP-1, IL-10 y TNF- α por ELISA. Observamos que Tb expresa ChAT, AChE y los 5 subtipos de receptor. La neostigmina (Neo) 20 μ M aumentó la producción de IL-10 en Tb, sin variar TNF- α ni MCP-1. En la interacción Tb-CD se observó aumento de IL-10 y aumento de MCP-1 inducido por Neo. El medio condicionado (MC) de Tb indujo migración de CD ($X \pm ES$: 3.674 \pm 193 vs 413 \pm 104 cél/90 min; $P < 0,01$) independientemente de Neo. La migración de Mo por el MC, en cambio, fue mayor en presencia de Neo (7.509 \pm 651 vs 4.882 \pm 558 cél/min; $P < 0,01$). Dicha interacción aumentó la producción de IL-10. En conclusión, las células Tb presentan un sistema colinérgico completo que contribuye a un ambiente tolerogénico y que en la interacción con CD induce aumento de MCP-1 y migración de monocitos.

357. (339) LAS CÉLULAS CITOTÓXICAS NATURALES (NK) EXPRESAN EL RECEPTOR NICOTÍNICO ALFA 7 NEURONAL

Zanetti, S.¹, Dionisio, L.¹, Fuertes, M.², Esandi, M.¹, Zwiner, N.², Bouzat, C.¹

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca¹, Instituto de Biología y Medicina Experimental²

Recientemente, se han detectado componentes involucrados en la transmisión sináptica neuronal en diferentes poblaciones de células mononucleares de sangre periférica. Entre los receptores detectados se destacan los receptores nicotínicos (nAChR), que son canales iónicos activados por acetilcolina (ACh) críticos en la transmisión de impulsos en sistema nervioso central y en la unión neuromuscular. Las células citotóxicas naturales (*natural killer*, NK) son fundamentales en la inmunovigilancia contra tumores y en la inmunidad anti-viral pero se desconoce si expresan nAChRs y otros componentes del sistema colinérgico. Dicha expresión podría hacerlas sensibles a los neurotransmisores y regular la respuesta biológica de las células NK. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue investigar la expresión del subtipo $\alpha 7$ (receptor homomérico neuronal) en células NK humanas mediante PCR y PCR en tiempo real. Observamos que las células NK expresan $\alpha 7$ y, empleando subpoblaciones de células NK separadas por *cell sorting*, que células CD56^{bright} expresan 6-7 veces más ARNm de $\alpha 7$ que células CD56^{dim}. Además, la expresión de $\alpha 7$ aumenta 2 y 3 veces en células NK estimuladas con IL-15 o con IL-12, IL-18 e IL-15 durante 48 h, respectivamente. Por último, demostramos que células NK estimuladas con las tres citoquinas expresan colina acetiltransferasa (ChAT), enzima involucrada en la síntesis de ACh. Concluimos que células NK podrían responder a ACh y a los agonistas de $\alpha 7$, receptor cuya expresión está además regulada durante la activación de las células NK por citoquinas de relevancia en el diálogo recíproco con células dendríticas (IL-12, IL-15 e IL-18). Por ello, cambios en los niveles de ACh en diferentes situaciones fisiopatológicas podrían tener efectos sobre la calidad de la respuesta inmune mediada por células NK, y repercutir en la inmunidad anti-tumoral y anti-viral. Así, nuestros resultados revelan nuevos circuitos regulatorios en el campo de la neuroinmunología.

358. (439) DIÁLOGO ENTRE CÉLULAS NATURAL KILLER (NK) Y CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD): LA CAPACIDAD DE LAS NK PARA ELIMINAR CD INMADURAS DISMINUYE TEMPRANAMENTE DURANTE LA INFECCIÓN CON UNA POBLACIÓN DE ALTA VIRULENCIA DE TRYPANOSOMA CRUZI

Batalla, E. , Poncini, C. , Pino Martínez, A. , González Cappa, S. , Alba Soto, C.

Facultad De Medicina, UBA

La enfermedad de Chagas, causada por *T. cruzi*, puede variar de un curso asintomático a una cardiopatía chagásica fatal. Diferencias biológicas entre los aislamientos de *T. cruzi* definirían la relación hospedero parásito y probablemente el curso de la enfermedad. Las células NK activadas participan en la maduración de CD y eliminan aquellas que permanecen inmaduras. Esta interacción, en la frontera entre la inmunidad innata y la adaptativa, perfila la respuesta contra patógenos. En este trabajo estudiamos la interacción entre células NK y DC durante la infección temprana con dos poblaciones de *T. cruzi* de diferente grado de virulencia. Determinamos que la infección temprana con las dos poblaciones de *T. cruzi* conduce a las NK a un aumento de su función citotóxica (expresión de CD107a en superficie y citotóxica de células Yac-1) y producción de citoquinas. Encontramos que, durante la infección aguda con la cepa de alta virulencia y no con la de baja virulencia, se observa una temprana (48 h) acumulación de CD esplénicas inmaduras. A su vez, las NK aisladas 18 horas post infección con la población parasitaria de alta virulencia exhiben una menor citotoxicidad *ex-vivo* sobre CD inmaduras comparada con las de ratones controles o infectados con la población de baja virulencia. Finalmente, las NK aisladas de ratones IL-10-/- infectados con *T. cruzi* recuperan parcialmente su capacidad de eliminar DC inmaduras. La infección temprana con una población de *T. cruzi* de alta virulencia conduciría a NK y CD a un circuito que mantendría el pool de CD esplénicas en un estado inmaduro. Este podría ser un mecanismo inmunoregulatorio que al retrasar la inducción de una respuesta adaptativa vigorosa evita el daño inmonopatológico al hospedero frente a un patógeno que se disemina y multiplica rápidamente. Este mecanismo, en el que participaría la IL-10 producida durante la infección, también contribuiría a la persistencia parasitaria.

359. (535) ESTUDIO DE CÉLULAS MIELOIDES GR1+ CD11B+ INDUCIDAS POR CPG-ODN+IFA EN RATONES VIEJOS

Harman, M., Ranocchia, R., Gorlino, C., Maletto, B., Moron, G., Pistoresi, M.
CIBICI

Previamente demostramos que la administración s.c de CpG-ODN (100 μ g) emulsionado en IFA (CpG-ODN+IFA) induce luego de 10 días tanto en ratones viejos (18 meses, 18m) como en jóvenes (3 meses, 3m), el aumento de una población de células mieloides Gr1⁺CD11b⁺ en bazo, alta actividad de la enzima arginasa y supresión de la proliferación de linfocitos T (LiT). A partir de estos datos, nuestro objetivo fue determinar si esta población sigue la misma cinética en ratones de 18m y 3m luego del tratamiento y si la actividad de arginasa se correlaciona con la supresión de LiT. Observamos que en los ratones viejos el porcentaje de células Gr1⁺CD11b⁺ se conserva aumentado hasta 40 días luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA ($p < 0,05$) así como también continúa incrementada la actividad de arginasa ($p < 0,05$) a diferencia de los animales de 3m en los que al día 25 tanto las células mieloides como la actividad de arginasa vuelven a su estado basal. Para corroborar su posible potencial inhibitorio, células Gr1⁺CD11b⁺ de bazo de ratones de 18m tratados 10 días antes, fueron purificadas y co-cultivadas con LiT purificados de bazo de ratones de 3m normales, estimulados con anti-CD3/CD28, observándose una reducción en la respuesta proliferativa en comparación a LiT co-cultivados con células Gr1⁺CD11b⁺ de ratones viejos no tratados ($p < 0,05$) o a LiT solos ($p < 0,05$), la cual fue restaurada con un antagonista de arginasa (NOR-NOHA). Además observamos por citometría de flujo que las células GR1⁺CD11b⁺ provenientes de animales de 18m tratados expresan mayores niveles de arginasa con respecto a las de animales no inyectados ($p < 0,05$). Estos resultados indican que la administración de CpG-ODN+IFA en ratones viejos induce la expansión de una población de células Gr1⁺CD11b⁺ que se mantiene elevada en el tiempo junto con la actividad de arginasa en comparación a ratones jóvenes y que estas células son capaces

de suprimir la proliferación de LiT mediante un mecanismo que involucra la inducción de arginasa.

360. (536) OPTIMIZACIÓN DEL EFECTO INMUNOADYUVANTE DE OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS CON MOTIVOS CPG (CPG-ODN), MEDIANTE SU FORMULACIÓN EN UN SISTEMA NANOESTRUCTURADO

Sánchez Vallecillo, M.¹, Ullio Gamboa, G.², Chiodetti, A.¹, Palma, S.², Allemandi, D.², Moron, G.¹, Pistoresi, M.¹, Maletto, B.¹
CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas.¹, UNITEFA (CONICET)- Departamento de Farmacia- Facultad de Ciencias Químicas. UNC.²

CpG-ODN tiene potente actividad adyuvante aunque tiene una reducida biodisponibilidad debido a su vida media corta, biodistribución y farmacocinética no favorable, alta unión a proteínas plasmáticas, baja internalización celular y efectos independientes de la secuencia CpG. Por ello, formulamos CpG-ODN en un sistema nanoestructurado formado a partir del palmitato del ácido ascórbico (Coa-ASC16) con el objeto de optimizar su capacidad adyuvante. Previamente mostramos que esta estrategia potencia la actividad de CpG-ODN ya que ratones inmunizados s.c. con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (co-formulación) desarrollaron mayores títulos de IgG específica para OVA y de citoquinas (INF- γ e IL-17) en forma específica para OVA que aquellos tratados con OVA/CpG-ODN. Además, Coa-ASC16 mostró actividad inflamatoria "per se". Con el objetivo de comprender el mecanismo a través del cual Coa-ASC16 potencia la actividad adyuvante de CpG-ODN, en este trabajo evaluamos si la potenciación de la respuesta inmune específica se conserva al co-inyectar OVA/CpG-ODN y Coa-ASC16 sin formularlos previamente. Para ello, se inmunizaron ratones BALB/c por vía s.c. en los días 0, 7 y 15 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 y OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 (co-inyección). Al día 7 pos 3^{ra} inmunización, el título de anticuerpos anti-OVA fue para IgG1: 3,1 \pm 0,3; 5,2 \pm 0,1; 3,1 \pm 0,2 respectivamente (p<0,001 co-formulación vs. co-inyección) y para IgG2a: 3,1 \pm 0,1; 4,5 \pm 0,3; 3,1 \pm 0,3 respectivamente (p<0,05 co-formulación vs. co-inyección). En sobrenadante de suspensiones celulares esplénicas estimuladas con OVA, el nivel de INF- γ e IL-17 fue, en los ratones OVA/CpG-ODN de 357 \pm 168, 142 \pm 88 respectivamente y en los OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 de 2686 \pm 734, 1553 \pm 184 pg/ml respectivamente, mientras que en los OVA/CpG-ODN + Coa-ASC16 no se detectaron las citoquinas nombradas anteriormente. En conclusión, los resultados muestran que se necesita la formulación de OVA/CpG-ODN en Coa-ASC16 para la potenciación de su actividad adyuvante.

361. (664) POLYU ACTÚA DIRECTAMENTE SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA CD11c⁺ CD8a⁺ A TRAVÉS DE TLR7 PARA ESTIMULAR LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENO

Crespo, M., Zacca, E., Acland, R., Maletto, B., Pistoresi, M., Moron, G.
CIBICI-CONICET; Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

La célula dendrítica (DC) CD11^{brill} CD8a⁺ (cDC CD8⁺) es la principal subpoblación de DCs esplénicas en realizar presentación cruzada de antígenos en el ratón. Los ligandos de TLR pueden estimular la presentación cruzada de antígenos. Se ha reportado que las cDCs CD8⁺ no expresan TLR7. Hemos encontrado que la incubación de DCs totales de bazo de ratones C57BL/6 con ovalbúmina (OVA) en presencia de PolyU (ligando de TLR7, P+O) aumenta fuertemente la presentación cruzada de OVA. En este estudio nuestro objetivo fue identificar la subpoblación de DCs involucrada en la presentación cruzada estimulada por PolyU. Para ello, se aislaron por FACS las cDC CD8⁺ y CD8⁻ y las DCs plasmacitoides (pDCs), se las incubó con P+O y co-cultivó con linfocitos T (LT) CD8 de ratones OT-1. Encontramos que solo las cDCs CD8⁺ activaron los LT CD8. cDCs CD8⁺ incubadas con P+O y transferidas a ratones vírgenes inducen una fuerte CTL

contra OVA. Esto sugeriría una acción directa de PolyU sobre la cDC CD8⁺. Para corroborarlo, evaluamos la expresión de TLR7 por PCR cuantitativa en tiempo real en las DCs. Hallamos que las cDCs CD8⁺ expresan ARNm para TLR7, aunque con niveles más bajos que las pDCs y cDCs. El tratamiento de DCs incubadas con P+O con ISR661 (bloqueante de TLR7) inhibió la proliferación de LT CD8⁺ OT-1 (p<0,01) y la inducción de CTL cuando las DCs fueron transferidas a ratones vírgenes (p<0,001), confirmando que PolyU actúa sobre la DC a través de TLR7. También, DCs de ratones MyD88^{-/-} incubadas con P+O fueron incapaces de activar *in vitro* LT CD8 OT-1 y de inducir CTL cuando son transferidas a ratones vírgenes. El conjunto de estos resultados sugiere que la cDC CD8⁺ expresa TLR7, lo que le permitiría ser estimulada directamente por PolyU para realizar presentación cruzada de antígenos.

362. (692) CÉLULAS DENDRÍTICAS DE RATONES DEFICIENTES EN LA PROTEÍNA LEUCOCITARIA ESPECÍFICA (LSP1) SON INCAPACES DE INDUCIR RESPUESTA CITOTÓXICA

Acland, R., Zacca, E., Crespo, M., Maletto, B., Pistoresi, M., Moron, G.
CIBICI-CONICET - Facultad de Ciencias Químicas, Univ. Nac. de Córdoba

La proteína leucocitaria específica (LSP1) es una proteína citoplasmática de 52 kDa que se une a F-actina y es expresada en leucocitos y células endoteliales. LSP1 es un regulador de la remodelación del citoesqueleto de actina y es importante en los eventos de polarización del citoesqueleto, modulando la motilidad de los leucocitos y su migración frente a distintos estímulos. Es capaz de interactuar con DC-SIGN y otras lectinas tipo C en células dendríticas (DCs) humanas. Recientemente se ha encontrado que LSP1 juega un rol en el tráfico de HIV a través de DCs humanas y murinas, direccionando al HIV hacia el proteasoma. En la ausencia de LSP1 la degradación del HIV en las DCs disminuye drásticamente. Para estudiar este rol inesperado para LSP1 en los fenómenos del procesamiento y presentación antigénica en las DCs iniciamos estudios en ratones deficientes en esta molécula. Primero caracterizamos la composición de poblaciones leucocitarias linfoides y mieloides en el bazo de ratones LSP1^{-/-} con respecto a su homólogo LSP1^{+/+}. Encontramos que entre ratones LSP1^{-/-} y LSP1^{+/+} había una composición similar en linfocitos T CD4 y CD8 y B, en células NK y NKT, en monocitos, macrófagos y granulocitos. Además, poseen un contenido similar de células dendríticas (DCs), tanto a nivel total como en la composición de sub-poblaciones esplénicas. Cuando ratones LSP1^{-/-} fueron inyectados i.v. con PolyU (ligando de TLR7) encontramos un aumento de CD40, CD80 y CD86 similar al observado en ratones LSP1^{+/+}. Sin embargo, DCs purificadas del bazo de ratones LSP1^{-/-}, incubadas con ovalbúmina (OVA) en presencia de PolyU y luego transferidas a ratones LSP1^{+/+} vírgenes fueron incapaces de disparar una respuesta citotóxica contra OVA (p<0,05), mientras que DCs de ratones LSP1^{+/+} indujeron una fuerte respuesta citotóxica contra OVA. Estos resultados sugerirían que LSP1 jugaría un rol específico en la inducción de respuesta citotóxica.

363. (776) EL SISTEMA COLINÉRGICO MODULA LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ACTIVADAS POR TSLP

Gori, S.¹, Vermeulen, M.¹, Sabbione, F.¹, Papparini, D.¹, Scordo, W.², Geffner, J.¹, Salamone, G.¹
IMEX CONICET, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires¹, Servicio de Medicina Transfusional, Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina²

Acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor por excelencia del sistema colinérgico. Media su acción a través de dos diferentes sistemas de receptores, los receptores muscarínicos (mAChR) y los receptores nicotínicos (nAChR). Previamente, describimos la presencia de receptores muscarínicos, de acetiltransferasa (AChT) y acetilcolinesterasa (AChE), enzimas que catalizan la síntesis y la degradación de ACh, en células dendríticas humanas (CD). En

este trabajo analizamos el impacto del sistema colinérgico en la fisiología de CD pre-activadas con TSLP (15ng/ml). Los monocitos fueron purificados a partir de sangre periférica de donadores sanos no fumadores mayores de 35 años, por selección positiva (kit de CD14, Miltenyi, % pureza >95), y diferenciados a CD por cultivo con GM-CSF+IL-4 durante 5 días. Posteriormente, las CD pre-activadas o no con TSLP fueron cultivadas en presencia o ausencia de carbacol (agonista farmacológico de los receptores colinérgicos) durante 24hs. Resultados previos demostraron un incremento significativo en la expresión de OX40L ($p<0.05$) en las CD incubadas con carbacol $10^{-8}M$; por consiguiente evaluamos la producción de citoquinas en el cultivo mixto linfocitario (CML) de estas CD y observamos un aumento significativo en la producción de TNF-alfa ($p<0.05$). Sabiendo que el TSLP induce a las CD hacia un perfil Th2, quisimos evaluar si esta citoquina potencia el efecto observado con el carbacol. Sorpresivamente, las CD cultivadas en presencia de TSLP+carbacol $10^{-8}M$ durante 24hs indujeron una disminución en la producción de TNF-alfa tanto en los cultivos de CD ($p<0.0001$) como en los CML ($p<0.05$) realizados posteriormente. Estos resultados sugieren que el sistema colinérgico promueve una actividad pro-inflamatoria en las CD, mediada a través de la producción de TNF-alfa, que es modulada negativamente cuando las CD se encuentran pre-activadas con TSLP.

364. (605) CONTRIBUCIÓN DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS) EN EL DAÑO ENDOTELIAL MEDIADO POR LA TOXINA SHIGA.

Landoni, V., Schierloh, L., Lapponi, M., Carestia, A., Martire Greco, D., Schattner, M., Fernández, G.
Academia nacional de medicina

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda. Se desarrolla en niños como una enfermedad vascular luego de diarreas sanguinolentas y es causado por *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (Stx). Los lipopolisacáridos (LPS) y la activación de los neutrófilos (PMN) potencian el daño endotelial mediado por la Stx y son centrales en el desarrollo del SUH. Recientemente, se ha descrito en PMN un mecanismo para eliminar patógenos, que implica la liberación extracelular de ADN y proteínas microbicidas (NETs). Además, las plaquetas (Plts) tratadas con LPS son estimuladoras de este mecanismo. La formación de NETs (netosis) dentro de los vasos sanguíneos podría tener un rol en el daño endotelial observado en el SUH. Nuestro objetivo fue determinar si la Stx2, en el contexto de Plts sensibilizadas con LPS, es capaz de inducir la formación de NETs en PMN y elucidar su participación en el daño endotelial. Para ello, Plts fueron tratadas con Stx2 y/o LPS y luego coincubadas 6 h con PMN. La formación de NETs fue determinada por microscopía confocal. Los resultados revelan que la Stx2 aumenta la formación de NETs mediada por Plts sensibilizadas con LPS (Plts-LPS), respecto a las inducidas solo con Plts sensibilizadas ($p<0.05$). Esto se correlacionó con un aumento en el binding de LPS a Plts mediado por Stx2, evaluado por FACS empleando LPS-FITC ($p<0.05$). Por otro lado, para determinar la relevancia de la netosis en el daño endotelial se realizaron co-cultivos de células endoteliales microvasculares (HMEC-1) con PMN activados por Plts tratadas con LPS y/o Stx2. Al determinar el número de HMEC-1 vivas luego de 24 h por microscopía se observó una reducción de la citotoxicidad mediada por PMN activados por Plts-LPS+Stx2 en presencia de DNAsa ($p<0.05$). Los resultados sugieren que Plts expuestas a LPS y Stx2 promueven la formación de NETs y la netosis contribuye al daño endotelial mediado por PMN en este contexto

365. (608) IMPACTO DE LAS TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NET) SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS MIELOIDES HUMANAS

Sabbione, F.¹, Gabelloni, M.¹, Lula, L.¹, Gori, S.¹, Geffner, J.^{1,2}, Jancic, C.¹, Trevani, A.^{1,2}
IMEX. CONICET. Academia Nacional de Medicina¹, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA.²

Los cristales de urato monosódico (MSU) son señales de daño endógeno capaces de desencadenar respuestas inflamatorias. En pacientes con "Gota", los MSU se depositan en articulaciones induciendo una respuesta inflamatoria sinovial en la que predominan los neutrófilos. Previamente demostramos que los MSU estimulan a los neutrófilos (PMN) a liberar trampas extracelulares (NET) conformadas por cromatina y proteínas granulares. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar si estas NET activan o modulan la activación inducida por LPS de células dendríticas mieloides humanas diferenciadas de monocitos de sangre periférica (CD). Para ello, 10^6 PMN fueron estimulados con 300 mg/ml de MSU o vehículo por 4hs, luego fueron sonificados suavemente por 1 minuto a fin de separar las NET de los restos celulares, centrifugados y los sobrenadantes fueron recuperados, corroborada la presencia o ausencia de NET, e incubados con 2×10^5 CD en presencia o ausencia de 200 ng/ml de LPS durante 24 hs a 37°C. Luego, en los sobrenadantes de estos cultivos se determinó la concentración de citoquinas y sobre las CD la expresión de marcadores de maduración. Las NET no indujeron per se la maduración de las CD evaluada en función de la expresión de CD86, HLA-DR y MHC clase I, ni indujeron la secreción de TNF alpha (a), IL-6, IL-8 e IL-10 ($n=5$). Las NET tampoco modularon la secreción de IL-6, IL-8 e IL-10 por CD maduras por acción del LPS ($n=5$). Sin embargo, las NET inhibieron ~40% la secreción de TNFa por dichas células ($n=5$, exp. realizados por triplicado; $p<0.01$). La inhibición de la secreción de TNFa se correlacionó positivamente ($r= 0,85$) con la concentración de ADN detectada en las muestras de NET y no fue consecuencia de una reducción en la viabilidad de las CD por acción de las NET. La capacidad de las NET de inhibir la secreción de TNFa por las CD podría modular la generación de células T regulatorias y TH17, un efecto que está siendo analizado en nuestro laboratorio.

366. (745) ROL DE LAS ESPECIES REACTIVAS A OXÍGENO EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL AGENTE CAUSAL DE LA TOS CONVULSA, BORDETELLA PERTUSSIS

Zurita, M.¹, Moreno, G.², Errea, A.², Rumbo, M.², Hozbor, D.¹
Lab. VacSal- IBBM-Fac.Cs.Exactas-UNLP¹, LISIN - Fac. Cs. Exactas - UNLP²

La estimulación exacerbada de la respuesta inmune innata (StIR) en las vías aéreas puede evitar infecciones pulmonares causadas por organismos tan diversos como hongos, bacterias y virus. Recientemente hemos demostrado que este fenómeno también ocurre en las infecciones causadas por *Bordetella pertussis*. Específicamente hemos demostrado que la estimulación de la respuesta innata vía TLR4 evita la colonización en los pulmones de *B. pertussis*. En este trabajo profundizamos la caracterización de este fenómeno y avanzamos en la identificación de los mecanismos moleculares puestos en juego. Para ello evaluamos *in vivo* empleando el modelo en ratones de infección puesto a punto, la cinética de clearance de *B. pertussis* (*Bp*) luego del tratamiento con LPS. Brevemente los experimentos consistieron en la coadministración intranasal de LPS (1 µg) con *Bp* (dosis subletal 10^7 CFU/40 µl) y la evaluación de las UFC de *Bp* en los pulmones a 2, 6 y 24 h post-tratamiento. Interesantemente el clearance de *B. pertussis* fue muy rápido ya que no se recuperaron colonias a tiempos tan cortos como 2h post-desafío. Esta cinética sugiere que el fenómeno StIR estaría mediado por sustancias antimicrobianas (ej. especies reactivas al oxígeno, ROS) preformadas y secretadas a nivel de pulmón. Para evaluar esta hipótesis sobre la acción de ROS, ensayamos la coadministración intranasal del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC, 3,2 µg), con LPS (1µg) y *Bp* (10^7 CFU/40 µl). Los resultados fueron comparados con los obtenidos de animales tratados con LPS+Bp y Bp solamente. Los datos mostraron que la administración de NAC evita el clearance bacteriano inducido por el LPS ($p<0,01$). En concordancia, observamos en el BAL de los animales tratados con LPS un incremento de ROS ($\mu M H_2O_2$, $1,15\pm 0,15$ vs $0,58\pm 0,04$) que fue suprimido por la coadministración de NAC ($0,63\pm 0,12 \mu M H_2O_2$). Estos resultados indican que la generación de ROS tiene un rol importante en la protección TLR4 dependiente contra *B. pertussis*.

367. (751) PARTICIPACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-EXTRACTO ACUOSO DE LARREA DIVARICATA CAV EN LA OPSONOFAGOCITOSIS Y EN LA NEUTRALIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE PROTEÍNAS TOTALES DE CANDIDA ALBICANS EN MACRÓFAGOS MURINOS

Muñoz, M., Canale, F., Castell, S., Micalizzi, B., Mattar D. De Anaya, M.

Universidad Nacional de San Luis-Área de Microbiología

Larrea divaricata (jarilla) es una planta de uso en medicina popular. Existe una similitud antigénica entre proteínas del extracto crudo de jarilla (JPCE) y proteínas de *Candida albicans* ATCC 36801(PTC). Sin embargo, no hay información sobre el rol de las proteínas de jarilla en la inmunidad innata. Los objetivos fueron: el estudio de la participación de estos anticuerpos en la fagocitosis de *C. albicans* y en la inhibición de los efectos de PTC sobre la viabilidad y estallido respiratorio de macrófagos de exudado peritoneal de ratón (MØ). Ratones Rockland fueron inmunizados vía s.c. con dos dosis de JPCE o proteínas totales de la levadura (PTC). Los sueros fueron recolectados 15 días después de la última dosis. Sueros no inmunes fueron empleados como controles. El título de IgG se evaluó por ELISA. Los MØ se obtuvieron por lavado peritoneal 72 hs luego de una inyección con proteosa peptona y se purificaron por adherencia en placa. Para el ensayo de fagocitosis los MØ se incubaron con levaduras opsonizadas (MOI 1:10) con anti-JPCE o anti-PTC y se analizó el n° de levaduras asociadas a MØ por M.O. Se analizó el efecto de PTC sobre la viabilidad de MØ por la prueba de MTT y el estallido respiratorio por NBT, con o sin preincubación de los antígenos con sueros anti-JPCE (1/50-1/200). El estudio por M.O. mostró un aumento en el número de levaduras asociadas y fagocitadas cuando fueron opsonizadas con anti-JPCE o anti-PTC ($p \leq 0.05$). La prueba de NBT no mostró diferencias para las concentraciones ensayadas de PTC. La prueba MTT presentó inhibición de la viabilidad por parte de PTC en concentraciones entre 500-50ug/ml, cuyos efectos fueron neutralizados por anticuerpos anti-JPCE ($p \leq 0.05$). Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-JPCE participan en la opsonofagocitosis de la levadura y neutralizan el efecto que ejercen las proteínas de *C. albicans* sobre la viabilidad de macrófagos, alentando el uso de JPCE como inmunomodulador.

368. (756) EFECTO DE ANTISUEROS GENERADOS CONTRA PROTEÍNAS DE EXTRACTO CRUDO DE LARREA DIVARICATA EN LA OPSONOFAGOCITOSIS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA POR PARTE DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN

Canale, F., Martino, R., Castell, S., Muñoz, M., Elicabe, J., Micalizzi, B., Mattar D. De Anaya, M.

Universidad Nacional de San Luis - Área de Microbiología

Larrea divaricata (jarilla) es una planta ampliamente usada en medicina popular. Se ha demostrado que anticuerpos generados contra proteínas de extracto crudo de *L. divaricata* (PLD) participan la respuesta humoral frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, no hay estudios sobre su contribución en la inmunidad innata. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de estos anticuerpos en la opsonofagocitosis de *P. aeruginosa* ATCC 27853 por macrófagos (MØ) de exudado peritoneal de ratón. Ratones Rockland fueron inmunizados vía s.c. con dos dosis de PLD o proteínas celulares solubles de la bacteria (PCS). Los sueros fueron recolectados 15 días después de la última dosis y de complementados. Sueros no inmunes fueron empleados como controles. Primero se evaluó el título de IgG contra antígenos bacterianos por ELISA y su capacidad de opsonizar bacterias por IFI. Sueros anti-PLD mostraron una reactividad cruzada significativa con PCS ($p \leq 0.05$) y se observó inmunofluorescencia positiva en bacterias incubadas con sueros inmunes. Posteriormente se evaluó la capacidad fagocítica de las bacterias opsonizadas por los MØ. Los mismos se obtuvieron por lavado peritoneal 72 hs luego de una inyección con proteosa peptona y se purificaron por adherencia en placa. Los MØ se incubaron con bacterias opsonizadas (MOI 1:10) con anti-PLD y anti-PCS para los siguientes ensayos: a) n° de bacterias asociadas a MØ por M.O. con tinción

de Giemsa, b) fagocitosis por la prueba de reducción de NBT. El estudio por microscopía mostró un aumento en el número de bacterias asociadas a MØ cuando fueron opsonizadas con anti-PLD o anti-PCS ($p \leq 0.05$). Por último la reducción de NBT demostró que los sueros inmunes favorecieron la producción de anión superóxido durante la fagocitosis ($p \leq 0.05$). Esto indicaría que anticuerpos anti-proteínas de *Larrea divaricata* actúan como opsoninas frente *P. aeruginosa*; contribuyendo, de este modo, a la respuesta inmune innata.

NEUROCIENCIAS 4

369. (323) ESTUDIO DEL PATRÓN MIGRATORIO DE NEURONAS CORTICOFRONTALES QUE EXPRESAN REELINA EN LA ASFIXIA PERINATAL EXPERIMENTAL
Peña, M.¹; Ibarra, M.¹; Rolón, F.¹; Acosta, J.²; Cohon, D.¹; Contartese, D.¹; Sarotto, J.¹; Rey-Funes, M.¹; Dorfman, V.³; Loidl, C.¹

Instituto de Biología Celular y Neurociencia Profesor De Robertis, Facultad de Medicina, UBA¹ Universidad Católica de Cuyo, San Juan² Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico, Universidad Maimónides³

Previamente observamos alteraciones compatibles con esquizofrenia como neurodegeneración, somas neuronales en cuerpo calloso, alteraciones en la laminación cortical con dendritas apicales tortuosas, aumento de neurofilamentos y alteraciones sinápticas en corteza y estriado en animales con asfixia perinatal. Además, se encontró aumento de dopamina e hipolocomoción. Estos cambios estarían relacionados con neurotoxicidad por óxido nítrico. En esta enfermedad se ha descrito alteración en la reelina, la cual modula la corticogénesis. Objetivo: estudiar la expresión de reelina en un modelo de ratas Sprague Dawley con asfixia perinatal (AP) por inmersión en agua (37°C, 19 min, n=8). Se estudiaron animales de 7, 10 y 15 días post lesión. Como grupo control se utilizaron animales nacidos a término (CTL). Mediante inmunohistoquímica se encontraron células positivas para reelina en la capa I de la corteza cerebral (células de Cajal-Retzius) en CTL de 7 días, las cuales a los 10 y 15 días se localizan en las capas medias con una prolongación apical de las mismas hacia la capa I. En los AP se encontraron células de Cajal-Retzius solo en capa I en todos los días evaluados. Estos datos se complementan con otros experimentos de AP en que observamos células de Cajal-Retzius inmunorreactivas para la enzima óxido nítrico sintasa neuronal también en la capa I. En conclusión, durante el desarrollo postnatal las células Cajal-Retzius migrarían desde la capa cortical más externa hacia las capas más profundas de la corteza cerebral. La localización de estas células exclusivamente en la capa I en animales AP sugiere que la asfixia perinatal alteraría su migración reteniendo a las células en la capa más externa. Esta migración estaría modulada por reelina, la cual interactuando con un exceso de NO durante la AP induciría las alteraciones previamente descritas. Estas observaciones permitirían la utilización del modelo de AP para estudiar mecanismos neuropatológicos desencadenados en la esquizofrenia.

370. (325) EFECTO PROTECTOR DEL AZUL DE METILENO EN LA RETINOPATÍA PROLIFERATIVA ISQUÉMICA

Rey-Funes, M.¹; Fernández, J.²; Ibarra, M.¹; Peña, M.¹; Contartese, D.¹; Rolón, F.¹; Insera, P.³; López-Costa, J.¹; Dorfman, V.³; Loidl, C.¹

IBCN- Facultad de Medicina - UBA¹ Primera Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.² Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico, Universidad Maimónides³

La asfixia perinatal es capaz de lesionar gravemente la retina, generando retinopatía proliferativa isquémica (RPI), que puede llevar a la ceguera. En estudios previos hemos demostrado neurodegeneración, gliosis y neovascularización compatibles con la retinopatía del prematuro, determinando la participación del sistema

nitrérgico en su fisiopatología. En este trabajo se evaluó la aplicación de azul de metileno como potencial estrategia terapéutica para inhibir la actividad del sistema nitrérgico. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho (n=5/grupo) expuestas a asfixia perinatal (20 min., 37°C, AP). Además, se utilizaron madres preñadas a término tratadas con azul de metileno (2mg/kg), 30 y 5 minutos antes de inducir la AP. Con sus crías macho se generó el grupo AP+AM. Como controles se utilizaron animales nacidos a término (CTL). Todos los animales se sacrificaron a los 30 días postnatal. Se estudió la actividad enzimática de la NOS constitutiva y se observó un aumento significativo en AP vs. CTL (AP=10,8±0,4, CTL=9,1±0,3 pmol/min/mg de prot, p<0,05), sin cambios en AP+AM. Mediante Western-Blot se determinó un aumento significativo del 28% en AP vs. CTL y una reducción significativa del 60% en AP+AM vs. CTL. Mediante inmunohistoquímica para la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) e histoquímica NADPH-diaforasa se observó un aumento significativo en el número de células positivas (neuronas amácrinas y células ganglionares), área reactiva y densidad óptica relativa en AP vs. CTL, sin variaciones en AP+AM vs. CTL. La aplicación de azul de metileno presentó un efecto bloqueante de la actividad de la enzima NOS constitutiva, con disminución en su expresión. Este hallazgo alienta estudios futuros más exhaustivos para evaluar el uso del azul de metileno como inhibidor de la neurotoxicidad desencadenada por el óxido nítrico.

371. (333) EFECTO TERAPÉUTICO DE LA MELATONINA SOBRE LOS CAMBIOS EN LA RETINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ETAPAS TEMPRANAS DE DIABETES TIPO 2

Miranda, M.; M. Salido, E.; Bordone, M.; Chianelli, M.; Keller Sarmiento, M.; Dorfman, D.; Rosenstein, R.
Laboratorio NROE, Departamento de Bioquímica Humana, Fac. Medicina, UBA- CEFyBO/CONICET

La retinopatía diabética es la principal causa de ceguera adquirida en adultos, en su mayoría afectados por diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Hemos desarrollado un modelo experimental de DM2 en ratas adultas, que reproduce algunas de las características de la DM2 humana en sus etapas iniciales y provoca alteraciones retinianas significativas. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la melatonina sobre los cambios retinianos inducidos por la alteración metabólica moderada. Para ello, ratas *Wistar* macho adultas recibieron una dieta estándar o 30% de sacarosa en el agua de bebida. Tres semanas después de este tratamiento, los animales fueron inyectados con vehículo o estreptozotocina (STZ, 25 mg / kg, i.p.). Un día después de la inyección de vehículo o STZ, los animales fueron implantados subcutáneamente con un *pellet* de 20 mg de melatonina. Se examinó la glucemia en ayunas y postprandial y el test de tolerancia intraperitoneal a insulina y a una sobrecarga de glucosa (1 g/kg). A las 12 semanas de tratamiento, los animales que recibieron una dieta rica en sacarosa y STZ mostraron diferencias significativas en las pruebas metabólicas, en comparación con los grupos control. La melatonina, que no afectó el metabolismo de la glucosa en ratas control o diabéticas, redujo significativamente la disminución en la amplitud de las ondas a y b del electroretinograma escotópico y de los potenciales oscilatorios (P< 0.05 vs. diabetes), el aumento de la peroxidación lipídica, la actividad de la NOS, los niveles de TNFa (P< 0.05 vs. diabetes), así como el aumento en los niveles de proteína ácida gliofibrilar en células de Müller y del factor de crecimiento vascular endotelial (analizados por inmunohistoquímica). La melatonina evitó la disminución en la actividad de catalasa (P< 0.05 vs. diabetes). Estos resultados indican que la melatonina protege a la retina de las alteraciones observadas en un modelo experimental de retinopatía diabética asociada a DM2.

372. (401) LOS ASTROCITOS EN LA EPILEPTOGENESIS: SU PAPEL EN EL PERIODO DE LATENCIA.

Rossi, A.; Angelo, M.; Villarreal, A.; Ramos, A.
IBCN. Facultad de Medicina UBA

Las epilepsias del lóbulo temporal (TLE) se caracterizan por el antecedente de una injuria inicial, un periodo de latencia de

10 a 15 años en humanos y un periodo crónico caracterizado por descargas neuronales espontáneas y sincrónicas que persiste durante el resto de la vida del paciente. Es durante el periodo silente que se desarrollan las bases para la epileptogénesis y donde la inflamación parece jugar un importante papel. Se ha atribuido a la gliosis reactiva un rol clave en la respuesta inflamatoria, mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias. Nos propusimos investigar la relación entre la gliosis reactiva y la degeneración neuronal durante el periodo de latencia. Utilizando el modelo de TLE por Lítio-Pilocarpina en ratas macho *Wistar*, que fueron sacrificadas a los 7-15-21 días post status epilepticus (SE), y mediante técnicas de inmunocitoquímica observamos que la intensidad de la hipertrofia astrogliosa es dependiente del grado en la escala de Racine alcanzado y al tiempo transcurrido post SE. En los animales que desarrollaron SE intenso durante 30 minutos, y cuya recuperación posterior fue más lenta, se observó la presencia de células gliales nestina (+), cuya distribución varió con el tiempo transcurrido desde el SE, a los 7 días se hallaron a nivel del CA1 y giro dentado del hipocampo, corteza piriforme y núcleos talámicos; a los 21 días solo se hallaron a nivel de la corteza piriforme y en zonas puntuales del giro dentado. En estas zonas donde se identificaron astrocitos inmaduros, se observó así mismo una alteración más tardía (21 días) en las dendritas neuronales MAP2+ así como cambios en la localización de NeuN, sugestivos de neuronas en degeneración, dependiente del tiempo transcurrido post-SE. Nuestros resultados muestran que la gliosis reactiva precede a las alteraciones neuronales, lo que indicaría su probable contribución a la degeneración neuronal.

373. (351) CORRELACIONES ENTRE VALORES DE SUPERFICIES MEDIDAS EN EL LÓBULO PREFRONTAL Y EN EL CUERPO CALLOSO DE IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA

Merlo, A.¹; Albanese, A.¹; Miño, J.^{1,2}; Gómez, E.¹; Albanese, E.¹
Facultad de Medicina USAL¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA²

En trabajos previos observamos que en la imagen de resonancia magnética del plano sagital medio del cerebro, la superficie total del cuerpo calloso y de 5 de las de 6 zonas en las que fue dividido disminuyen a partir de los 61 años y que valores relacionados con el lóbulo prefrontal también disminuyen. Objetivo: Determinar posibles correlaciones entre valores de superficies de seis zonas del cuerpo calloso (CC) y seis zonas del lóbulo prefrontal (LPF) en imágenes de resonancia magnética. MATERIAL Y MÉTODO: En la imagen de resonancia magnética del plano sagital medio de 38 sujetos femeninos diestros (edad 41-84 años), sin diagnóstico de enfermedades neurológicas ni psiquiátricas, se limitaron 6 superficies (1 a 6 de anterior a posterior) sobre la totalidad del CC contenidas en sectores circulares de 6 ángulos de 30 grados con vértice en la mitad del segmento que une las partes más ventrales del borde del CC. Por otra parte en imágenes parasagittales equidistantes del plano sagital medio se limitaron sobre cada LPF, 6 superficies (denominadas A a F de dorsal a ventral) contenidas en sectores circulares de 6 ángulos de 30 grados con vértice en el extremo anterior del genu del CC y lados que intercedían con el borde anterior del cerebro. Las superficies del CC y del LPF se midieron con el programa Scion Image for Windows. Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre valores de superficie del CC y LPF. La superficie de la zona 1 del CC, que contiene al genu, correlaciona con las de las 6 zonas (A a F) del LPF derecho (r entre 0.40 y 0.51 p<0.02) y las superficies de las zonas 2 y 3 del CC con la superficie A del LPF derecho (r 0.45 y 0.40 p<0.02). No se hallaron correlaciones significativas entre zonas del CC y LPF izquierdo. Conclusión: La correspondencia entre superficies del CC y del LPF derecho en sujetos femeninos entre los 41 y 84 años son compatibles con variaciones proporcionales entre zonas de ambas estructuras.

374. (377) PRESERVACIÓN DEL SISTEMA VISUAL NO FORMADOR DE IMÁGENES FRENTE AL DAÑO RETINIANO INDUCIDO POR ISQUEMIA DELETÉREA AGUDA

González Fleitas, M.; Dorfman, D.; Rosenstein, R.

Laboratorio NROE, Departamento de Bioquímica Humana, Fac. Medicina, UBA – CEFyBO/CONICET

Las células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs) que expresan el fotopigmento melanopsina, están involucradas en respuestas visuales no formadoras de imágenes, como la sincronización de los ritmos circadianos y el reflejo pupilar. En trabajos previos hemos demostrado que el sistema visual no formador de imágenes se preserva aún en etapas avanzadas de retinopatía diabética experimental. En este trabajo, examinamos el sistema visual no formador de imágenes en un modelo de isquemia retiniana aguda y deletérea. Para ello, en ratas *Wistar* macho adultas se indujo isquemia retiniana por aumento de la presión intraocular a 120 mmHg durante 40 minutos. A los 14 días post-isquemia, se analizó el número total de células ganglionares y de células que expresan melanopsina (por inmunohistoquímica), los niveles de melanopsina (por *Western blot*), el reflejo pupilar aferente (con un estímulo de 1200 lux por 30 segundos), y el transporte anterógrado desde la retina al colículo superior y los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (por transporte de la subunidad β de la toxina del cólera). La isquemia indujo una caída muy significativa en la amplitud de las ondas a y b del electroretinograma ($P < 0.01$) y del número de células ganglionares totales ($\sim 45\%$, $P < 0.01$). Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto al número de células que expresan melanopsina ni a los niveles de este fotopigmento. Las proyecciones retinianas al colículo superior disminuyeron marcadamente en ojos isquémicos, pero se preservaron en forma notable las proyecciones retinianas a los NSQ. El reflejo pupilar aferente no se modificó significativamente en ojos isquémicos. Estos resultados sugieren una particular resistencia del sistema visual no formador de imágenes en general y de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles y sus axones en particular, frente a un daño retiniano de magnitud como el inducido por una isquemia aguda.

375. (466) GALECTINA-1 Y SU POTENCIAL EN LA NEURO-REGENERACIÓN DE LESIONES TRAUMÁTICAS DE MEDULA ESPINAL

Quintá, H.¹; Pasquini, L.¹; Rabinovich, G.²; Pasquini, J.¹
Depto de Química Biológica e IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA-CONICET¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)²

Las Galectinas (Gals) son lectinas que unen β -Galactosidos, que al formar complejos multivalentes con glicoconjugados de la superficie celular inducen señales intracelulares para modular la diferenciación y la sobrevivencia. Recientemente, se describió el rol inmunosupresor de Gal-1 sobre la microglía en patologías autoinmunes neurodegenerativas. Sin embargo, es poco conocida su acción a nivel neuronal. Neuropilin-1 (Nrp-1) es un receptor neuronal, *target* de semaforina 3A (Sema3A), siendo esta última un anti-attractante del crecimiento axonal. Además, está descrito en sistemas no neuronales que Nrp-1 es *target* de Gal-1. Nuestro objetivo fue estudiar el rol de Gal-1 en lesiones traumáticas de médula espinal (LTME), ya que la Sema3A se expresa en LTME e impide la regeneración axonal vía Nrp-1. Utilizamos ratones *knock-out* para Gal-1 a los que se les produjo una LTME completa a nivel torácico (T9-T10), tratados con Gal-1 en distintas concentraciones. Demostramos que el tratamiento con 5 μ g Gal-1 en ratones *Lgals1*^{-/-} produce una recuperación en la motricidad funcional a los 6 días post-lesión que se correlaciona estructuralmente con una repoblación neuronal y una marcada regeneración axonal. También, se evidenció un *turn-off* de la respuesta microglial, no así en los no tratados (*Lgals1*^{+/-} y WT) ni en los WT tratados, en estos últimos se evidenció la presencia de astrocitos hipertróficos en el sitio de lesión. Aumentando la dosis de Gal-1 en ratones WT a 10 μ g (fracción dimerica), se obtuvo una mejor respuesta motora y estructural, por lo cual Gal-1 tendría una acción pro-regenerativa dependiendo la isoforma involucrada (dimerica vs monomérica). Además, Gal-1 agregada exógenamente se unió a la superficie de las motoneuronas lesionadas provocando que Nrp-1 se dispersa en la superficie de las mismas. Esto estaría sugiriendo que Gal-1 dimerica podría actuar impidiendo la unión

de Sema3A al receptor Nrp-1 y bloqueando así su efecto inhibitorio sobre la regeneración neuronal.

ENDOCRINOLOGÍA 4

376. (205) MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL EJE GONADAL DE RATAS MACHO DURANTE DISTINTOS MOMENTOS DEL DESARROLLO SEXUAL PROVOCADO POR LA EXPOSICIÓN A NONYLPHENOL DURANTE LA PREÑEZ Y LA LACTANCIA

Samaniego, Y., Deguiz, M., Ale, E., Carbone, S., Reynoso, R., Scacchi, P., Ponzo, O.
Lab de Endocrinología, Dpto de Cs Fisiológicas, Facultad de Medicina, UBA

El disruptor endócrino nonylphenol (NP) usado en conservas de alimentos presenta acción estrogénica y antiandrogénica. Objetivo: estudiar el efecto sobre el eje reproductor de ratas macho de 15, 30 y 70 días de edad (n= 10-12 por grupo) nacidas de madres expuestas durante la preñez o la lactancia a NP, administrado vía oral a una dosis de 100 (NP100) y 200 (NP 200) mg/kg/d. Los controles (C) solo recibieron el vehículo. Se analizó liberación "ex vivo" hipotalámica de GnRH e hipofisaria de LH (LH-hip) y sérica de LH por RIA. Se consideró significativo $p < 0.05$. El grupo lactancia mostró a los 15 días: GnRH: C: 4.7 ± 0.5 , NP 100: 7.6 ± 0.8 $p < 0.02$, NP 200: 5.0 ± 1.1 ; LH-hip: C: 972.4 ± 91.3 , NP 100: 1113.5 ± 267.1 , NP 200: 1796.4 ± 318.4 $p < 0.03$; la LH sérica no se modificó. A los 30 días: GnRH: C: 8.3 ± 1.5 , NP 100: 25.6 ± 1.4 $p < 0.0001$, NP 200: 21.1 ± 2.1 $p < 0.0002$; LH-hip: C: 2972.7 ± 522.1 , NP 100: 15685 ± 1978 $p < 0.0001$, NP 200: 13423 ± 1101.9 $p < 0.0001$ y LH: C: 4.3 ± 1.4 , NP 100: 23.2 ± 6.3 $p < 0.02$, NP 200: 48.3 ± 5.6 $p < 0.00001$. A los 70 días: GnRH: C: 0.7 ± 0.05 , NP 100: 1.12 ± 0.16 $p < 0.04$, NP 200: 1.67 ± 0.25 $p < 0.01$; LH-hip: C: 1324.6 ± 145.1 , NP 100: 3326.1 ± 267.6 $p < 0.0001$, NP 200: 5630.6 ± 786.1 $p < 0.002$; LH: C: 4.1 ± 1.2 , NP 100: 3.69 ± 1.3 , NP 200: 7.9 ± 0.8 $p < 0.05$. En el grupo preñez a los 15 días: GnRH: C: 0.43 ± 0.1 , NP 100: 7.2 ± 1.3 $p < 0.0003$, NP 200: 0.46 ± 0.2 ; LH-hip: C: 460.8 ± 172.4 , NP 100: 682.5 ± 45.4 , NP 200: 1207 ± 117.2 $p < 0.006$; LH sin diferencias significativas. A los 30 días: GnRH y LH-hip: sin cambios significativos; LH: C: 8.0 ± 0.4 , NP 100: 28.1 ± 6.5 $p < 0.02$, NP 200: 8.8 ± 0.9 . A los 70 días: GnRH: sin cambios significativos; LH-hip: C: 2315.7 ± 297.4 , NP 100: 2640 ± 576.6 , NP 200: 5865 ± 1332 $p < 0.02$; LH: C: 2 ± 1.1 , NP 100: 5.8 ± 0.19 $p < 0.02$, NP 200: 10.6 ± 2.4 $p < 0.006$. La exposición crónica a NP en etapas temprana de la maduración sexual estimula el eje reproductor en ratas macho siendo más evidente en la exposición durante la lactancia

377. (217) CAMBIOS EN LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL EJE REPRODUCTOR DE RATAS HEMBRA PROVOCADO POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL DISRUPTOR ENDOCRINO NONYLPHENOL DURANTE LA MADURACIÓN SEXUAL

Ale, E., Becher, E., Samaniego, Y., Carbone, S., Reynoso, R., Scacchi, P., Ponzo, O.
Lab de Endocrinología, Dpto de Cs Fisiológicas, Facultad de Medicina, UBA

El disruptor endócrino Nonylphenol (NP), utilizado en productos de uso cotidiano como conservas de alimentos, tiene acción estrogénica y antiandrogénica. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la exposición crónica a NP, sobre la regulación del eje reproductor en ratas hembra durante la maduración sexual (n= 10-12). El NP fue administrado vía oral (cánula orogástrica) diariamente a una dosis de 100 (NP100) y 200 (NP 200) mg/kg/d disuelto en aceite de oliva, desde el día 21 de edad hasta el sacrificio (30, 45 y 70 días de edad). Los controles solo recibieron el vehículo oleoso. Se analizó la liberación "ex vivo" hipotalámica de GnRH y adenohipofisaria de FSH y LH (RIA) y la concentración plasmática de estradiol (ELISA). El análisis histológico de las gónadas se realizó con la técnica de H-E. Se consideró significativo $p < 0.05$. El estradiol solo aumentó significativamente a los 70 días

con NP 200 (Control: 23.3 ± 8.7 , NP 100: 28 ± 3.7 , NP 200: 36.1 ± 10 , $p < 0.01$), no evidenciándose diferencias entre los grupos de 30 y 45 días. La liberación de GnRH aumentó con NP 200 a los 45 días de edad y con ambas dosis de NP a los 70 días (Control: 1.36 ± 0.3 , NP 100: 3.14 ± 0.5 , NP 200: 4.73 ± 1.51 , $p < 0.05$). La liberación de LH hipofisaria no se modificó a los 30 y 45 días y aumentó a los 70 días (Control: 130 ± 20 , NP 100: 214.3 ± 20.3 , NP 200: 247.1 ± 41.5 , $p < 0.05$). La liberación de FSH no se modificó en ningún grupo. El grupo NP 100 y 200 tuvo un adelanto de la apertura vaginal (Control: 38.75 ± 1.76 , NP 100: 33.86 ± 1.35 , NP 200: 31.81 ± 1.38 días, $p < 0.01$). El análisis histológico mostró una preponderancia en el número de folículos maduros grandes (antrales) con hipertrofia tecal a mayor edad, demostrándose a los 70 días un número mayor de cuerpos lúteos. La exposición crónica a NP estimula el eje reproductor en forma dosis y tiempo dependiente y provoca cambios histológicos ováricos, siendo esto más evidente con mayor tiempo de exposición.

378. (421) EFECTO DE SGT-1 α Y 14-3-3 σ SOBRE LA REGULACIÓN DE GR Y AR

Mazaira, G.¹, Molinari, A.^{1,2}, Erlejan, A.¹, Galigniana, M.^{1,2}
Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA¹ IBYME - CONICET²

Los receptores esteroidales forman complejos con Hsp90 y una proteína TPR (*tetratricopeptide repeat*). La orientación de sus α -hélices antiparalelas le permite a algunas proteínas TPR asociarse con Hsp90 regulando así el retrotransporte y/o la actividad transcripcional de los receptores. Previamente demostramos que la unión de esteroide favorece el recambio de la proteína TPR FKBP51 por FKBP52, la que favorece el retrotransporte de receptores vía dineína y estimula su actividad transcripcional. Nuestro objetivo fue estudiar los efectos de otras proteínas TPR tales como 14-3-3 σ y SGT-1 α sobre GR y AR habida cuenta que estos receptores poseen acciones opuestas en ciertos tipos de cánceres como el prostático. Mientras que AR se comporta como un oncogén, GR es supresor tumoral. En ausencia de hormona, la fracción nuclear de GR fue significativamente menor ($P \leq 0,05$) que en células normales ($31,5 \pm 4,2\%$) cuando se sobreexpresó a 14-3-3 σ ($20,2 \pm 3,1\%$) o el dominio TPR aislado ($11,3 \pm 2,7\%$), siendo la velocidad de importación de GR menor ($t_{0,5} = 4',8''$ y $12''$ respectivamente). Sin embargo la sobreexpresión de SGT-1 α no afectó significativamente tal propiedad. Ensayos de co-inmuno-precipitación demostraron que 14-3-3 σ forma complejos con GR, pero no así SGT-1 α , sugiriendo que 14-3-3 σ desplaza al complejo FKBP52-dineína. Tanto 14-3-3 σ como SGT-1 α afectaron la actividad transcripcional de GR y AR, pero con patrones de modulación diferentes. Mientras que GR mostró curvas de activación bifásicas con ambas proteínas TPR (i.e., activación seguida de inhibición a mayor expresión), AR fue siempre activado independientemente del nivel de expresión de la proteína TPR. Estos resultados sugieren que la regulación ejercida por SGT-1 α y 14-3-3 σ sobre ambos receptores no sería dependiente de Hsp90 y ocurriría a nivel nuclear, y que sus elevados niveles de expresión como los encontrados en células tumorales prostáticas favorecerían el efecto oncogénico de AR en detrimento del efecto supresor de GR.

379. (576) LA ACTIVIDAD AROMATASA DISMINUYE BAJO LA ACCIÓN DEL AMP CICLICO EN CULTIVO DE EXPLANTOS DE PLACENTAS HUMANAS

Sainz, R., Rivarola, M., Belgorosky, A., Saraco, N.
Hospital de Pediatría J.P. Garrahan

La Aromatasa (Aro) es la enzima clave en la biosíntesis de estrógenos y esta codificada por el gen CYP19. En placenta humana Aro se expresa exclusivamente en sincitiotrofoblasto y los estrógenos tienen un rol crucial en la fisiología placentaria. Recientemente describimos un nuevo ARNm que incluye el intrón 9 (IN9) y genera una proteína más corta e inactiva. Ha sido descrito que el AMPc incrementa la expresión de Aro. Nuestro objetivo es evaluar en cultivo de explantos de placentas humanas a término (h-PL) la regulación de los ARNm de Aro por AMPc, proponiendo una regulación diferente de la variante IN9. Se estudiaron 5 cultivos de

explantos de h-PL. Se midió actividad Aro mediante la producción de estradiol (E2) utilizando testosterona como sustrato. Se evaluó expresión de los ARNm de Aro por RT-PCR en tiempo real con primers específicos para Aro total (CYP19), intrón 9 (IN9) y Aro activa (Arom). Se utilizó β -actina como gen *housekeeping*. Se observó que el AMPc (0.25 μ M) en los 5 cultivos analizados reduce la actividad Aro (E2-AMPc/E2-basal: 0.550 ± 0.091 , media \pm ESM), t-test apareado $p < 0.05$. Aunque con AMPc, la expresión de CYP19/ β -actina pareciera aumentar (AMPc/basal: 1.138 ± 0.100 , media \pm ESM), la relación Arom/CYP19 disminuye (AMPc/basal: 0.746 ± 0.075 , media \pm ESM) t-test apareado $p < 0.05$. Además, el análisis de variantes Arom e IN9 demuestra que la relación Arom/IN9 disminuye significativamente (AMPc/basal: 0.599 ± 0.061 , mean \pm SEM), t-test apareado $p < 0.05$, como fue observado para la actividad Aro. Se describe por primera vez que la actividad Aro se reduce con AMPc así como también la relación Arom/IN9. Dado que la variante IN9 es un ARNm truncado que codifica para una proteína inactiva, sin la región de unión al hemo, proponemos que la expresión de esta variante estaría involucrada en la regulación de la actividad Aro en la placenta humana a término.

380. (107) LA ADMINISTRACIÓN DE INGAP-PP A RATAS NORMALES EJERCE UNA MODULACIÓN POSITIVA SOBRE LA ANGIOGENESIS INSULAR Y LA FUNCIÓN CELULAR β

Roman, C., Maiztegui, B., Flores, L., Borelli, M., Gagliardino, J.

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, UNLP-CONICET

Introducción: La administración de INGAP-PP produce un aumento de la masa y función celular β en ratas normales aunque su mecanismo es aún desconocido. La diferenciación de las células β embrionarias requiere de la presencia de células endoteliales y de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) y de la integrina $\beta 1$. La ausencia de VEGF-A induce la disminución de la masa y función β . **Objetivo:** Estudiar el efecto de INGAP-PP sobre la neogénesis vascular insular y la relación con su efecto modulador sobre la función celular β . **Materiales y Métodos:** Tratamos ratas Wistar macho adultas por 10 días (inyección i.p.) con solución fisiológica (C) o INGAP-PP (500 μ g/día; I). Al momento del sacrificio medimos en plasma glucosa (G), insulina (Ins) y triglicéridos (TG) y calculamos los índices HOMA-IR y $-\beta$. En islotes aislados por digestión con colagenasa, medimos la secreción de Ins (SI) frente a G 3, 8 y 16 mM, el contenido de ADN y la expresión génica y proteica de PDX-1, integrina $\beta 1$ y VEGF-A (qPCR y western blot) y la expresión génica de laminina $\beta 1$ e Ins (qPCR). Otro grupo de ratas C e I fue sometido a una prueba de tolerancia a la glucosa (PTG). **Análisis estadístico:** test-t de Students. **Resultados** (C vs. I; * $p < 0,05$): INGAP-PP no produjo cambios en los parámetros séricos, los índices HOMA, y la PTG. En islotes de ratas I disminuyó el contenido de ADN ($26 \pm 1,3$ vs. $18 \pm 1,2^*$ ng/islote) y aumentó la SI frente a G 16 mM ($0,01 \pm 0,001$ vs. $0,02 \pm 0,001^*$ ng ins/ng ADN), el nivel proteico de integrina $\beta 1$ (100 ± 21 vs. $191 \pm 18^*$ %) y los niveles de ARNm de PDX-1 ($100 \pm 1,82$ vs. 221 ± 77 %), Ins ($100 \pm 0,09$ vs. 123 ± 19 %), integrina $\beta 1$ ($100 \pm 3,15$ vs. $698 \pm 29^*$ %), laminina $\beta 1$ ($100 \pm 3,5$ vs. 201 ± 72 %) y VEGF-A ($100 \pm 0,22$ vs. 130 ± 34 %). **Conclusión:** El aumento en los marcadores de neogénesis vascular sugiere que la modulación positiva de INGAP-PP sobre la función secretora β estaría mediada por un aumento de la angiogénesis.

GENÉTICA 1

381. (5) RETINOBLASTOMA: ANÁLISIS MOLECULAR DE CASOS FAMILIARES Y ESPORÁDICOS MEDIANTE DIVERSAS METODOLOGÍAS

Ottaviani, D.¹; Alfaro, G.²; Luce, L.¹; Bergonzi, F.³; Ferrer, M.²; Giliberto, F.¹; Szijan, I.¹

Laboratorio de Neurobiología Molecular-Hospital de Clínicas-UBA¹ Servicio de Neurobiología-Fac.de Medicina-

Hospital de Clínicas-UBA² Servicio de Genética-Hospital de Clínicas-UBA³

El retinoblastoma (Rb), cáncer ocular de la niñez, puede ser hereditario (40%) o no hereditario (60%). Se origina por mutaciones en el gen *RB1* (13q14): aberraciones cromosómicas (5%), deleción/duplicación de exones (15%) y mutaciones puntuales (80%). El objetivo es el análisis de 4 casos de Rb: identificar la mutación *RB1* y analizarla en el contexto de la presentación fenotípica de cada caso. Los pacientes estudiados fueron: (a) una familia con dos afectados, uno de ellos con segunda neoplasia; (b) dos primos segundos con Rb uni y bilateral respectivamente; (c) paciente unilateral enucleada; (d) paciente con Rb trilateral. Se analizó la segregación de 6 polimorfismos intragénicos para determinar el haplotipo de riesgo y la pérdida de heterocigosis (LOH) en el tumor. Todos los pacientes fueron analizados por secuenciación del promotor y los 27 exones de *RB1*, y por MLPA. Se realizó análisis FISH en un paciente. Se obtuvieron los siguientes Resultados: (a) Se identificó el haplotipo de riesgo en la familia y se detectaron dos posibles portadores asintomáticos, pero no se encontró la mutación en *RB1*. (b) Se detectó un haplotipo diferente en los primos segundos. Se identificó una deleción de 2 exones en la paciente bilateral, ausente en el paciente unilateral. Se evidenció una recombinación en la hermana de este paciente. (c) Se detectó LOH y se identificó la 1ª mutación en el ADN tumoral, confirmando su origen somático y no hereditario. (d) Se identificó la mutación germinal en el Rb trilateral. El hallazgo de la mutación en el paciente permite el asesoramiento genético a las familias afectadas: probabilidad de transmisión y de desarrollar segundas neoplasias como consecuencia de portar una mutación germinal en el gen supresor tumoral *RB1*. El empleo de diferentes metodologías complementa el estudio genético y es imprescindible para realizar el diagnóstico certero.

382. (73) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HEMOGLOBINAS INESTABLES EN EL GEN HBB. IDENTIFICACIÓN DE DOS NUEVAS MUTACIONES: HBB:C.270_273DELGTGAG(P.GLU90CYSFS*67) Y HBB:C.182_187DELGAAGG(P.VAL60_LYS61)
Scheps, K.¹; Olcese, C.¹; Pennesi, S.²; Varela, V.¹
INIGEM¹ Servicio de Onco-Hematología Pediátrica, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"²

Mutaciones en el gen HBB, pueden generar variantes estructurales inestables de Hemoglobina (Hb) que dan origen anemias hemolíticas con gran variabilidad clínica, desde formas silentes a transfusión-dependientes. **Objetivo:** Caracterizar el defecto molecular en pacientes con anemias hemolíticas y sospecha de hemoglobinopatías estructurales. Se analizó el ADN genómico de 5 pacientes pediátricos con patrones hematológicos de anemia hemolítica (2 en régimen transfusional). En 2, se pudo detectar una banda electroforética anómala en bajo porcentaje. Se analizó por secuenciación automática el gen HBB y sus secuencias flanqueantes. En 2 muestras, se clonó el producto de amplificación en pGEM[®]-T Easy Vector Systems y se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α ; los plásmidos purificados se secuenciaron. Se realizó el análisis bioinformático de las mutaciones con los programas Jpred3 y FoldX 3.0 Beta3 Los 5 pacientes presentaron mutaciones, en estado heterocigota: Hb M-Saskatoon: HBB:c.190C>T(beta63(E7)His>Tyr); Hb Saint Etienne: HBB:c.279C>G(beta 92(F8) His>Gln); Hb Durhan-N.C: HBB:c.344T>C(beta 114(G16) Leu>Pro) y 2 mutaciones no descriptas previamente: HBB:c.267_290delTGAG(p.Glu90Cysfs*67) cambia el marco de lectura con síntesis de una cadena de B-globina de 155 aminoácidos y HBB:c.182_187delGAAGG(p.Val60_Lys61). Estas últimas fueron confirmadas por clonado y secuenciación. En todos los casos se vieron afectados aminoácidos clave en la estructura y función proteica y en el caso de HBB:c.267_290delTGAG se sintetiza una proteína elongada. Las anemias hemolíticas asociados a mutaciones en HBB pueden ser clínicamente importantes produciendo cuadros hematológicos de magnitud variable. El análisis molecular permitió establecer un diagnóstico definitivo. El análisis bioinformático es una herramienta

útil para interpretar y relacionar los cuadros clínicos observados con las mutaciones identificadas.

383. (89) DISTROFINOPATÍA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y RELACIÓN FENOTÍPICA. ESTIMACIÓN DE RIESGO DE SER PORTADORA EN MUJERES DE CASOS ESPORÁDICOS MEDIANTE ESTUDIO DE MLPA
Luce, L.¹; Ottaviani, D.¹; Ferrer, M.²; Szijan, I.¹; Giliberto, F.¹
Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Bioquímica UBA¹ División de Neurocirugía, Hospital de Clínicas "José de San Martín" -UBA²

Las Distrofinopatías son enfermedades recesivas ligadas al X, producidas por mutaciones en el gen de la distrofina, el tipo de mutación define tres cuadros fenotípicos diferentes. Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (DMB) y Cardiomiopatía Dilatada Ligada al X (CDLX). La DMD resulta de una pérdida total de la proteína distrofina, la DMB de una expresión reducida o truncada pero parcialmente funcional y la CDLX por pérdida selectiva de distrofina en corazón. El objetivo del trabajo es ilustrar las diferentes distrofinopatías a nivel molecular y estimar de probabilidad de transmitir estas enfermedades en mujeres de casos esporádicos. Se analizaron 4 afectados con diferentes características clínicas, 2 con sintomatología grave tipo DMD, 1 leve tipo Becker y 1 con CDLX. Por otro lado, se estudiaron 3 familias con madres y hermanas de afectados con DMD esporádico. Las técnicas moleculares utilizadas fueron PCRs simplex y multiplex, estudios de segregación de alelos y MLPA. Resultados de varones con distrofinopatía: 1. Fenotipo Becker, deleción de exón 23 sin corrimiento del marco de lectura (CML). 2. Fenotipo DMD, deleción de exón 3 al 23 inclusive sin CML. 3. Fenotipo DMD, deleción de exón 39 al 62 inclusive con CML (codón Stop UGA a 65 bases). 4. Fenotipo CDLX, deleción de exón 45 al 48 sin CML. Por otro lado, se estimaron los riesgos de ser portadora en las mujeres analizadas ($1 \leq 10\%$ y $4 \leq$) en base a métodos bayesianos y al resultado de diferentes metodologías moleculares aplicadas. El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen estas patologías tiene una significancia no solo para el diagnóstico y la prevención de estas enfermedades sino también en el desarrollo de tratamientos basados en el genotipo específico de cada paciente que intentan modificar el defecto primario de la enfermedad.

384. (124) SÍNDROME DE CARCINOMA BASOCELULAR NEVOIDE (SCBCN): ANÁLISIS PRELIMINAR DE MUTACIONES EN EL GEN PTCH1
Martínez, M.¹; Mazzuoccolo, L.²; González, A.³; Romano, V.²; Martínez, A.²; Maskin, M.²; Muchnik, C.¹; Stengel, F.²; Azurmendi, P.¹
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA.¹ Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas, C.E.M.I.C.² Instituto Ángel H. Roffo, UBA.³

El gen PTCH1 - homólogo al gen de polaridad de segmento en *Drosophila* - ha sido identificado como responsable del desarrollo de SCBCN ó Síndrome de Gorlin en el 65% de los casos. El mecanismo molecular postulado involucra una mutación germinal y posterior inactivación somática de otro alelo sano (fenómeno de *second-hit*). Sin embargo, la evidencia existente en tejido carcinomatoso epidérmico es escasa, por lo que nos propusimos establecer los cambios genéticos - germinales o somáticos - en muestras de sangre, tejido tumoral y normal de 14 pacientes con SCBCN. Se amplificó por PCR la región codificante del gen PTCH1 en cada muestra y se secuenció bidireccionalmente. Se analizó la patogenicidad de los cambios por su presencia en bases de datos públicas, ausencia en 20 muestras controles y análisis con programas bioinformáticos de predicción. Se consideró origen germinal si el cambio estaba presente en los 3 tipos de muestras y somático si se presentaba sólo en tumor. Se detectaron mutaciones en 6 pacientes: 5 deleciones [deleción de exón 11, c.513 delC, c.1392 del14bp, c.1581 del4bp, c.2309 del4bp], 1 duplicación [c.1375 dupl25bp] y 2 sustituciones [c.3587 C>T y c.3277 A>G], todas ellas no descriptas previamente. Dos fueron

de origen somático (c.3587 C>T y c.1581 del4bp) en pacientes con una delección de 14pb en exón 10 y del exón 11 completo, respectivamente, mientras que las 4 restantes fueron germinales. Adicionalmente, se encontraron 11 variantes neutrales ya descritas (10 sustituciones y 1 microsatélite) y 2 noveles (c. 3341 G>A y c.202-80 dupl25bp). Según los resultados obtenidos hasta el momento, las mutaciones en PTCH1 están presentes en el 43% de nuestros pacientes con SCBCN. Además, demostramos que un tercio de dichos pacientes presentan el fenómeno de *second-hit* en la muestra de tumor. Esto indicaría que alteraciones tanto germinales como somáticas en éste u otro gen estarían involucradas en la patogénesis de la enfermedad.

385. (672) BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN NF2 EN PACIENTES CON NEUROFIBROMATOSIS 2 FAMILIAR Y NO FAMILIAR

Alfaro, G.¹; Ottaviani, D.²; Giliberto, F.²; Ciavarelli, P.³; Basso, A.³; Szijan, I.²; Ferrer, M.¹
Laboratorio de Neurobiología Molecular- División Neurociología- HCJSM-UBA.¹ Cátedra de Genética y Biología Molecular- Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA² División Neurocirugía- HCJSM-UBA³

La Neurofibromatosis 2 (NF2) es un síndrome tumoral hereditario o no, con fenotipo complejo, que comprende manifestaciones tumorales y no tumorales. Se caracteriza por el desarrollo de Schwannomas vestibulares bilaterales y de Meningiomas y Ependimomas. El gen responsable *NF2* (22q12) codifica para una proteína denominada merlina con funciones estructurales y de supresor tumoral. Los tumores se consideran benignos pero su localización produce una morbilidad muy significativa e incluso la muerte. Es una enfermedad de diagnóstico complejo en la infancia y las mutaciones "de novo" son superiores al 50%, por lo cual el diagnóstico molecular es importante para la toma de decisiones terapéuticas. Nuestro objetivo es identificar la mutación responsable en pacientes con y sin antecedentes y establecer el riesgo en los familiares. Se analizaron 4 pacientes, uno de ellos con antecedentes familiares. Para conformar los haplotipos se analizaron 4 polimorfismos: 3 STRs intragénicos y uno extragénico, analizando también la pérdida de heterocigocidad (LOH) en el tumor. La búsqueda de mutaciones se realizó por secuenciación de los 17 exones del gen *NF2*. La LOH permitió determinar el haplotipo de riesgo en un caso "de novo" y el análisis de mutaciones fue informativo en 3. El paciente con LOH mostró en el exón 10 una sustitución T>G en el sitio de splicing en sangre y tumor. En el 2 caso "de novo": una sustitución T>C en el exón 8, en sangre, altera el sitio de splicing. En el 3º caso "de novo": una sustitución A>T a 40 pb del exón 13 podría ser un polimorfismo. En el caso familiar se encontró una sustitución G>T en el exón 15 que transforma un codón GAA en TAA (stop). La identificación del haplotipo de riesgo y/o de la mutación permite el rastreo de su presencia en la descendencia de dos familias. Los dos casos de alteración del sitio de splicing confirman la correlación genotipo/fenotipo que corresponde a clínica severa de acuerdo con publicaciones previas.

386. (686) ENSAYO DE LA UTILIDAD DE PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS EN LA EVALUACIÓN DEL EFECTO DE SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS (AAS)

Martínez, M.¹; Muchnik, C.²; Fraga, A.²; Oddo, E.²; Arrizurieta, E.²³; Martín, R.²³⁴; Azurmendi, P.²
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA.¹ Lab. Riñón Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA.² CONICET³ Hospital Universitario Austral, Universidad Austral⁴

En la actualidad, predecir los efectos biológicos de las AAS es un desafío frecuente y complejo. Existen métodos bioinformáticos que analizan la homología de secuencia, la estructura y la asignación de funciones a una secuencia por comparación con los conocimientos biológicos disponibles (annotation). Sin embargo, no hay estudios comparativos del desempeño de los distintos programas sobre proteínas con diferentes niveles de conocimientos respecto

de su función/estructura. Nuestro objetivo es comparar diferentes métodos de predicción sobre AAS en proteínas responsables de dos enfermedades altamente prevalentes como la enfermedad de Alzheimer y poliquistosis renal autosómica dominante: proteína precursora de amiloide (APP) - con pruebas funcionales - y policistina-2 (PC2) -sin pruebas disponibles-, respectivamente. Estudiamos 27 AAS en APP y 23 en PC2 provenientes de bases de datos públicas utilizando los programas SIFT (secuencia), PolyPhen (secuencia, estructura y annotation) y DiANNA (estructura) y los resultados funcionales en 15 variantes patogénicas de APP. SIFT y PolyPhen muestran similar sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo para APP y PC2, mientras que mostraron mayor valor predictivo negativo para PC2 (73 y 100%, $p < 0.01$, respectivamente). APP no muestra modificaciones por DiANNA, mientras que 2 AAS neutrales en PC2 modifican la estructura. De las 15 variantes con pruebas funcionales para APP, PolyPhen concuerda con 14 mientras que SIFT solo con 9. El análisis bioinformático es útil para guiar futuros experimentos y no para uso diagnóstico. La evaluación de estructura no modifica los resultados, aún con información funcional/estructural disponible. La ausencia de reportes funcionales en AAS neutrales de APP resalta la importancia de mejorar el diseño de los estudios de búsqueda de mutaciones y la interacción entre la investigación básica y aplicada para tal fin.

387. (818) ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN DE DUOX2 EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO CONGENITO POR BLOQUEO DE ORGANIFICACIÓN DE YODO

Belforte, F.¹²; Osorio Larroche, C.²¹; Olcese, C.¹²; Citterio, C.¹²; Targovnik, H.¹²; Rivolta, C.¹²
Lab. de Genética y Biología Molecular, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM UBA-CONICET), Hosp. de Clínicas¹ Cátedra de Genética y Biología Molecular, FFyB-UBA²

El hipotiroidismo congénito, de alta prevalencia (1/2100), es un desorden primario con un modo de herencia autosómico recesivo. Los bloqueos de organificación de yodo representan el 10% de los casos, pudiendo ser causados por defectos en la tiroperoxidasa (TPO) o en proteínas vinculadas con la síntesis de H₂O₂ (Sistema DUOX). Se partió de una población de 36 pacientes con diagnóstico de hipotiroidismo congénito, bocio y test de descarga de perclorato positivo en los cuales no se habían identificado, en una primera etapa, mutaciones en el gen de TPO. Con el objetivo de identificar posibles alteraciones en el gen de dual oxidasa 2 (DUOX2) se amplificaron por PCR los 33 exones de DUOX2 y sus regiones intrónicas flanqueantes. Los productos fueron analizados por SSCP y aquellos con migración diferencial fueron secuenciados. Se realizó el análisis bioinformático predictivo de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas mutadas y la exploración del grado de conservación evolutiva de las mismas. Se identificaron tres nuevas mutaciones en el gen de Duox2: c.1057_1058delTT (exón 9), p.F353fsX388; c. 3264_3267 delCAGC, p.A1088fsX1100 (exón 24) y g.IVS17-1G>C (Intrón 17). Se evidenció también la mutación c.1271T>G, p.Y425X (exón 11) descripta previamente. Se identificaron dos polimorfismos descriptos y uno nuevo respectivamente: c.413C>T, p.Pro138Leu (exón 4); c.908C>G, p.Pro303Arg (exón 7) y c.1043A>G, p.N348S (exón 11) junto con dos variantes raras de secuencia: g.IVS27+9C>T (Intrón 27) y c.3042G>A, p.A1014A (exón 24). Teniendo en cuenta que esta patología es una de las causas más comunes de retraso mental prevenible con instauración temprana del tratamiento de reemplazo hormonal, el empleo de las citadas técnicas de biología molecular es de utilidad para la comprensión de la fisiopatología molecular del hipotiroidismo neonatal así como también mejorar su diagnóstico asegurando tanto el asesoramiento genético a las familias afectadas como un adecuado tratamiento.

INMUNOLOGÍA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS 3

388. (44) CÉLULAS SUPRESORAS MIELOIDES SENSIBLES A 5-FLUOROURACILO REGULAN LA INFLAMACIÓN

DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI

Arocena, A., Onofrio, L., Paroli, A., Cano, R., Aoki, M., Gea, S.
 CIBICI Conicet. Dpto Bioquímica Clínica UNR

Las células supresoras mieloides (CSM), CD11b+Gr1+, se incrementan en distintas enfermedades. Previamente demostramos un aumento de estas células en hígado y bazo de BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi*. Esta cepa presentó menor mortalidad y daño tisular que la C57BL/6. Objetivo: Evaluar la participación de esta población celular durante la infección aguda con 1000 tripomastigotes (Tulahuen) mediante inyección i.p. de 5-fluorouracilo (5FU) 50 mg/kg en ratones BALB/c, con demostrada acción para eliminar principalmente CSM, en comparación a controles infectados (C). Resultados: una simple dosis de 5FU a los 15 días post infección (dpi) produjo una fuerte disminución de la sobrevida, a los 21 dpi, respecto de los C (18,75% vs 100%). La parasitemia evaluada a los 19 dpi, previo a la muerte de los animales, estuvo incrementada en ratones tratados con 5FU vs C (19×10^6 vs 7×10^6 parásitos/ml). Paralelamente se evaluó el nº absoluto de CD11b+Gr1+ en bazo y células infiltrantes de hígado. Se observó un descenso pronunciado de estas células en los grupos-5FU, tanto en las que infiltran el hígado (28000 vs 520000 células)-18 veces, como en bazo ($4,8 \times 10^5$ vs 25×10^6 células)-5 veces. Al estudiar la funcionalidad de CSM mediante ensayos de proliferación con ConA, se observó una recuperación de esta respuesta con esplenocitos provenientes de animales-5FU vs C (38000 ± 3000 vs 7000 ± 600 cpm). Mayores niveles de IL6 e IFN γ séricas se detectaron en ratones inyectados con 5FU vs C (4400 vs 1500 pg/ml y 6300 vs 4500 pg/ml respectivamente). Interesantemente, se observó una disminución significativa del número de células TCD3+ de ratones 5FU que presentan nitrotirosilación de superficie ($p < 0,01$) Conclusión: La carencia de CSM generaría una respuesta inflamatoria exacerbada que contribuye a la mortalidad de los animales infectados. Esta población jugaría un rol importante en la regulación de la inflamación y el mantenimiento de la homeostasis durante la infección aguda con *T. cruzi*

389. (437) TRYPANOSOMA CRUZI, VÍA SU TRANSIALIDASA, INDUCE LA PRODUCCIÓN DE IL-17, PERO NO DE IL-10, IFN γ O IL-12 POR LINFOCITOS B POR UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE RORGT/A

Fiocca Vernengo, F.¹, Bermejo, D.¹, Amezcua Vesely, M.¹, Gorosito Serrán, M.¹, Montes, C.¹, Mucci, J.², Campetella, O.², Acosta Rodríguez, E.¹, Gruppi, A.¹
 CIBICI - CONICET, Facultad de Cs. Químicas, UNC, Córdoba Capital¹ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM²

Recientemente identificamos que linfocitos (Li) B de ratones infectados con *T. cruzi*, con fenotipo de células activadas y/o plasmática, producen IL-17. Mediante experimentos *in vitro* determinamos que el *T. cruzi*, a través de su enzima transialidasa (Ts), estimula la producción de IL-17 en LiB de ratones no infectados y que dicha producción depende de la actividad enzimática de Ts, CD45 y Btk (tirosin kinasa de Bruton). El objetivo del presente trabajo fue profundizar los conocimientos sobre la vía de señalización involucrada en la producción de IL-17, y determinar si la acción del *T. cruzi* sobre los LiB estaba circunscripta a IL-17 o si estimula la producción de otras citoquinas. Para ello, LiB maduros esplénicos purificados por "cell sorting" en base a la expresión de CD19, CD21 y CD24 de ratones C57BL/6, fueron cultivados con *T. cruzi* o Ts, durante 48, en presencia o ausencia de diferentes inhibidores farmacológicos. En los sobrenadantes de estos cultivos, se determinó la concentración de IL-17, IL-12, IFN γ e IL-10 mediante ELISA. No se detectó producción de IL-12, IFN γ e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de LiB estimulados con el parásito o su Ts. Observamos que el *T. cruzi* y su Ts estimula la producción de IL-17 y que la misma no es inhibida por PGE2 (inhibidor del factor de transcripción interferon regulatory factor 4, IRF-4) o por SR1001 (inhibidor de ROR-a y ROR-gt), aunque sí por UO126 (inhibidor de Erk1/2) y por CH-223191 (inhibidor de AhR). Resultados similares

fueron obtenidos en sobrenadantes de cultivos de células A20 (línea celular de linfoma B murino de ratones BALB/c) incubadas con el *T. cruzi* o Ts. Los resultados analizados, en conjunto a datos previos, indican que el *T. cruzi*, vía su Ts, induce la producción de IL-17 a través de una cascada de señalización que es independiente de RORgt y ROR-a pero que involucra Btk, Src kinasas, Erk1/2 y probablemente al factor de transcripción AhR.

390. (512) LIGANDOS DE PPAR ALPHA Y PPAR GAMMA INHIBEN LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON CEPAS DE DISTINTA LETALIDAD DE TRYPANOSOMA CRUZI

Penas, F.¹, Vera, M.¹, Mirkin, G.¹, Hovsepian, E.¹, Sales, M.², Goren, N.¹
 IMPaM-UBA, CONICET¹ CEFYBO-UBA, CONICET²

Los macrófagos, principales productores de mediadores inflamatorios, son unas de las primeras células del organismo en ser invadidas tras la infección con *Trypanosoma cruzi* (*Tc*). Los Receptores Activados por Factores de Proliferación Peroxisomal (PPAR) alpha y PPAR gamma son factores de transcripción dependientes de ligandos que participan en la modulación de la inflamación. Sin embargo el papel de PPAR en la enfermedad de Chagas aun no ha sido del todo estudiado. En este trabajo evaluamos el papel de ligandos PPARa y PPARg en la resolución de la respuesta inflamatoria, en macrófagos peritoneales provenientes de ratones BALB/c infectados con la cepa letal, RA, y no letal, K98, de *Tc*. En primer lugar observamos, mediante Q-RT-PCR, aumento en los niveles de expresión de PPARa y PPARg, tras la infección con ambas cepas de *Tc* (RA: C: $1,2 \pm 0,9$; PPARa: $14,8 \pm 1,8$; PPARg: $12,3 \pm 2,5$. K98: C: $1,3 \pm 0,7$; PPARa: $9,4 \pm 1,2$; PPARg: $13,4 \pm 2,8$, $p < 0,05$). Nos propusimos evaluar en ambos modelos de infección, si el tratamiento con ligandos específicos PPARa: Wy14643 (Wy) y PPARg: 15-Deoxi- $\Delta^{12,14}$ ProstaglandinaJ2 (15d), inhiben la expresión de Óxido Nítrico (NO) Sintasa 2 (NOS2) así como la producción NO. Observamos, mediante Western Blot que el tratamiento con ambos ligandos inhibió significativamente la expresión de NOS2. Además, determinamos disminución en la producción *in vivo* de NO con DAF-FM ($p < 0,05$) y en la liberación de NO (Griess) luego de ambos tratamientos (μ M: 15d:29,4%RA; 36,7%K98. Wy: 38,9%RA; 46,5%K98 $p < 0,05$). Por último, logramos demostrar mediante Q-RT-PCR, que los ligandos PPARa y PPARg inhiben significativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF-a) en los macrófagos peritoneales, provenientes de ratones infectados con una u otra cepa de *Tc*. Los resultados, nos indican que ambas cepas inducen una importante respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales, y que esta respuesta puede ser inhibida por ligandos de PPARa y PPARg.

391. (684) LOS LINFOCITOS B DE RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI PRODUCEN IL-17 EN RESPUESTA A LA TRANSIALIDASA ACTIVA DEL PARÁSITO VÍA CD45 Y BTK-TEC

Bermejo, D.¹, Jackson, S.², Amezcua Vesely, M.¹, Acosta Rodríguez, E.¹, Gorosito Serrán, M.¹, Fiocca Vernengo, F.¹, Sather, B.², Mucci, J.³, Campetella, O.³, Oukka, M.², Rawlings, D.³, Gruppi, A.¹
 CIBICI-CONICET¹ SCRI, Seattle, WA, USA² Inst de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM, Argentina³

IL-17 juega un rol importante en la protección frente a *T. cruzi* modulando la respuesta inflamatoria mediada por IFN γ . En la etapa aguda de la infección, IL-17 es producida por linfocitos (Li) T CD4⁺ y CD8⁺, LiT $\gamma\delta$, NKT, neutrófilos y por poblaciones que no expresan marcadores de estos linajes. Para identificar estas últimas, ratones BL6 fueron infectados con 10000 tripomastigotes (cepa Y-Br) y las poblaciones productoras de IL-17 fueron estudiadas por citometría de flujo. Determinamos que gran parte de las células IL-17⁺ expresan CD19 y B220, marcadores del linaje B y que, en concordancia, estas células están ausentes en ratones μ MT (deficientes en LiB maduros) infectados. Mediante ensayos *in vitro* observamos que LiB maduros purificados y cultivados con

tripomastigotes del *T. cruzi* o con transialidasa (Ts) parasitaria producen IL-17. Esta producción depende de la actividad enzimática de Ts ya que Acs dirigidos contra el sitio activo de esta enzima inhiben la producción de IL-17 por LiB estimulados con Ts o *T. cruzi*. Evaluando las señales involucradas determinamos que es dependiente de CD45 ya que LiB tratados con un inhibidor farmacológico de CD45 o provenientes de ratones CD45KO no producen IL-17 en respuesta a *T. cruzi* o Ts. Además, utilizando inhibidores de Btk y Src kinasas así como LiB de ratones Btk KO, establecimos que la producción de IL-17 en este sistema depende de ambas kinasas. En contraste, LiB de ratones galectina-1 y -3 doble KO, así como MyD88, PKC β o ROR γ KO producen IL-17 al ser cultivados con *T. cruzi* o Ts y que LiB obtenidos de ratones IL-6 e IL-23R KO infectados expresan IL-17, indicando que el mecanismo es independiente de todos estos mediadores. LiB obtenidos de amígdalas humanas también producen IL-17 en respuesta a *T. cruzi* y Ts por un mecanismo que involucra CD45 y Btk. Nuestros resultados señalan a los LiB como una novedosa fuente de IL-17 en la infección con *T. cruzi*, determinando el mecanismo y las vías de señalización involucradas.

392. (681) ESTUDIO DE UNA PROTEÍNA TIPO MUCINA, FHMUC, COMO CANDIDATO VACUNAL CONTRA LA FASCIOLOSIS EN UN MODELO MURINO

Noya, V.¹, Brossard, N.¹, Berasain, P.², Carmona, C.², Freire, T.¹

Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Uruguay¹ Instituto de Higiene, Uruguay²

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria causada por el trematodo hermafrodita *Fasciola hepática* que afecta principalmente al ganado ovino y bovino e incluso al hombre. Además de los problemas que dicho patógeno genera a nivel de la salud humana, el mismo ocasiona grandes pérdidas económicas a nivel de la producción agropecuaria, por el decomiso de hígados, y el decremento en el engorde y fertilidad de los animales infectados. En Uruguay se ha constatado la presencia del parásito en todo el territorio nacional. En este contexto, nuestro trabajo consiste en la evaluación del potencial protector contra la fasciolosis de una proteína tipo mucina del parásito, denominada Fhmuc, la cual se expresa en el estadio infectivo del mismo. Con este fin, hemos desarrollado un modelo de infección en murinos, el cual se ha verificado tanto a nivel humoral como histológico, pudiéndose diferenciar entre animales sanos e infectados. Paralelamente, hemos evaluado las propiedades inmunológicas de Fhmuc, la cual induce una respuesta inmune celular de tipo Th1 y es capaz de interactuar así como de estimular a las células dendríticas (CDs). Observamos que Fhmuc es internalizada por las CDs y promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias en presencia de LPS. La producción de IL-12 e IFN γ también ha sido verificada *in vivo*, en animales inmunizados con Fhmuc y LPS. Además, nuestros resultados preliminares muestran que Fhmuc protege de la infección por el parásito, como lo demuestra el menor daño hepático encontrado en animales infectados que fueron previamente inmunizados con Fhmuc. Dichos resultados alentadores nos conducen a profundizar en el estudio de Fhmuc como candidato vacunal contra la fasciolosis.

393. (627) RESPUESTAS INMUNES ADAPTATIVAS EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE BOVINOS LUEGO DE LA INFECCIÓN ORONASAL CON EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Pega, J.^{1,2}, Bucafusco, D.^{1,2}, Di Giacomo, S.¹, Stafforini, G.^{1,2}, Malacari, D.¹, Schammas, J.¹, Capozzo, A.^{1,2}, Borca, M.³, Pérez Filgueira, M.^{1,2}

Instituto de Virología, CICVyA, INTA¹ CONICET, Argentina² PIADC-ARS, USDA, EE.UU.³

La infección con el virus de la Fiebre Aftosa (VFA) por vía oronasal en bovinos naïve induce una respuesta de anticuerpos local consistente con una inmunidad de tipo T-independiente. En este trabajo, estudiamos la aparición de células secretoras de anticuerpos (CSA) en órganos linfoides del tracto respiratorio, inducida por la vacunación y luego de la infección aerógena por

VFA. Para ello, se inmunizaron intramuscularmente 16 bovinos con una vacuna oleosa de VFA O1 Campos y se estudiaron las CSA específicas a los 7 y 29 días post-vacunación (dpv), y entre 1 y 6 días post-infección (a los 30 dpv, n=2). Células mononucleares del linfonódulo prescapular (PSL) mandibular (ML), traqueobronquial (TBL), retrofaríngeos mediales (MRL) y laterales, tonsila faríngea y bazo, fueron evaluadas mediante un ELISPOT para CSA anti-VFA. La vacunación indujo respuestas desde los 7 dpv en el PSL que drena el sitio de inoculación, las cuales maduraron hasta los 29 dpv. En este tiempo, sin embargo, se detectó una modesta pero consistente respuesta de IgM en todos los tejidos linfoides de mucosas. Tras la infección, los animales no mostraron signos clínicos, y las respuestas de mucosas permanecieron bajas a los 2 y 3 dpi. No obstante, se observó un cambio de isotipo a IgG1 en los órganos más estimulados, TBL y MRL, a los 3 y 4 dpi. Los animales vírgenes infectados sólo mostraron respuestas desde los 4 dpi, mediadas por IgM, y el cambio a IgG1 sólo se observó desde el 6 dpi en el ML. En los vacunados, el *switch* aumentó a los 5 y 6 dpi para incluir todos los órganos analizados. Estos resultados indican que la vacunación sistémica con vacunas anti-VFA induciría una estimulación basal de los tejidos linfoides del tracto respiratorio del bovino, con un patrón mediado por IgM incluso a tiempos tardíos post vacunación. La infección oronasal posterior, sin síntomas clínicos en los animales, indujo un cambio de isotipos temprano y un rápido aumento compatibles con una respuesta secundaria.

394. (128) ROL DE LOS ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN LA INFECCIÓN DE NEONATOS DE LA ESPECIE MACACA MULATTA (MACACO RHESUS) CAUSADA POR UN VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA DE SIMIOS LLEVANDO LA GLICOPROTEÍNA DE ENVOLTURA DE HIV-1

Jaworski, J.^{1,2,3}, Brower, Z.^{2,3}, Sutton, B.^{2,3}, Legasse, A.^{2,3}, Axthelm, M.^{2,3}, Hessel, A.^{2,3}, Haigwood, N.^{2,3}

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria¹ Oregon National Primate Research Center² Oregon Health and Science University³

El HIV-1 provoca una rápida depleción de los LT CD4+ de memoria y una marcada disfunción de los linfocitos B, desencadenando en un plazo variable de tiempo, una profunda inmunosupresión y la muerte. Por ello, uno de los principales objetivos de la vacunación es lograr contener la infección primaria. En este sentido, la administración de anticuerpos neutralizantes ha logrado bloquear la infección causada por el virus SHIV en primates. Con el propósito de estudiar el rol de los anticuerpos neutralizantes en la patogénesis de HIV-1, realizamos un estudio de transferencia pasiva de anticuerpos en primates de la especie *Macaca mulatta*. Un total de 24 neonatos rhesus fueron divididos en cuatro grupos. Cada grupo (n=6) recibió una de las siguientes formulaciones de IgG: (i) IgG Normal, (ii) IgG Normal/b12, (iii) SHIVIG (con capacidad neutralizante específica contra SHIV_{SF162P3}) y (iv) SHIVIG/b12. Las formulaciones fueron administradas por vía subcutánea y 24 horas más tarde, los animales fueron desafiados oralmente con 10 AID₅₀ de virus SHIV_{SF162P3} y monitoreados por 6 meses. El tratamiento con SHIVIG provocó una disminución significativa de la carga viral aguda (P=0.02) y la protección de las poblaciones de linfocitos B en sangre periférica (P<0.05), desencadenando una rápida y potente producción endógena de anticuerpos neutralizantes (P=0.029). Estos anticuerpos sintetizados *de novo* contuvieron la viremia durante la fase crónica de la infección (P=0.04), evitaron la progresión de la enfermedad y aumentaron la supervivencia (P=0.007). A dosis más elevadas, SHIVIG bloqueó la infección en 9 de 12 animales. Estos resultados señalan a la preservación de los linfocitos B como un blanco importante para el desarrollo de vacunas y terapias destinadas a contener la infección causada por HIV-1. En este sentido, la inmunización pasiva con anticuerpos neutralizantes podría ser altamente efectiva, especialmente en la transmisión perinatal de HIV-1.

ONCOLOGÍA 5

395. (306) ROL DEL SISTEMA RETINOIDE Y LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) EN LA SUPERVIVEN-

CIAS, PROPAGACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS STEM/PROGENITORAS DEL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM38-LP

Berardi, D.; Flumian, C.; Diaz Bessone, M.; Cirigliano, S.; Bal De Kier Joffe, E.; Urtreger, A.; Todaro, L.
Instituto de Oncología Angel H Roffo

Se hipotetiza que las células stem tumorales son responsables de la quimioresistencia y el fenotipo metastásico de numerosos tumores mamarios. En el presente trabajo, se utilizaron mamoesferas (cultivos 3D enriquecidos en células stem/progenitoras provenientes de la línea LM38-LP). Estudiamos: A) El perfil de expresión de genes pluripotenciales y la capacidad de regenerar el tumor parental. B) La capacidad de las células de las mamoesferas para generar monocapas, cultivos 3D y mamoesferas secundarias, frente a diferentes tratamientos con retinoides (ATRA 1µM) y/o inhibidores de PKCα/δ (Gö6976 2,5µM/Rottlerina 1µM). Por RT-PCR determinamos que las mamoesferas expresan altos niveles de Nanog, Sox2, C-Myc y p16 respecto de la línea original y son capaces de regenerar el tumor M38 *in vivo*. El tratamiento por 96 hs de las mamoesferas con ATRA y/o Gö6976 produjo retardo del crecimiento (Diámetro a las 96 hs: Control: 200±63 µm vs ATRA/Gö6976: 100±25 µm; p≤0.05). El pre-tratamiento de las mamoesferas con ATRA/inhibidor de PKC afectó la capacidad de formar mamoesferas secundarias (% respecto del control: Gö6976: 14,81%; Rottlerina y ATRA: 75,3%, ATRA+Gö6976: 0% y ATRA+Rottlerina: 40,7%). Asimismo estas células regeneraron monocapas con distinta eficiencia (% de confluencia respecto del control luego de 10 días de cultivo: Gö6976: 5,5, Rottlerina: 77%, ATRA: 77%, ATRA+Gö6976: 5,5%, ATRA+Rottlerina: 55%). Además, mostraron distintas morfologías en cultivo en 3D en matrigel donde la presencia de ATRA indujo la formación de lumen, el tratamiento con Gö6976 evidenció estructuras pequeñas con señales apoptóticas, mientras que el tratamiento con Rottlerina mostro estructuras irregulares de mayor tamaño. Nuestros resultados confirman que la línea LM38-LP presenta células pluripotenciales y que la inhibición de la actividad de PKCα en conjunto con el tratamiento diferenciador retinoide conduciría a la reducción de esta población celular.

396. (483) LA INHIBICIÓN DE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO CON L-NAME MODIFICA LA EXPRESION PROTEICA DEL TUMOR DE VEJIGA MB49

Langle, Y.¹; Monge, M.²; Colomé, N.²; Belgorosky, D.¹; Marino, L.¹; Canals, F.²; Reventos, J.²; Eiján, A.¹
Instituto de Oncología Angel H. Roffo¹ Institut de Recerca Vall d'Hebron²

La producción de óxido nítrico (NO) vía la enzima iNOS es un factor de mal pronóstico en pacientes con cáncer de vejiga (CaV) asociado a recurrencias y progresión tumoral. *In vivo* observamos que L-NAME (inhibidor de la producción de NO) reduce el crecimiento subcutáneo de CaV murino MB49. **Objetivo:** evaluar la actividad de L-NAME sobre a) el crecimiento ortotópico y b) la expresión proteica del tumor MB49. L-NAME reduce el tamaño tumoral (p<0,025). Mediante electroforesis bi-dimensional en geles cuantitativos (2D-DIGE) se detectaron 52 proteínas expresadas diferencialmente en tumores MB49 y MB49+L-NAME. Las mismas se identificaron por espectrometría de masa y mediante la base de datos MASCOT. Entre otras, L-NAME disminuye la expresión de S100-A9, Vimentina, Hemoglobina, Anhidrasa Carbónica 2, Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (isoforma 3) y aumenta Ras suppressor protein1, Brain Creatine Kinase y ApoA1. El tratamiento con L-NAME disminuye S100-A9 (5.6 veces, p<0,008) y Vimentina (1.81 veces, p<0,01), resultados validados por inmunohistoquímica. La angiogénesis (densidad de vasos) fue significativamente menor en los animales tratados con L-NAME (p<0.05) en concordancia con la disminución de 4 veces para la hemoglobina (p<0,001). Para validar el incremento de Ras suppressor protein1 (1.66 veces, p<0,04) se evaluó la activación de la vía MAPK. Los tumores MB49 presentan alta expresión de pERK, que disminuye significativamente en MB49+L-NAME (WB). Conclusión: L-NAME reduce el crecimiento ortotópico del tumor MB49 modificando su perfil proteico. La disminución en protei-

nas S100-A9 (inmunosupresora), Vimentina (transición epitelio mesenquimática) y hemoglobina (angiogénesis), y el incremento de la proteína supresora del oncogen Ras (proliferación) ponen en evidencia que el NO actuaría a varios niveles del crecimiento tumoral, planteando la hipótesis de que la inhibición de la producción de NO en tumores que expresan iNOS podría ser una modalidad terapéutica favorable.

397. (497) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA LECHE FERMENTADA CON LACTOBACILLUS CASEI CRL 431 SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN TUMOR DE MAMA ESTROGENO DEPENDIENTE Y SU METASTASIS USANDO UN MODELO EN RATONES

Aragón, F.¹; Perdigon, G.^{1,2}; De Moreno De Leblanc, A.¹
Centro de Referencia para Lactobacilos - CERELA¹ Cat. de Inmunología, Inst. de Microbiología, Fac. Bioqca, Qca y Fcia. UNT²

Estudios previos demostraron que la administración de una leche fermentada con *Lactobacillus casei* CRL 431 (LF) disminuyó el crecimiento de un tumor mamario en ratones. Considerando que la angiogénesis es crucial para el desarrollo tumoral y su metástasis (MTS), el objetivo fue estudiar el efecto de la LF sobre la neoformación de vasos sanguíneos en el tumor y su relación con futuras MTS, analizando además algunas citoquinas implicadas en estos procesos. Ratones BALB/c recibieron leche (GL) o LF (GLF) durante 10 días, fueron inyectados con células tumorales (ATCC 4T1) continuando con la alimentación respectiva. Se tomaron muestras de sangre y glándula mamaria (GM) para analizar citoquinas (IL-6, TNF-alfa e IL-10) por ELISA e IFI, 20 y 28 días post-inyección tumoral. Por inmunohistoquímica se determinó CD31 en GM y tumor. Para el estudio de MTS, los ratones recibieron leche o LF después que el tumor fue palpable y las muestras de pulmón e hígado se tomaron 80 días post-inyección tumoral. En la GM, las células IL6+ e IL10+ disminuyeron en GLF comparado con GL. Los aumentos de células IL6+ se acompañaron de mayor densidad de CD31 en los tejidos del grupo GL, observada principalmente en GM al día 20 y en los tumores al día 28. La disminución de angiogénesis en los ratones del grupo GLF se relacionó con disminución de MTS en pulmón e hígado, comparados a los del grupo GL (con MTS macro y microscópicas). En este modelo, el grupo GLF mantuvo niveles elevados de IL-10 en suero comparados al grupo GL, en el que también se observó incrementos de IL-10 en los animales con menor número de focos metastásicos. Concluimos que en ambos modelos (tumor primario y MTS), la administración de LF mantuvo una respuesta inmunológica regulada, con disminución de IL-6. Esto influyó el crecimiento del tumor primario, por menor vascularización y posiblemente afectando la síntesis intramamaria de estrógenos, y así también disminuyó los porcentajes de animales que desarrollaron MTS.

398. (503) EVALUACIÓN DEL RIESGO CARCINOGENICO POR EL CONSUMO DE AGUA CON ARSÉNICO EN LOCALIDADES Y PARAJES DE LAS PROVINCIAS DE CHACO Y SANTIAGO DEL ESTERO, ARGENTINA

Navoni, J.; Olmos, V.; Villaamil Lepori, E.
Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

El arsénico (As) es un elemento ubicuo ampliamente distribuido en la naturaleza. Sus propiedades organolépticas lo hacen imperceptible. Este metaloide posee comprobada acción carcinogénica en el hombre. El objetivo del trabajo fue realizar una evaluación de riesgo carcinogénico en una población de una región endémica de hidroarsenicismo. El estudio involucró 650 personas provenientes de 19 localidades/parajes de las provincias de Santiago del Estero y Chaco. Se recolectaron muestras de agua y orina de cada participante. La cuantificación del As en agua (As_{agua}) y del As urinario (AsU), fue realizada mediante generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (GH-EAA). A partir de los resultados de As_{agua}, se calculó la ingesta diaria crónica de As (IDCAs). Para el cálculo del coeficiente de peligrosidad (HQ) se consideró la dosis de referencia de 3.10⁻⁴ (mg/kg)/día y para

el cálculo del riesgo carcinogénico (RC) se utilizó el factor de 1,5 por (mg/kg)/día, ambos sugeridos por la EPA. El nivel de As_{agua} en la zona estudiada, cubrió un rango amplio de concentraciones (desde 1,7 $\mu\text{g/l}$ hasta 2055 $\mu\text{g/l}$). Más del 80% de la población se encontró efectivamente expuesta al As, con niveles de AsU superiores a los valores de intervención, encontrándose valores de hasta 5085 $\mu\text{g/g creat}$. La IDC_{As} estimada mostró un rango entre 0,3 a 138 [10^{-4} (mg/kg)/día]. El 68% de las localidades presentaron un HQ mayor a 1, de las cuales el 54% estuvo comprendido entre 1 y 10 y el 46% mayor de 10. El RC estuvo comprendido entre $5 \cdot 10^{-5}$ y $2,1 \cdot 10^{-2}$. El 74% de las localidades/parajes presentaron un riesgo carcinogénico incrementado. Los centros urbanizados presentarían el mayor número de casos de cáncer (por 100000 habitantes) de 43 para las localidades de baja exposición y de 1030 en la localidad de elevada exposición. Estos resultados califican a la región como de urgencia ambiental y de salud pública.

399. (527) ROR1 PARTICIPA EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DE MELANOMA

Fernández, N.; Lorenzo, D.; Bravo, M.; Lopez Bergami, P. *Instituto de Biología y Medicina Experimental*

Los receptores ROR1 y ROR2 pertenecen a una familia conservada de receptores tirosina quinasa y actualmente son reconocidos como receptores de la vía de señalización de Wnt. Se ha demostrado que ROR2 participa en la vía no canónica de Wnt y está implicado en la migración y polaridad celular mediada por Wnt5a. ROR1 en cambio, fue estudiado con menor profundidad. Se observó su sobreexpresión en leucemia linfocítica crónica confiriendo una mayor supervivencia a estas células. Coincidentemente, ROR1 fue identificada como una quinasa de supervivencia en células HeLa. En este trabajo determinamos que ROR1 se encuentra activo y sobreexpresado en melanoma, lo que nos llevó a determinar su rol en la proliferación, apoptosis, y demás procesos relacionados con el crecimiento tumoral. Generamos dos líneas celulares (A375 y Lu1205) que expresan en forma estable un short hairpin ARN contra ROR1 o control (shARN ROR1 o scramble). La expresión de este shRNA provocó una disminución en los niveles de ARNm y proteína de ROR1. El silenciamiento de ROR1 disminuyó el crecimiento celular un 30% en ambas líneas celulares. Determinamos cambios en la apoptosis por Anexina V e Ioduro de Propidio. El silenciamiento de ROR1 incrementó la apoptosis inducida por privación de suero en las células A375 y Lu1205. El silenciamiento de ROR1 también redujo el crecimiento independiente de anclaje en agar blando. Las células A375 shARN ROR1 dieron origen a un menor número de colonias y de menor tamaño que las generadas por las células control. Estos resultados indican que ROR1 contribuye al crecimiento celular en melanoma. Luego, realizamos ensayos de adhesión cuantificados por tinción con cristal violeta. Las células shARN ROR1 se adhirieron con mayor eficiencia que las scramble indicando que ROR1 está implicado en la adhesión celular. Estos resultados sugieren que la vía de señalización Wnt-ROR1 juega un importante rol en la progresión de melanoma, afectando el crecimiento, la apoptosis y la adhesión celular.

400. (538) LA DEFICIENCIA LOCAL DEL RECEPTOR DE IGF-1 (IGF-1R) MODULA LAS ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO DEL FEOCROMOCITOMA (FEO) MURINO

Martin, A.; Fernández, M.; Mathó, C.; Venara, M.; Pennisi, P. *Centro de Investigaciones Endocrinológicas CEDIE CONICET*

Los IGFs ejercen sus efectos a nivel autocrino, paracrino y endocrino. Hemos demostrado que la disminución de los niveles circulantes de IGF-1 disminuye la incidencia y prolonga el periodo de latencia del feo experimental (acción endocrina). Sin embargo, el rol a nivel local del circuito IGF-1/IGF-1R no ha sido determinado. Nuestros resultados preliminares muestran que la deficiencia local del IGF-1R disminuye la incidencia y retrasa la aparición del feo experimental. **Objetivo:** estudiar el rol del IGF-1/IGF-1R local en las primeras etapas del desarrollo de feo *in vivo* e *in vitro*. **Diseño:** Se inyectaron 1×10^6 MPC sc en ratones machos

con haploinsuficiencia del IGF-1R (IGF-1R^{+/n}, n=41) y controles (C, n=33). Se registró inicio, incidencia y crecimiento tumoral. *In vitro:* cultivos primarios de fibroblastos confluentes de ambos grupos se utilizaron para generar medios condicionados (MC) cada 24h con los que se cultivaron MPC, y matriz diferencial sobre las cuales se sembraron MPC. Se midió la proliferación de las MPC por conteo e incorporación de BrdU en ambas condiciones los días 1,3,5 y 7 de cultivo. **Resultados:** el tiempo de aparición de los tumores se retrasó en el grupo IGF-1R^{+/n} respecto del C [6 vs 5 sem; HR:0.58 IC95%:0.50-1.55, IGF-1R^{+/n} vs C]. El 12.1% de los ratones IGF-1R^{+/n} no desarrolló tumor (p<0.0001, Logrank Test, IGF-1R^{+/n} vs C). La proliferación y el volumen tumoral no se vieron afectados. *In vitro*, la proliferación de las células MPC fue mayor en MC por fibroblastos de ratones C (20 ± 1 vs $13 \pm 2 \times 10^4$ células Cvs IGF-1R^{+/n}, d7, p:0,025) así como sobre matriz diferencial generada por fibroblastos C (23 ± 2 vs $17 \pm 1 \times 10^4$ células, 38 ± 2 vs 28 ± 2 % Cvs IGF-1R^{+/n} d5, p<0,03). **Conclusión:** Nuestros resultados sugieren que el IGF-1 a través del IGF-1R estaría involucrado en las primeras etapas del establecimiento tumoral, tanto en los eventos tempranos de anclaje celular mediante la interacción con la matriz como a través de factores solubles generados por los fibroblastos del microambiente tumoral.

401. (556) INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y ALTERACIÓN EN EL BALANCE REDOX INDUCIDOS EN LÍNEAS CELULARES MAMARIAS Y MELANOCÍTICAS POR EXPOSICIÓN A ALTAS DOSIS DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS

Ventura, C.¹; Núñez, M.¹; Venturino, A.²; Martinel Lamas, D.¹; Miret, N.³; Randi, A.³; Rivera, E.¹; Cocca, C.¹
Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ LIBIQUIMA-IDEPA. CONICET. Universidad Nacional del Comahue.² Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales. Facultad de Medicina, UBA³

El clorpirifos (CPF) es un compuesto organofosforado ampliamente utilizado en la agricultura y en los hogares para el control de plagas e insectos. Previamente hemos demostramos que bajas dosis de CPF inducen proliferación y presentan efecto estrogénico en la línea MCF-7. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del CPF (5×10^{-2} a 50 μM) sobre el crecimiento y el estado redox en líneas derivadas de carcinomas mamarios (MCF-7 y MDA-MB-231) y de melanoma (WM35 y M1/15). La proliferación celular se evaluó mediante recuento clonogénico y el contenido de especies reactivas del oxígeno (ROS) por citometría de flujo. La actividad catalasa se analizó por espectrometría y su expresión por western blot. Se evaluó la peroxidación lipídica por fluorometría. En las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 el CPF 50 μM disminuyó la capacidad clonogénica (60%, p<0,01 y 64%, p<0,001 respectivamente) y aumentó el contenido de ROS (58% en MCF-7 y 114% en MDA-MB-231, p<0,05). Este aumento fue revertido por el agregado de catalasa en la línea MCF-7 y no en la línea MDA-MB-231. En ambas líneas se observó una tendencia creciente en la actividad catalasa, sin cambios en la expresión proteica. Finalmente, el daño lipídico sólo fue incrementado en la línea MCF-7 (52%, p<0,05). En las líneas WM35 y M1/15 el CPF 50 μM disminuyó la capacidad clonogénica (60%, p<0,05 y 40%, p<0,01 respectivamente) y aumentó el nivel de ROS (50% y 60% respectivamente, p<0,05). En la línea WM35, este aumento fue revertido por el agregado de catalasa. La actividad catalasa aumentó en un 30% (p<0,05) en las células WM35 expuestas a CPF 50 μM , sin cambios en la línea M1/15. El aumento en el daño lipídico sólo se observó en las células M1/15 (135%, p<0,05). Resumiendo, el CPF 50 μM disminuyó la proliferación y alteró el balance redox, indicando que el plaguicida induce toxicidad en células mamarias y melanocíticas. Dosis menores de CPF que incrementan la proliferación no indujeron cambios en el balance redox en ninguna de las líneas.

402. (573) DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA EN TEJIDOS NORMALES Y NEOPLÁSICOS DEL RATÓN

Simula, S.; Sabatt, J.; Geffner, J.; Sanjuan, N.

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. UBA

La Clusterina es una glicoproteína con 3 isoformas y se expresa en varios tejidos. Se la ha asociado con varios fenómenos biológicos, entre ellos la pro-apoptosis y la anti-apoptosis. No obstante, no está claro dónde se expresa a nivel subcelular y qué función biológica tiene en cada tejido. El objetivo de este trabajo fue estudiar la localización intracelular y tisular de la Clusterina en diferentes tejidos normales y neoplásicos murinos inducidos por el virus Polioma. Se utilizaron cortes parafinados de mama, glándula salival y riñón de ratones C3H/BI da y neoplasias originadas en los mismos tejidos. La Clusterina fue detectada por inmunoperoxidasa con un suero primario desarrollado en cabra y un secundario en burro marcado con peroxidasa. El revelado se realizó con DAB como cromógeno en forma rutinaria. En el tejido mamario fueron positivos mayoritariamente los núcleos de las células ductales y en los tumores la marcación fue citoplasmática. En el riñón, fue positivo el citoplasma de las células de los túbulos contorneados proximales y distales, preferentemente en forma de casquetes y en los tumores la marcación fue negativa. En la glándula salival la marcación fue citoplasmática en los ductos normales y en las células neoplásicas. Se concluye que la expresión constitutiva de la Clusterina varía en los diferentes tejidos, siendo su distribución nuclear o citoplasmática. Es probable que la función pro o anti-apoptótica de la Clusterina no sea uniforme sino que difiera en cada tipo de neoplasia.

403. (574) LA LIPOFECCIÓN CON EL GEN IFN-B DISMINUYE LA CAPACIDAD MIGRATORIA Y LA ADHESIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA

Rossi, U. ; Finocchiaro, L. ; Glikin, G.
Area de Investigacion, Intituto A. Roffo, UBA

La proteína IFN β modula negativamente la migración de diferentes células del sistema inmune, sin embargo todavía no fue reportado que module la migración de células tumorales. Ensayamos los posibles efectos de la expresión del transgén IFN β sobre la migración y adhesión celular de 3 líneas de melanoma canino y una de melanoma humano. Se evaluó la capacidad migratoria de monocapas a 24 h post-lipofección, mediante un ensayo de "cicatrización de heridas". Este ensayo se realizó en líneas de melanoma canino (OI, Br) resistentes a los efectos anti-proliferativos del IFN β para independizarnos de una variación significativa del número de células. La lipofección con el gen cIFN β provocó una disminución en la migración celular con respecto a β gal, de $96 \pm 8\%$ (relativo al control) a $43 \pm 4\%$ ($p \leq 0,001$) en OI, y de $97 \pm 2\%$ a $64 \pm 6\%$ ($p \leq 0,001$) en Br. El propio medio condicionado produjo una disminución en la migración en OI ($p \leq 0,001$). Se evaluó la capacidad migratoria celular sobre componentes de gelatina en esferoides (de 4 días post-siembra), los esferoides de la línea canina Ak previamente lipofectados con β gal migraron $1,20 \pm 0,20$ veces su área original mientras que los previamente lipofectados con IFN β migraron solo $0,05 \pm 0,08$ ($p \leq 0,001$), también se observó una disminución de la migración en las líneas caninas resistentes OI y Br ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,01$) y en la línea de melanoma humano SB2 ($p \leq 0,01$). Se comprobó la viabilidad de los esferoides con calcemia. Por otro lado, la lipofección con el gen terapéutico disminuyó la adhesión a factores presentes en el suero fetal bovino y/o al colágeno en todas las líneas ensayadas (OI: $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$; Bk: $p \leq 0,001$, $p > 0,05$; Ak: $p \leq 0,01$, $p \leq 0,01$; Br: $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$). Nuestros resultados muestran que el gen IFN β disminuye la capacidad de migración de células tumorales *in vitro*, respaldando resultados en el control de la enfermedad metastática en pruebas clínicas veterinarias practicadas por nuestro grupo de trabajo.

404. (592) TRANSFERRIN AS A POTENTIAL CARRIER IN PHOTODYNAMIC THERAPY (PDT) AND CELL PHOTOTOXICITY INDUCED BY CR(PHEN) $_3$ $^{3+}$

García, P.¹; Cavallo, N.²; Llorens De Los Rios, C.²; Perrone, A.²; Silvero, J.¹; Argello, G.¹; Cabanillas, A.²
INFIQC - CONICET¹ CIBICI - CONICET²

Phenanthroline chromium (III) complexes have been studied as possible photosensitizers to Photodynamic Therapy (PDT). The photochemical and photophysical properties of these complexes make them important compounds to be studied. It is speculated that the Cr(III) complexes have to be carried inside the cell to perform the effect. Our aim was to study the association of the Transferrin (Trf) with Cr(phen) $_3$ $^{3+}$ and its potential capability of transportation to the inner cell. We also studied the toxicity of Cr(phen) $_3$ $^{3+}$ in its fundamental and excited state induced by LED irradiation at 472nm. In order to assess the possible association Trf-Cr(phen) $_3$ $^{3+}$, we used Bhatthacharrya's equation to measure the binding constant (K_b) between the complex and the Trf at different pHs, from 7.40 to 5.40. We used circular dichroism (CD) to evaluate whether the complex induced changes in secondary and tertiary structure of HoloTrf. The results show that the K_b for Trf-Cr(phen) $_3$ $^{3+}$, is pH dependent, being lower at more acidic pHs (5,40-compatible with endosomal compartments), suggesting that the complex could be released inside the cell. From CD experiments, we show that the protein, in presence of the complex, does not suffer conformational changes, indicating that the Trf-Receptor is able to recognize HoloTrf as well as HoloTrf-Cr(phen) $_3$ $^{3+}$. By MTT assay, we studied changes in MDA-MB231 (breast carcinoma) cell viability induced by different concentrations of Cr(III) complex (with or w/o Trf). Cell Viability diminished significantly when the complex is associated to the Trf. It also diminished from 0.942 to 0.797 (relative values) by 10 μ M of complex after the cell were irradiated by a short period of time, which first show that the excited state of the complex induced a higher degree of cytotoxicity than the fundamental state. The results suggest that Trf is a potential carrier of Cr (III) complexes for PDT.

405. (601) ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA CON PORFIRINAS ENDÓGENAS EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN HUMANAS Y MURINAS

Cassinelli, J.; Teijo Mj.; Batlle A.; Fukuda H.
Dep. Qca.Bca-FCEN-UBA y CIPYP-Hosp Clínicas-CONICET-UBA

Las propiedades fotodinámicas de las porfirinas se aplican en la terapia fotodinámica del cáncer (TFD). Cuando se irradia con luz, el fotosensibilizante (FS) acumulado en las células tumorales, produce reacciones fotoquímicas que llevan a la muerte celular. Las porfirinas son los únicos FS sintetizados endógenamente mediante la administración de su precursor biológico, el ácido 5-aminolevulínico (ALA). Se determinaron las condiciones óptimas para aplicar la TFD en células de adenocarcinoma de pulmón murinas (LP07, Instituto AHRoffo) y humanas (A549). Las células se incubaron con ALA bajo diferentes condiciones experimentales, se cuantificaron las porfirinas intracelulares espectrofluorométricamente y se iluminaron con un banco de dos tubos fluorescentes. Se determinó la citotoxicidad del ALA en oscuridad y la viabilidad post TFD mediante el ensayo de MTT. La incubación con ALA 1 mM durante 3 h no fue citotóxica, pero con 24 h se observó toxicidad a partir de 10 mM para A549 y 5 mM para LP07. Al incubar las células LP07 con distintas concentraciones de ALA (0,05 a 5mM) durante distintos tiempos (1 a 5 h), se obtuvo un plateau en la síntesis de porfirinas a 0,5 mM independientemente del tiempo de incubación ($12,8 \pm 0,2$ ng porfirinas/ 10^5 céls.). A las 3 h, ambas líneas alcanzan un plateau con ALA 0,5 mM y para todas las concentraciones ensayadas, A549 presenta mayor acumulación de porfirinas ($23,7 \pm 0,6$ ng porfirinas/ 10^5 céls.). La cinética de acumulación de porfirinas muestra un incremento en la síntesis con el tiempo de incubación (0,5 a 6 h) para ambas líneas, y una mayor síntesis en A549 para todos los tiempos ensayados (6 h incubación, A549: $107,1 \pm 1,6$ ng porfirinas/ 10^5 céls, LP07: $24,1 \pm 0,3$ ng porfirinas/ 10^5 céls.). Al aplicar la TFD en ambas líneas en iguales condiciones (incubación con ALA 1 mM por 3 h), se observó mayor supervivencia celular en todos los tiempos de irradiación para las células LP07. La dosis lumínica letal 50 (DL $_{50}$: tiempo de irradiación en el cual se obtiene una viabilidad celular del 50% 1 h post TFD) fue A549: 7 min, LP07: 10 min. Los

resultados obtenidos indican que las células murinas son menos eficientes que las humanas en la síntesis de porfirinas, lo cual puede contribuir a la mayor supervivencia post TFD observada, y representar un modelo interesante para un ulterior estudio comparativo de supervivencia post tratamiento.

406. (610) ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF-BETA 1 EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA HUMANO MDA-MB-231 POR HEXACLOROBENCENO

Miret, N.¹; Pontillo, C.¹; Chiappini, F.¹; Alvarez, L.¹; Kleiman, D.¹; Ventura, C.²; Cocca, C.²; Randi, A.¹
Lab. Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Dep. Bioquímica Humana, Fac. Med, UBA¹ Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina.²

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado encontrado en leche materna y en leche de consumo humano. Se une al Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (RHA), estimulando vías de señalización de membrana y nucleares. Hemos demostrado que el HCB es co-carcinogénico en la formación de tumores mamarios en rata, e induce migración e invasión en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. El TGF- β 1 regula procesos como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Se une a receptores de membrana y actúa por tres diferentes caminos, uno dependiente de Smad y dos independientes de Smad (PI3K-ERK1/2; JNK-p38) modulando la migración e invasión celular. Nuestro objetivo fue estudiar si el HCB activa las vías de señalización del TGF- β 1 dependientes e independientes de Smad, y si TGF- β 1 y RHA modulan la migración en MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con HCB (0.05 μ M) en curvas de tiempo (0, 5, 15 y 30 min, 2 y 24 hs), o en curvas de dosis con HCB (0, 0.005, 0.05, 0.5 y 5 μ M) durante 5 y 15 min para estudios de inmunoblot. Los ensayos de migración en transwell se realizaron con HCB (5 μ M) a 24 horas con pre-tratamiento de inhibidores del RHA (4,7-PHE y ANF), o con inhibidor de la vía de Smad (SB431542). Nuestros resultados mostraron que el pesticida (0.05 μ M) induce la activación de Smad3 y p38 a los 5 y 15 min ($p < 0.05$), así como de ERK1/2 a los 15 y 30 min ($p < 0.05$). Por otro lado, el HCB estimula la fosforilación de Smad3 a los 5 min a dosis de 0.005 y 0.05 μ M ($p < 0.05$), así como de ERK1/2 a dosis de 0.05, 0.5 y 5 μ M ($p < 0.05$; $p < 0.01$ y $p < 0.01$) a los 15 min. El incremento en la migración celular promovido por HCB (5 μ M) ($p < 0.01$) fue bloqueado por inhibidores del RHA ($p < 0.001$) y de la vía de Smad ($p < 0.05$). El HCB activa las vías de señalización de Smad3, p38 y ERK1/2 del TGF- β 1 en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. El incremento inducido por el pesticida en la migración celular depende del RHA y de la vía de Smad del TGF- β 1.

CARDIOLOGÍA 2

407. (347) EFECTOS DE LA WORTMANINA (W) SOBRE LAS ACCIONES BENEFICIOSAS DE LA ROSUVASTATINA (R) EN CORAZONES DE RATA PERFUNDIDOS LANGENDORFF SOMETIDOS A ISQUEMIA GLOBAL-REPERFUSIÓN

Vélez, D.¹; Torresin, M.¹; Hermann, R.¹; Savino, E.^{1,2}; Varela, A.^{1,2}; Marina Prendes, M.^{1,2}
Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA¹ IQUIMEFA-CONICET²

Las estatinas, fármacos empleados para disminuir los niveles de colesterol, poseen acciones independientes de los lípidos, tales como: inhibir la inflamación vascular, inhibir la trombosis, disminuir el estrés oxidativo, como así también en el laboratorio pudimos evidenciar un efecto cardioprotector. El objetivo del siguiente trabajo fue investigar la participación de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) en los efectos beneficiosos cardiovasculares de la R. Se trabajó con corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a 25 min de isquemia (I)-60 min de reperfusión (RP). La R (3 μ M) se suministró en el medio de perfusión 10 minutos antes de la I

(R1) o durante la RP (R2). La W (100 nM), inhibidora de la PI3K, se suministró en el medio de perfusión 5 minutos antes de la R previo a la isquemia o durante toda la reperfusión. Se evaluó la contractilidad por medio de la determinación del producto presión sistólica por frecuencia cardíaca (PxF), las velocidades de contracción y de relajación (\pm p/dt) y se midió la presión diastólica final (PDF), como así también el flujo coronario (FC) durante los primeros 10 min de reperfusión. La estadística se hizo con ANOVA de dos factores con medidas repetidas ($n=6$ / grupo). La R mejoró la recuperación postisquémica de la contractilidad, mientras que la W disminuyó los efectos beneficiosos de la misma, anulando las diferencias con el grupo control (C): PxF (%) a los 30 min de RP: C 46,7 \pm 7,4; R1 66,3 \pm 8,7*; R2 66,5 \pm 9,3*; R1+W 40,2 \pm 89; R2+W 31,1 \pm 10,0 * $p < 0,05$ vs C, R1+W y R2+W. Se observó un aumento de la PDF en los corazones tratados con R en presencia de W: PDF (%) a los 5 min de RP: C 20,0 \pm 7,2; R1 5,9 \pm 2,9*; R2 3,8 \pm 1,5*; R1+W 13,7 \pm 4,3; R2+W 13,3 \pm 4,5; * $p < 0,05$ vs C, R1+W y R2+W. El FC no presentó cambios significativos entre los C y los R1 y R2, el empleo de W no modificó dicho perfil. Los resultados sugieren que la PI3K estaría involucrada en los efectos beneficiosos de la R explorados en el presente trabajo.

408. (349) RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA EN HIPERPLASIA INTIMAL CORONARIA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CARDIOPATÍA CONGÉNITA

Castilla, R. ; Guerri-Guttenberg, R. ; Muller, A.; Milei, J.
Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Prof. Dr. Alberto C. Taquini, ININCA UBA_CONICET

Las cardiopatías congénitas (CC) y/o su proceso de reparación incrementan la incidencia de aterosclerosis coronaria y el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular en el adulto. En las arterias coronarias de pacientes con CC se observa un aumento en la hiperplasia intimal, considerada como el primer estadio del aterosclerosis coronario o "lesión prearterogénica". El engrosamiento intimal se produce por la proliferación y migración de las células musculares lisas (SMC), ambos eventos inhibidos por estrógeno. Los estrógenos pueden actuar a través de sus receptores (ER) clásicos α y β o por unión a receptores de membrana. En ratones, el ER α es el responsable de los efectos protectores de los estrógenos contra la enfermedad aterosclerótica.

Dado el rol del ER α contra la aterogénesis, nuestro objetivo fue estudiar la expresión del ER α en coronarias de pacientes pediátricos con CC. Se evaluaron 57 necropsias (edad promedio de 2,4 años) de los cuales 29 fueron de sexo masculino. El 39% de los pacientes fueron operados. Se analizó la extensión de la expresión del ER α por inmunohistoquímica en las arterias coronarias derecha, izquierda, descendente anterior, circunfleja y descendente posterior. Se observó expresión del ER α en las SMCs de la capa media, en endotelio y en los engrosamientos intimales, siendo su expresión independiente del género del paciente. Los pacientes que sufrieron cirugía reparadora tuvieron una disminución estadísticamente significativa de la expresión del ER α en el total de la arteria ($p=0,016$) comparada con aquellos que no fueron intervenidos. Cuando se analizó la expresión del ER α en las distintas capas arteriales se determinó una disminución sólo en la capa intimal ($p=0,009$) de los pacientes operados. En conclusión, una disminución en la expresión del ER α en la capa intimal de las arterias coronarias de pacientes portadores de cardiopatías congénitas podría representar un factor de riesgo o predisponente para el desarrollo de futuras enfermedades cardiovasculares.

409. (405) EFECTOS DE LA 3-METILADENINA (MA) EN LA ISQUEMIA SIMULADA (IS) DE AURICULAS AISLADAS DE RATA

Hermann, R.; Rusiecki, T.; Velez, D.; Marina Prendes, M.; Varela, A.
Cátedra de Fisiología, FFYB, UBA, IQUIMEFA-CONICET

La MA, con probados efectos nocivos sobre la recuperación de la aurícula de rata sometida a Is, es empleada como inhibidor de la autofagia, existiendo publicaciones que sugieren que posee otros efectos metabólicos, como la inhibición de la glucólisis, única fuente

energética durante la Is. Debido a que la glucólisis puede disminuir la contractilidad por sus efectos sobre el pH intracelular, pero a su vez aminora la contractura isquémica, el objetivo fue estudiar los efectos de la presencia de MA (5mM) sobre la producción de lactato y la funcionalidad durante la Is. Se evaluó también la viabilidad celular. Se emplearon aurículas izquierdas de rata estimuladas a 60/min, incubadas isométricamente en Krebs-Ringer (glucosa 10 mM, O₂ 95%-CO₂ 5%, pH 7,4). Para la Is (75 min) se reemplazó el O₂ por N₂ y la glucosa por 2-desoxiglucosa, pH 6,8-7,0. Se registró la fuerza sistólica pico (FS), la fuerza diastólica final (FD), el índice fuerza-tiempo (IFT) y las velocidades de contracción y relajación (\pm dF/dt), (n=6). La viabilidad celular se midió con la técnica del bromuro-3-[4,5 dimetilazol-2-yl]-2,5dimetilimidazolio (λ =520 nm) y el lactato por método enzimático (λ =550 nm). Se empleó ANOVA. La Is generó un abrupto descenso de la contractilidad en los primeros 10 min, siendo más pronunciado en ausencia de MA (FS (%) 18,3 \pm 2,3vs36,7 \pm 5,1; p<0,05; IFT(%) 7,0 \pm 3,3vs25,0 \pm 5,2; p<0,05; +dF/dt(%) 7,0 \pm 2,9vs17,0 \pm 3,5%; p<0,05). El descenso de la -dF/dt fue más pronunciado en ausencia de MA (2,0 \pm 1,8vs5,0 \pm 5,6), pero el desarrollo de contractura, que ocurrió progresivamente y alcanzó su valor máximo a los 30 min, fue más pronunciado en presencia de MA (FD(%) 70,3 \pm 8,5vs41,2 \pm 6,7; p<0,05). La MA no afectó la producción de lactato (4,7 \pm 0,6vs4,3 \pm 0,6 μ mol/g seco) ni la viabilidad celular al final de la Is (99,0 \pm 6,1vs101,2 \pm 5,3%). Los resultados sugieren que los efectos de la MA durante la Is no se deben a inhibición de la glucólisis, siendo necesario explorar otras acciones metabólicas de este agente.

410. (444) MEJORAS EN EL TRATAMIENTO FOTODINÁMICO DEL CÁNCER Y LESIONES ATROSCLERÓTICAS CON EL USO DE DENDRÍMEROS DE ALA

Rodríguez, L.; Di Venosa, G.; Mamone, L.; Gándara, L.; Vallecorsa, P.; Batlle, A.; Casas, A.

Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento antitumoral que consiste en la administración de un fotosensibilizante que se localiza selectivamente en el tumor y posterior iluminación de la zona tumoral con una luz activadora del fotosensibilizante. Nuestro grupo se ha especializado en la fotosensibilización endógena con las porfirinas biosintetizadas a partir del precursor ácido 5-aminolevulínico (ALA). Otro de los usos emergentes de la TFD es la denominada Fotoangioplastia, que consiste en la TFD de lesiones ateroscleróticas, formadas principalmente por macrófagos, linfocitos T y células de músculo liso. Con el fin de optimizar la TFD diseñamos dos dendrímeros conteniendo ALA. La captación de dendrímeros por los macrófagos del sistema retículoendotelial ha sido vista principalmente como un hecho a evitar en la TFD del cáncer. La idea de este trabajo fue aprovechar esta propiedad para atacar selectivamente las placas ateroscleróticas mediante fotosensibilización de sus componentes macrófagos, dejando las estructuras vasculares intactas. El objetivo fue estudiar los dendrímeros de ALA, para facilitar su incorporación a células tumorales y estudiar su captación por macrófagos y células endoteliales como modelo de fotoangioplastia. Se emplearon dendrímeros conteniendo 6 moléculas de ALA (6m-ALA) ó 9 (9m-ALA) y se analizó la síntesis de porfirinas *in vitro*, en la línea de adenocarcinoma murino LM3, en los macrófagos Raw 264.7 y en las células endoteliales HMEC-1. Encontramos que en las líneas LM3, HMEC-1 y Raw 264.7, la liberación de ALA y síntesis de porfirinas a partir de los dendrímeros 6m-ALA y 9m-ALA es total a las 24 hs de incubación, mientras que a las 3 hs, la liberación es parcial. Por otra parte, la síntesis de porfirinas a partir de los dendrímeros es mayor a las 3 hs en la línea macrófágica (6m-ALA= 152 \pm 16 μ g porfirinas/10⁵ cél; 9m-ALA= 159 \pm 17 μ g porf./10⁵ cél) empleando una concentración de 0,025 mM, respecto a la línea endotelial HMEC-1 (6m-ALA= 28 \pm 3 μ g porf./10⁵ cél, 9m-ALA= 34 \pm 2 μ g porf./10⁵ cél) (p< 0,01), demostrando la selectividad de los dendrímeros por los macrófagos. En células tumorales LM3, la síntesis de porfirinas a partir de los dendrímeros es mucho mayor que a partir de ALA (ALA= 15 \pm 1,6 μ g porf./10⁵ cél, 6m-ALA= 55 \pm 1,9 μ g porf./10⁵ cél, 9m-ALA= 57 \pm 2,0 μ g porf./10⁵ cél) a las 3 hs con 0,025 mM, demostrando que los dendrímeros de ALA son más eficaces que el ALA para su uso en la TFD del cáncer.

411. (68) EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE ENOS CONTRIBUYE AL EFECTO CARDIOPROTECTOR DE UN EXTRACTO DE VACCINIUM MERIDIONALIS SWARTZ

González Arbeláez, L.¹; Fantinelli, J.¹; Lopera, Y.³; Rojano, B.³; Ríos, J.⁴; Schinella, G.²; Mosca, S.¹

Centro de Investigaciones Cardiovasculares¹ Laboratorio de Ciencia de Alimentos, Universidad de Colombia² Dpto de Farmacología, Facultad de Farmacia Universidad de Valencia³ Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP⁴

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que el extracto no- alcohólico obtenido del fermentado de frutos del mortiño (EM), *Vaccinium meridionale* Swartz, posee un alto contenido de antocianinas y fenoles totales, actividad atrapadora de radical superóxido y peroxinitrito y protege al miocardio del daño producido por isquemia y reperusión. El objetivo del presente trabajo fue determinar los mecanismos involucrados en este efecto cardioprotector. Para ello corazones aislados de rata y perfundidos por el sistema de Langendorff fueron sometidos a 20 min de isquemia global y 30 min de reperusión. El grupo tratado recibió una dosis de 50 mg/ml de EM 10 min antes de la isquemia y durante los primeros 10 min de la reperusión. Para examinar la participación del óxido nítrico (NO) otros experimentos fueron realizados en presencia de N^G-nitro-L-arginina metil éster [L-NAME, inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS)]. El estado oxidativo del tejido se determinó midiendo la concentración de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el contenido de glutatión reducido (GSH). Se midió también la expresión de la NOS endotelial (eNOS) y de Akt. Los corazones tratados con EM mostraron una mayor recuperación de la función miocárdica postisquémica, disminución de las TBARS, preservación parcial del GSH y aumento de la expresión de eNOS y Akt. Estos efectos beneficiosos fueron abolidos cuando la eNOS fue inhibida con L-NAME. Estos datos muestran que el aumento de la expresión de eNOS vía Akt y no la capacidad antioxidante propia del extracto es el mecanismo responsable de la cardioprotección obtenida por el tratamiento agudo con EM.

412. (723) EL DÉFICIT DE GALECTINA 3 PREVIENE LA LESIÓN DE ÓRGANO BLANCO EN UN MODELO DE HIPERTENSIÓN INDUCIDO POR ANGIOTENSINA II

González, G.^{1,2}; Rhaleb, N.²; Nakagawa, P.²; Liu, Y.²; Smolarek, D.²; Carretero, O.²

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Hypertension and Vascular Research Division, Henry Ford Hospital, Detroit, Michigan²

Estudiamos la hipótesis que el déficit de Gal3 previene la inflamación y la fibrosis miocárdica atenuando la lesión de órgano blanco en un modelo hipertensión inducida por Angiotensina II (Ang II). Ratones C57BL6 y Gal3 KO fueron divididos en 4 grupos: 1) C57+Vehículo (V, n=9); 2) Gal3 KO+V (n=13); 3) C57+Ang II, infundido en forma permanente con Ang II (800 ng/Kg/Día, n=12) y 4) Gal3 KO+Ang II (n=14). Se evaluó la presión arterial sistólica (PS; plestografía) y la fracción de eyección (FE, %) por ecocardiografía. A los 2 meses se cuantificó en corazón: a) hipertrofia (peso del ventrículo izquierdo/longitud de la tibia; PVI/LT; (mg/mm)); b) fibrosis (picosirius red, %); c) infiltrado de macrófagos (células CD68+/mm²) y d) expresión de ICAM1 (western blot, % de aumento vs C57+V).

Resultados: (X \pm SEM)

	C57+V	Gal3KO+V	C57+Ang II	Gal3KO+Ang II
PS	115 \pm 5	113 \pm 5	164 \pm 7*	167 \pm 5*
PVI/LT	58 \pm 1	67 \pm 2	82 \pm 3*	88 \pm 6*
FE	78 \pm 3	80 \pm 2	61 \pm 3*	76 \pm 2*
Fibrosis	1,6 \pm 0,5	2,4 \pm 0,4	6,4 \pm 1,1*	3,4 \pm 0,8*
CD68+	39 \pm 9	37 \pm 9	110 \pm 12*	54 \pm 16*
ICAM1	100 \pm 20	212 \pm 64	472 \pm 43*	131 \pm 28*

*p<0.05 vs C57+V; † p<0.05 vs C57+Ang II.

Conclusión: En hipertensión inducida por Ang II el déficit de Gal3 previno la lesión de órgano blanco reduciendo la fibrosis miocárdica, el infiltrado de macrófagos y la expresión de ICAM1 como así también la disfunción ventricular en forma independiente de cambios en la presión arterial.

413. (20) EFECTO DE PROANTOCIANIDINA EXTRAÍDA DE LIGARIA CUNEIFOLIA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO Y LA EXCRECIÓN BILIAR DE SALES BILIARES EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ENRIQUECIDA EN COLESTEROL

Galliano, S.¹; González, J.¹; Dominighini, A.¹; Crosetti, D.¹; Urli, L.¹; Ronco, M.²; Monti, J.²; Wagner, M.³; Carnovale, C.²; Luquita, A.¹

Facultad de Ciencias Médicas u.n.r.¹ Fisiología, Cs. Bioq. y Farm., UNR, CONICET² Farmacobotánica, Farm. y Bioq., UBA³

La infusión de *Ligaria cuneifolia* es utilizada en medicina popular para aumentar la fluidez sanguínea disminuyendo el colesterol (Co) plasmático. Se obtuvo a partir del extracto total una fracción enriquecida en proantocianidina (PLc). Anteriormente, demostramos que el tratamiento con PLc por vía intraperitoneal (ip) en ratas alimentadas con dieta estándar disminuye el Co plasmático y aumenta la excreción biliar (EB) de sales biliares (SB) (producto de metabolización hepática del Co). **Objetivo:** Analizar el efecto del tratamiento con PLc sobre la concentración plasmática de Co y la EBSB en ratas alimentadas con dieta enriquecida en Co. **Métodos:** Ratas Wistar machos adultas alimentadas 28 días con dieta enriquecida en Co fueron inyectadas vía ip 3 días, cada 24 horas, con: solución fisiológica (C; n=6) o PLc 1,5mg/100g peso corporal (PC) (T₁; n=7) o PLc 3mg/100g PC (T₂; n=7). Al cuarto día, se anestesiaron con pentobarbital sódico (50mg/kg PC, ip), obteniéndose bilis por cateterización del colédoco y sangre por punción cardíaca. Se determinaron: en plasma: Co total (por método enzimático), CoHDL y CoLDL; en bilis: flujo biliar (FB) (por gravimetría), EBSB (producto de la concentración biliar SB por el FB). **Resultados:** (media ± ES) Co plasmático (mg%): Co total: C: 108,54±2,21; T₁: 71,56±3,60*; T₂: 67,33 ±3,35*; CoHDL: C: 25,00±0,74; T₁: 22,10±1,20*; T₂: 15,57±0,60*; CoLDL: C: 20,90±1,32; T₁: 13,59±1,08*; T₂: 16,13±1,33*; EB (nmol/min.g hígado): SB: C: 50,0±5,8; T₁: 59,9±2,8*; T₂: 80,00±6,8*; FB (µl/min.g hígado): C: 2,02±0,09; T₁: 2,38±0,09*; T₂: 2,50±0,12* (*p<0,05 vs C). **Conclusión:** El tratamiento con ambas dosis estudiadas con PLc, en ratas alimentadas con dieta enriquecida en Co induce una disminución del Co plasmático (total, HDL y LDL) que podría deberse al incremento de la EBSB, lo cual, por el aumento de entes osmóticamente activos, explicaría el aumento del FB. Estos resultados ponen en evidencia un efecto importante de PLc sobre el metabolismo del Co.

414. (335) EFECTOS DEL EJERCICIO INTENSO SOBRE LA FUNCION VENTRICULAR BASAL Y LA RESERVA INOTROPICA Y LUSITROPICA EN RATONES

Wilensky, Luciana¹; González, Germán E.¹; D'Annunzio, Verónica¹; Matorra, Federico¹; Pérez, M.¹; Cassaglia, P.¹; Gullace, F.²; Casanova, V.²; Pena, L.¹; Morales, C.¹; Gelpi, R.¹

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, F. Medicina, UBA¹ Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA²

Es conocido que el ejercicio (E), induce una hipertrofia adaptativa y reduce factores de riesgo cardiovasculares. Como resultado de la actividad física leve a moderada, el músculo cardíaco remodela fisiológicamente desarrollando una hipertrofia miocárdica adaptativa en respuesta al incremento crónico del trabajo cardíaco. Sin embargo, existe controversia si el E intenso produce el mismo efecto benéfico. El objetivo fue evaluar el efecto del ejercicio intenso sobre la función ventricular basal y luego de la administración de isoproterenol (ISO). Se realizaron dos grupos experimentales utilizando ratones FVB machos de 3 meses de edad: Sedentario (S): ratones sin E; y Ejercicio: ratones con

protocolo de natación intenso (90min 2 sesiones/día, 6 días, por 4 semanas). Al finalizar, los animales fueron anestesiados y los corazones fueron aislados y perfundidos de acuerdo a la técnica de Langendorff, para la evaluación de la función ventricular basal y la respuesta a la administración de ISO (56 ng/kg). El cociente peso del ventrículo izquierdo (mg)/longitud de la tibia (mm), un índice de hipertrofia, fue de 5.1±0.4 para S y 6.9±0.2 para E (p<0.05 vs. S). El E no modificó el estado inotrópico ni lusitrópico basal en el grupo E, mientras que en respuesta al ISO, la +dP/dt_{max} aumentó 49±7% (de 1998±149 vs. 2951±232 mmHg/seg, p<0.003) en S y 24±4.5% (de 2309±409 a 2883±532 mmHg/seg) en E. El t63, un índice de relajación, disminuyó con ISO 12±2% (de 45±2 a 39±2 msec, p<0.05) en S y 4.3±2% (de 41±1 a 39±2 msec) en E, siendo significativa la diferencia entre S y E. El colágeno intersticial del ventrículo izquierdo fue similar en los grupos. En conclusión, si bien el ejercicio intenso no modificó la función ventricular basal ni el colágeno intersticial, disminuyó la reserva inotrópica y lusitrópica, que son características de la hipertrofia no adaptativa.

415. (56) RECOMENDACIÓN DE ABANDONO DEL HÁBITO TABÁQUICO EN UNA MUESTRA DE ADULTOS DE LA CIUDAD DE ROSARIO

García Zamora, S.¹; Bértola, D.¹; Torres, N.²; Tarrés, M.²; Greca, A.¹

1° Cátedra de Clínica Médica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Servicio de Clínica Médica Hospital Provincial del Centenario¹ Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario²

El tabaquismo es la principal causa de muerte prevenible en adultos. Pese a ello muchos médicos no aconsejan a los pacientes dejar de fumar. Nos propusimos evaluar las características del consumo de cigarrillos y la frecuencia en la recomendación de abandono del hábito. Estudio transversal realizado durante julio-agosto y noviembre-diciembre de 2010 en la ciudad de Rosario. Se encuestaron mediante muestreo no probabilístico por conveniencia 1217 concurrentes a los 7 distritos de la ciudad, no relacionados con el sistema de salud. El 57% de estos fueron mujeres; el 11% tenían un trabajo relacionado con el ámbito de la salud. La edad promedio fue de 48,5 ±17 años. Fumaba el 28% y un 24% eran ex tabaquistas. No hubo diferencias en la edad de comienzo entre fumadores (18,4 ± 7,1 años) y ex fumadores (18,1 ± 5,6 años), P=0,509, ni tampoco en el grado de instrucción alcanzado (p=0,142). No se detectó correlación entre edad de comienzo y número de cigarrillos diarios en fumadores (r=0,098, p=0,071), existiendo correlación inversa en ex fumadores (r=-0,231, p=0,0001). La mediana de intentos para dejar de fumar fue menor en ex tabaquista (1 vs 3 veces, p<0,0001). El 29% de las personas que recibieron la recomendación de dejar de fumar abandonaron el hábito, mientras que el 59% de los que no la habían recibido lograron hacerlo (P<0,0001). Se realizó un análisis factorial de correspondencias múltiples construyéndose luego una tipología de individuos divididos en cinco grupos con características semejantes. Según esto quienes lograron dejar el hábito eran varones, grandes fumadores, con secundaria completa. Aquellos que nunca intentaron dejar de fumar comenzaron a edades algo mayores, y fumaban menos que los que abandonaron el hábito (p<0,0001). El no encontrar relación entre el consejo del médico y el abandono del hábito tabáquico probablemente denote que para que este sea eficaz, debe impactar en la motivación por conseguirlo. En la construcción de grupos, los tabaquistas que no intentaron dejar de fumar comenzaron a edades algo mayores, y consumían menos cigarrillos por día. Esto podría señalar una percepción errónea de menor riesgo, que requeriría un abordaje diferente de este subgrupo. Estas variables deberán considerarse en futuros trabajos, para una mejor aproximación a la compleja interrelación del abandono del hábito tabáquico.

416. (429) ANÁLISIS DE POINCARÉ DE LA VARIABILIDAD DEL PATRÓN RESPIRATORIO EN SUJETOS NORMALES Y EN

PACIENTES CON ESTADO VEGETATIVO PERSISTENTE

Carlos Eduardo D²; Migueles, M.¹; Morel Vulliez, G.³; Escobar, M.³; De Vito, E.^{1,2,3}

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina² Centro del Parque, CABA³

Introducción: Por ser un sistema dinámico la variabilidad del patrón respiratorio (PR) puede estudiarse mediante los diagramas de Poincaré, un método gráfico que permite cuantificar la distribución de un cúmulo de puntos midiendo su desvío estándar transversal (SD1) y longitudinal (SD2) asociados a la variabilidad a corto plazo (memoria a corto plazo) y largo plazo respectivamente del parámetro en estudio. El objetivo fue analizar la variabilidad del PR en pacientes con estado vegetativo persistente (EVP). La hipótesis es que los pacientes presentarían menor variabilidad del PR respecto a los normales. Una menor variabilidad se asocia a un comportamiento más rígido del sistema. **Material y método:** Registros de flujo en la boca (-1 h) en sujetos normales (n 11) y en pacientes con EVP por daño focal ó difuso (n 12). Se seleccionaron los parámetros respiratorios estacionarios (D'Negri C, y col, Medicina (Buenos Aires) 2011; 174 (Supl. III)). Se eligieron para este análisis Ve (11 vs 12), Vt (7 vs 6) y Ttot (4 vs 4). El análisis de Poincaré se basó en 4 descriptores establecidos: media, SD1, SD2, cociente SD2/SD1. Ve y Vt fueron normalizados respecto al peso de cada sujeto. Se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney (p<0.05). **Resultados:** La variabilidad a corto plazo de Ve y Vt fue menor en los EVP (SD1, p< 0.05). La variabilidad a largo plazo del Vt fue igualmente menor en EVP (SD2, p< 0.05). La morfología de la dispersión puntos de ambos parámetros fue alargada (símil habano) en EPV respecto de morfología circular en N (SD2/SD1 p< 0.05). Igual tendencia presentó el Ttot aunque sin significación estadística. **Conclusiones:** Los parámetros analizados del PR mostraron menor variabilidad en EVP. Esta rigidez en el PR podría tener significación pronóstica.

REPRODUCCIÓN 4**417. (58) EFECTO DE MELATONINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y EL ESTADO OXIDATIVO EN LA POBLACIÓN DE MASTOCITOS DEL TESTÍCULO HUMANO PATOLÓGICO**

Rossi, S.¹, Matzkin, M.¹, Terradas, C.^{2,3}, Ponzio, R.⁴, Puigdomenech, E.³, Levalle, O.², Mayerhofer, A.⁵, Calandra, R.¹, Frungieri, M.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ División de Endocrinología, Hospital Durand, Facultad de Medicina, UBA² Instituto Médico PREFER, Facultad de Medicina, UBA³ Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA⁴ Institute of Anatomy and Cell Biology, Munich, Alemania⁵

Melatonina (Mel) presenta efectos anti-proliferativos y anti-oxidantes en diferentes modelos experimentales. Recientemente, hemos descrito la presencia de Mel en el testículo del hámster, su rol inhibitorio sobre la esteroidogénesis y mecanismo de acción. En este trabajo se investigó la presencia de Mel en el testículo humano y su influencia sobre la proliferación y estado oxidativo de los mastocitos (MC) gonadales. Se emplearon biopsias testiculares de pacientes con Hipoespermatogénesis (H) y Síndrome de Células de Sertoli Sólo. La concentración testicular de Mel, determinada por ensayo de ELISA (fmol/g de tejido: 39.41± 4.10, n=13) correlacionó inversamente con la expresión (Western blot y densitometría) del antígeno de proliferación celular (PCNA) (r =0.61, P<0.05) y el número de MC (inmunohistoquímica y cuantificación) totales (r =0.68, P<0.05), intersticiales (r =0.72, P<0.05) y peritubulares (r =0.67, P<0.05); y directamente con la expresión (PCR cuantitativa, qPCR) de las enzimas anti-oxidantes catalasa (CAT) (r =0.73, P<0.05), glutatión-S-transferasa (GST) (r =0.72, P<0.05) y superóxido dismutasa (SOD) (r =0.84, P<0.05). La expresión testicular de CAT, GST y SOD fue mayor en pacientes con H. Mediante microdissección por captura láser y PCR, se detectó la expresión del receptor Mel1a en MC del testículo humano. La incubación de la línea celular de mastocitos humanos (HMC-1) en

presencia de Mel (10⁻⁷ M), produjo una inhibición en la expresión de las enzimas anti-oxidantes (qPCR, valor arbitrario asignado al control = 1; tratado con Mel: CAT= 1.76 + 0.08; GST= 1.89 + 0.09; SOD= 1.85 + 0.10, P<0.05). Luego de 24 hs de incubación, Mel no afectó la expresión de PCNA (Western blot) ni la proliferación de HMC-1 (ensayo colorimétrico, MTS). En resumen, se detectó la presencia de Mel en el testículo humano patológico y se sugiere un rol anti-oxidante sobre la población local de MC. En cambio, Mel no afectaría la proliferación de MC.

418. (130) VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS α Y β Y CO-LOCALIZACIÓN CON EL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN EL HIPOTÁLAMO DE LA VIZCACHA (LAGOSTOMUS MAXIMUS) DURANTE LA GESTACIÓN

Insera, P.^{2,3}, Saucedo, L.², Charif, S.², Villarreal, F.², Fraunhofer, N.^{2,3}, Vitullo, A.^{2,3}, Dorfman, V.^{2,3}

Centro de Estudios Biomédicos Biotecnológicos Ambientales y Diagnóstico CEBBAD Univ Maimónides¹ Centro de Estudios Biomédicos Biotecnológicos Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD) - Univ. Maimónides² CONICET³

El Estradiol (E₂) modula la actividad reproductiva actuando sobre la liberación de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH). En el cerebro, el Receptor de Estrógenos (RE) α funciona como factor de transcripción de los Receptores de Progesterona (RP), mientras que el RE β es regulador del RE α . La vizcacha presenta poliovolución masiva y pseudo-ovulación durante la gestación. Hemos descrito la localización de GnRH y del RP en el hipotálamo de vizcacha con variaciones durante la preñez. El objetivo fue caracterizar la expresión de RE α y RE β y su co-localización con RP en el hipotálamo de la vizcacha durante la gestación. Se utilizaron vizcachas hembras adultas no preñadas ovulando (NPO) y sin ovular (NPNO), y preñadas ovulando (PO) y sin ovular (PNO) (n=5 animales/grupo). Mediante ELISA se determinó un aumento significativo (p<0.05) en el dosaje sérico de E₂ en NPO vs NPNO (30%) y en PO vs PNO (3 veces), y de Progesterona (P) en NPO vs NPNO (5 veces) y en PO vs PNO (40%). Mediante Western-Blot se observó un aumento significativo del 30% en la expresión de RE α en PO respecto a PNO, mientras que el RE β no mostró diferencias significativas entre los grupos. Por inmunohistoquímica se localizó RE α en núcleo de neuronas del Área Preóptica (APO), del Núcleo Supraóptico (NSO) y de la Eminencia Media (EM), mientras que el RE β presentó localización nuclear y citoplasmática en las mismas regiones. Por inmunofluorescencia con análisis por microscopía confocal se detectó co-expresión de RE α con RE β , y de ambos con RPg (éste con localización nuclear y citoplasmática) en neuronas del APO y del NSO en todos los grupos. El aumento en la expresión del RE α durante la preñez, sin cambios en el RE β , sugiere su participación en la regulación de la síntesis del RPg en los períodos de activo funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Esta actividad estaría sustentando el ambiente endócrino que necesita este ovario para desarrollar su particular funcionamiento (PIP-CONICET 0225/2011).

419 (131) EL SISTEMA ÓXIDO NÍTRICO-ÓXIDO NÍTRICO SINTASA PARTICIPA EN LA INDUCCIÓN DEL CUADRO DE ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL EN LA RATA

Jarazo Dietrich, S., Sobarzo, C., Fass, M., Imsen, M., Lustig, L., Theas, M.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, UBA

Los procesos inflamatorios del testículo son un importante factor etiológico de infertilidad en el hombre. La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un modelo de inflamación testicular crónica caracterizado por el daño de los túbulos seminíferos (TS) y un infiltrado intersticial linfomonocitario, útil para estudiar los mecanismos involucrados en las alteraciones de la función gonadal. En la OAE demostramos un aumento de la expresión y la actividad de las isoformas constitutivas e inducible de la óxido nítrico sintasa (ONS) concomitante con el inicio de la lesión testicular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación

del sistema ON-ONS en el desarrollo de la OAE empleando un inhibidor competitivo de la ONS el L-NAME. La OAE fue inducida en la rata por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes. Las ratas fueron inyectadas (ip) con L-NAME (8mg/kg n=13) o solución fisiológica (SF n=12) diariamente durante los 20 días previos al inicio de la lesión testicular. Al finalizar el tratamiento el estado general de los animales fue bueno y no se observaron diferencias significativas en el peso corporal (media±DS, SF:393.26±43.41, L-NAME:383.43±20.59). Para evaluar la lesión testicular empleamos el índice OAE (I)=V+T+P (V: valor entre 0 y 9 según el % de TS dañados (d), T: es 0 cuando la descamación de los TS es parcial y 0.5 cuando es total, P: es 0.5 cuando la relación peso testicular/peso corporal es menor a 2.5×10^{-3}). El L-NAME disminuyó el %TSd y el I (media±DS,%TSd:SF:39.03±32.51, L-NAME:12.74±11.81*; I: SF:4.41±2.88, L-NAME:2.08±1.38*, *p<0.05). Además se midió la testosterona en suero en ambos grupos y en ratas sin inmunizar (N) y no se observaron cambios significativos (media±DS, SF:2.94±3.17, L-NAME:1.65±1.53, N:1.3±1.47). En conclusión, demostramos que en la OAE la activación del sistema ON-ONS es relevante en el desarrollo del cuadro ya que el bloqueo sostenido de la actividad de la ONS disminuyó la severidad de la lesión testicular.

420. (245) EXPRESIÓN TESTICULAR DE AROMATASA EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS TESTICULARES

González, C.¹, Levalle, O.², Terradas, C.², Puigdomenech, E.³, Ponzio, R.⁴, Vitullo, A.¹, Calandra, R.⁵, González-Calvar, S.^{4,5}
 CEBBAD, Universidad Maimonides¹ Hospital Durand² Instituto PREFER³ Facultad de Medicina, UBA⁴ IBYME, CONICET⁵

En ciertas patologías reproductivas masculinas como el Síndrome de Sólo Células de Sertoli (SCO) o la Hipoespermatogénesis idiopática (H) se presenta, en algunos casos, una marcada proliferación del intersticio testicular. Recientemente, hemos descrito en pacientes con SCO e H que muestran hiperplasia de células de Leydig (HCL) se observa una mayor expresión de TGF-β1 y su coreceptor endoglina sugiriendo la participación de esta citoquina en dicho proceso proliferativo (Reprod Biol Endocrinol 8:148-159, 2010). En el presente trabajo se abordó el análisis de la expresión de PCNA y aromatasa en biopsias testiculares de pacientes con SCO (n=6), H (n=6) y SCO e H que presentan además HCL(n=4). También se estudió, *in vitro*, la influencia de TGF-β1 en la expresión de aromatasa en la línea de células de Leydig TM3. Los estudios realizados por técnicas de inmunohistoquímica indican la presencia de aromatasa en células de Leydig y una mayor expresión de PCNA en el grupo HCL. Mediante RT-qPCR se detectó un aumento en la expresión génica de aromatasa en pacientes que presentan HCL en relación a SCO e H (SCO= 0,76±0,38; SCO+HCL=3256,99±318,25; H=1,58±0,67; H+HCL=4196,45±1806,94). En todos los pacientes estudiados, los niveles de expresión de aromatasa muestran una correlación positiva con los niveles de TGF-β1 (r=0,7628; p<0.05) evaluados en experimentos anteriores. El cultivo *in vitro* de células de Leydig TM3 con 1 ó 10 ng/ml de TGF-β1 indujo un aumento en la expresión génica de aromatasa de 1700 X y 10 X, respectivamente. En conclusión, en los pacientes con SCO e H que presentan HCL, el aumento de la expresión de aromatasa y su correlación con los niveles de TGF-β1 indicaría su participación en el mecanismo que conduce a la proliferación de las células de Leydig.

421. (252) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE PIRUVATO DESHIDROGENASA KINASA (PDK) POR ACTIVACIÓN DE PPARα Y PPARβ/δ EN CÉLULAS DE SERTOLI (CS)

Regueira, M., Artagaveytia, S., Galardo, M., Pellizzari, E., Cigorraga, S., Meroni, S., Riera, M.
 Centro De Investigaciones Endocrinológicas - CEDIE CONICET

Una función esencial de las CS es producir lactato (L), fuente energética de las células germinales. Un aspecto poco explorado en cuanto a la producción de L en CS es la regulación de

la disponibilidad de piruvato, sustrato de la enzima lactato deshidrogenasa. El complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDC) cataliza la conversión de piruvato a Acetil-CoA y regula en forma indirecta los niveles de piruvato. La fosforilación, dependiente de PDKs, inhibe el PDC. Se han identificado cuatro isoformas de PDK (1-4) y hemos demostrado previamente que todas se expresan en CS. PPARα y PPARβ/δ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors α y β/δ), regulan la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en distintos tejidos. El objetivo del presente trabajo fue analizar la posible regulación de la expresión de PDKs por activación de PPARα y PPARβ/δ en CS. Cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron incubados en condiciones basales o estimulados por 48hs con WY 14643 (WY, 10μM) -activador de PPARα- o GW0742 (GW, 5μM) -activador de PPARβ/δ. Los niveles de ARNm de PDK1-4 fueron analizados por RQ-PCR. Se observó que WY estimula la expresión de PDK2 y PDK4 (1,9±0,1* y 1,9±0,5* respectivamente), y que GW incrementa la de PDK1 y PDK4 (2,1±0,5* y 1,8±0,3* respectivamente). Los resultados se expresan como veces de estímulo con respecto al basal (X±DS,*p<0,05, n=3). Por otro lado, se observó que GW incrementa la producción de L mientras que WY no lo hace. Asimismo, se observó que el dicloroacetato (10mM), inhibidor de PDKs, disminuye el estímulo de GW (B:6,9±0,5; GW:11,2±0,9; GW+DCA:7,9±1,3* μg/μgADN, X±DS,*p<0,05 vs GW, n=3) sugiriendo la participación de PDKs en la producción de L. Puede concluirse que en CS existe una regulación diferencial de la expresión de las isoformas de PDKs por activación de PPARα y PPARβ/δ que podría estar relacionada con la regulación de la producción de lactato (PICT2007-1004, PIP2009-806).

422. (290) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE UNA PROTEINA RECEPTORA DE CALTRIN EN ESPERMATOZOIDES DE LA PORCIÓN CAUDA DE EPIDIDIMO DE RATA

Rivadeneira, A.¹, Miranda, S.¹, Monti, M.², Novella, M.¹, Argaraña, C.², Coronel, C.¹
 Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT), CONICET-Universidad Nacional de Córdoba¹ CIQUIBIC, CONICET-Universidad Nacional de Córdoba²

La proteína caltrin (calcium transport inhibitor) de la secreción de vesícula seminal de rata se une específicamente a la región acrosomal de la cabeza de los espermatozoides durante la eyaculación. De este modo, inhibe la incorporación de calcio extracelular y previene la exocitosis acrosomal espontánea durante el tránsito de los espermatozoides por el tracto reproductor de la hembra. A fin de estudiar la unión de caltrin (6.2 kDa) a la región acrosomal, se investigó la presencia de moléculas receptoras en los espermatozoides de la porción cauda de epidídimo mediante la unión covalente caltrin-receptor por "crosslinking" con NHS y EDC. La presencia del complejo se analizó por Western blotting con anticuerpos anti-caltrin, los que revelaron una banda de 55 kDa sugiriendo la existencia de una molécula receptora de ~49 kDa. Para aislar dicha molécula, las proteínas de la superficie de los espermatozoides se extrajeron con Triton X-100 y se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna de Chitina en la que se inmovilizó la proteína recombinante caltrin-inteina expresada en E. coli. Las proteínas retenidas se eluyeron con NaCl 1 M y se analizaron por SDS-PAGE y MALDI TOF/MS. Se detectó una banda de 48 kDa la que se identificó como HongRES 1, una proteína del epitelio secretor de la porción cauda de epidídimo de rata que se une a la cabeza de los espermatozoides durante el tránsito por ese segmento del órgano. Ya que los espermatozoides de caput y corpus de epidídimo carecen de HongRES 1 en sus cabezas, se evaluó la capacidad de caltrin para unirse a ellos en forma comparativa con espermatozoides de la porción cauda. La inmunofluorescencia indirecta mostró que caltrin se une sólo a los espermatozoides de cauda pero no a los provenientes de otros segmentos del epidídimo. Estos datos reafirman la hipótesis de que HongRES 1 unida a los espermatozoides actuaría como molécula receptora de la proteína caltrin en la rata. Subsidiado por CONICET y SECyT-UNC.

423. (312) PROPORCIÓN DE LINFOCITOS CD19+CD5+/CD19+ EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFERTILIDAD

Incera, M., Ferrer, M., Junovich, G., Azpiroz, M., Inciarte, F., Gutiérrez, G.
Halitus

Introducción: La autoinmunidad afecta todos los estadios de fertilidad desde las fallas ováricas y testiculares hasta la falla de implantación y pérdida del embarazo. Autoanticuerpos como antifosfolípidicos o anticoagulantes lúpicos, antitiroideos, antinucleares, antiespermáticos, antiováricos y antiendometriales han sido investigados como posibles factores involucrados en causas de infertilidad. Los linfocitos B1 (CD19+ CD5+) son una subpoblación de las células B (CD19+) que sintetizarían estos autoanticuerpos. En base a estos antecedentes, el objetivo de este estudio es estudiar la población de LB1 en mujeres fértiles e infértiles. **Materiales y Métodos:** Se han incluido en este trabajo 14 mujeres fértiles y 13 pacientes infértiles a quienes se les determinó por citometría de flujo en sangre periférica la relación LB1/LB. **Resultados:** Las pacientes infértiles tienen significativamente aumentada la proporción de LB1/LB con respecto a las mujeres fértiles ($p < 0,05$) y mediante el análisis por curvas ROC se determinó un valor de corte para este parámetro ($AUC = 0,714$ $p < 0,05$). Por otro lado, el incremento en el porcentaje de LB1 correlaciona positivamente tanto con el porcentaje de LB ($p < 0,0001$ $r = 0,7126$) como con la relación LB1/LB ($p < 0,0001$ $r = 0,8239$) en la población de pacientes fértiles e infértiles. **Conclusiones:** Estos resultados podrían utilizarse para calcular el tamaño muestral necesario en el estudio de este posible parámetro diagnóstico.

424. (418) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS RECEPTORES DE GONADOTROFINAS EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA

Marelli, B.¹, Anweg, A.^{1,2}, Díaz, P.^{1,2}, Stangaferro, M.¹, Rey, F.^{1,2}, Salvetti, N.^{1,2}, Ortega, H.^{1,2}

Lab. de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Cs. Veterinarias, Univ. Nac. del Litoral¹ CONICET²

La ciclicidad reproductiva del bovino es un proceso complejo estrictamente regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, siendo las hormonas gonadotróficas luteinizante (LH) y folículo-estimulante (FSH) esenciales para la función ovárica. Dichas hormonas, a través de su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular, actúan regulando el crecimiento y la maduración folicular así como la esteroidogénesis ovárica. En este contexto, es factible suponer que alteraciones en el patrón de expresión de los receptores de gonadotrofinas (FSHR y LHR) podrían ser factores claves en la patogénesis de la enfermedad quística ovárica (COD). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la expresión de los ARNm de los receptores de gonadotrofinas en los diferentes estadios del crecimiento de los folículos antrales y en folículos quísticos. Para ello se utilizaron muestras de ovarios provenientes de animales con COD espontánea y de controles sincronizados en proestro. La expresión relativa de los ARNm de FSHR y LHR en células de teca y granulosa fue evaluada mediante PCR en tiempo real. El FSHR sólo fue detectable en las células de la granulosa, evidenciándose una disminución significativa en su expresión en los quistes respecto a los folículos antrales controles ($p < 0,05$). Por otra parte, la expresión del LHR durante la foliculogénesis normal fue detectada en células de la teca de todas las categorías foliculares analizadas y sólo en células de la granulosa de folículos antrales grandes y folículos quísticos. No se evidenció una variación en el nivel de expresión del LHR en células de la teca de las distintas estructuras foliculares evaluadas aunque si fue posible detectar una disminución significativa en los niveles de expresión del LHR en células de la granulosa de quistes respecto a folículos antrales grandes ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos permiten concluir que la expresión de receptores de gonadotrofinas se encuentra alterada en la COD bovina.

425. (441) ACCIÓN DIFERENCIAL DE T3 Y SU ANÁLOGO SINTÉTICO GC-1 SOBRE LA GESTACIÓN EN RATAS HIPOTIROIDEAS

Gamarrá Luques, C.¹, Scanlan, T.², Carreño, N.³, Campo Verde Arbocco, F.³, Jahn, G.³, Hapon, M.⁴

Fac. Cs. Médicas UNCuyo/IHEM CCT MENDOZA CONICET¹ Oregon Health & Science University² IMBECU CCT Mendoza CONICET³ ICB UNCuyo/ IMBECU CCT Mendoza CONICET⁴

El hipotiroidismo durante la gestación en la rata está asociado a un menor número de crías por camada y a un retraso en el desencadenamiento del parto. Las hormonas tiroideas (HT) pueden afectar la fertilidad indirectamente, modulando el eje hipotálamo-hipofiso-ovárico; o directamente mediante sus receptores específicos (TR) presentes en la mayoría de las células ováricas. Sin embargo, se desconoce si la acción selectiva de las HT sobre algunos de sus TR α ó β es determinante para el mantenimiento de la preñez. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la administración de T₃ o GC-1 (agonista selectivo TR β) revierten la acción deletérea del hipotiroidismo sobre la gestación. El efecto de la administración diaria i.p. de T₃ (0,6 μ g/100 g de peso) o GC-1 (0,3 μ g/100g de peso) en ratas hipotiroideas (PTU 0,1 g/l en el agua de bebida) se comparó con ratas hipotiroideas y controles durante la gestación. Nuestros experimentos demostraron que la administración i.p. de T₃ normaliza sus valores séricos durante la gestación en ratas hipotiroideas ($p < 0,05$). El hipotiroidismo disminuye el número de crías por camada respecto de los controles ($p < 0,05$), este efecto no se observa cuando las ratas hipotiroideas son tratadas con T₃ o GC-1. El desencadenamiento del parto se retrasa en ratas hipotiroideas con o sin GC-1, respecto de las ratas controles y las hipotiroideas tratadas con T₃ ($p < 0,05$). Estos cambios se asocian a niveles normales de progesterona en todos los grupos durante el período implantatorio. Sin embargo, se observa un retraso en la luteólisis de las ratas hipotiroideas con o sin GC-1 evidenciado por niveles aumentados de progesterona al final de la gestación respecto de las ratas controles ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos indican que las HT tienen efectos directos significativos sobre la función luteal durante la gestación, a su vez, estas acciones serían selectivas dependiendo de la isoforma del receptor con el que interactúan.

426. (447) HIPERANDROGENIZACIÓN Y ALTERACIONES OVÁRICAS, Y SU TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA

Velez, L., Ferreira, S., Motta, A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CEFyBO

La rosiglitazona (R) se une a los receptores nucleares regulados por proliferadores peroxisomales gama (PPAR γ) y modula la esteroidogénesis ovárica, sin embargo se desconoce el mecanismo. **Objetivo:** estudiar mecanismos del hiperandrogenismo en el desarrollo folicular temprano, el rol de PPAR γ y su relación con el metabolismo lipídico y la inflamación y el alcance del tratamiento con R. La foliculogénesis se indujo en ratas prepuberes Sprague Dawley con 25 UI de gonadotrofina coriónica (eCG). Otro grupo fue además hiperandrogenizado (HA) con dehidroepiandrosterona (eCG+HA), y un tercero tratado también con R (eCG+HA+R), N=10 ratas/punto. HA aumentó la progesterona (P) en suero y R revirtió este efecto. En cuanto al mecanismo, HA aumentó la expresión proteica (por Western Blotting) de PPAR γ , COX2 y StAR; eCG+HA: 7,91 \pm 1,24; 3,89 \pm 1,02; 3,88 \pm 0,84; eCG: 2,75 \pm 0,69; 2,21 \pm 0,54; 1,97 \pm 0,93 unidades arbitrarias (UA), respectivamente. El tratamiento con R las revirtió, eCG+HA+R: 3,19 \pm 1,55; 1,42 \pm 0,38; 2,30 \pm 0,17 UA. A nivel génico (por Real Time PCR), HA no modificó el mRNA PPAR γ , eCG+HA: 1,04 \pm 0,2 vs eCG: 1,15 \pm 0,20, sin embargo, y posiblemente como respuesta a la disminución de la expresión proteica por HA, R aumentó el mRNA de PPAR γ , eCG+HA+R: 2,31 \pm 0,08 UA. HA disminuyó el mRNA de StAR, R no pudo revertir este efecto (eCG+HA) 1,16 \pm 0,03; (eCG) 2,19 \pm 0,19; (eCG+HA+R) 1,02 \pm 0,02 UA. HA aumentó mRNA de COX2 y R revirtió ese efecto, eCG+HA: 36,14 \pm 3,88; eCG: 3,80 \pm 1,90; eCG+HA+R: 1,79 \pm 0,78 UA. HA aumentó PGE ovárica, R lo revirtió, eCG+HA: 3,20 \pm 1,10; eCG: 1,28 \pm 0,46; eCG+HA+R: 1,90 \pm 0,18 pg/ μ g proteína. Con respecto al estrés oxidativo, HA aumentó la peroxidación lipídica, y R no revirtió este efecto eCG+HA: 13,69 \pm 0,32; eCG: 2,90 \pm 0,17; eCG+HA+R: 12,21 \pm 1,17 nM/ml suero/g tejido. Conclusiones: R regula la síntesis de P ovárica ya que revierte efectos adversos de HA sobre la esteroidogénesis

modulando PPAR γ , StAR y COX2 y PGE pero falló en regular el estrés oxidativo inducido por HA.

427. (523) INFLUENCIA DE LA PROTEINA CALTRIN (CALCIUM TRANSPORT INHIBITOR) DE RATA SOBRE LA FISIOLÓGIA ESPERMÁTICA DURANTE LA CAPACITACION IN VITRO

Rodríguez Ramallo, M.¹, Uñates, D.¹, Sottile, E.¹, Ponce, R.², Giojalas, L.¹, Coronel, C.¹

Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIB-YT) CONICET-Universidad Nacional de Córdoba¹ Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba²

La proteína caltrin de rata se une a la cabeza de los espermatozoides durante la eyaculación y reduce la exocitosis acrosomal espontánea (EAE) por inhibición de la incorporación de Ca²⁺ extracelular. Dicha inhibición parece no afectar a la capacitación ya que no se observaron cambios en los patrones electroforéticos de fosfotirosinación de proteínas a las 5 hs de incubación. A fin de examinar la influencia de caltrin sobre ambos procesos y la reacción acrosomal (RA) inducida por progesterona, se evaluó el estado funcional de espermatozoides de epidídimo sometidos a capacitación in vitro en ausencia y presencia de la proteína usando el ensayo de cloruro de tetraciclina. Asimismo, se estudió el efecto de caltrin sobre el calcio intracelular por video microscopía de fluorescencia usando Fluo-3 AM y análisis computarizado de imágenes. En ausencia de caltrin, el porcentaje de células no capacitadas con acrosoma intacto (patrón F) cayó drásticamente al 15% durante las 5 hs de incubación contra el 60% registrado en presencia de la proteína. La capacitación aumentó linealmente hasta el 40% en ausencia de caltrin a las 4 hs versus el 20% en su presencia y, a las 5 hs, ambas preparaciones mostraron valores próximos al 30%. La EAE también incrementó con niveles similares en ambas condiciones hasta las 4 hs y creció abruptamente por arriba del 50% en ausencia de caltrin a las 5 hs contra el 15% en su presencia. La adición de progesterona magnificó la caída del patrón F y el aumento de la RA en los controles (- caltrin), pero no alteró los parámetros funcionales en los espermatozoides incubados con caltrin. El análisis de las imágenes reveló aumento en el Ca²⁺ intracelular inducido por progesterona sólo en los espermatozoides que no fueron tratados con caltrin. Los resultados permiten afirmar que la proteína caltrin de rata modula la funcionalidad espermática a través del control de la capacitación y el bloqueo de la EAE. Subsidiado por CONICET y SECyT-UNC.

428. (760) RELACIÓN ENTRE ALTERACIONES NÚCLEO-CITOPLASMÁTICAS Y ANOMALÍAS EN LA EXPRESIÓN DE METALOPROTEASAS EN SITIOS DE IMPLANTACIÓN POR CONSUMO PERICONCEPCIONAL DE ALCOHOL HASTA FASE DE GASTRULACIÓN EN EL RATÓN

Pérez Tito, L., Coll, T., Cebral, E
IFIBYNE-CONICET

El consumo murino perigestacional de alcohol hasta el día 10 de gestación (DG) aumenta la reabsorción embrionaria por arresto gestacional, defectos embrionarios y de invasión trofoblástica entre los DG 7-8. Dado que las metaloproteasas (MMPs) participan en diversos eventos y mantienen funciones materno-embriónicas, estudiamos las causas de las reabsorciones tempranas y postulamos una vinculación entre cambios en la expresión de MMPs y anomalías histológicas en el sitio de implantación (SI) de DG 8. Se administró 10% de etanol/agua a hembras murinas CF-1 por 17 días antes de la preñez y hasta el DG 8 (HT). (Hembras controles, HC: agua). En los SI de HC y HT, se evaluó el estadio de diferenciación, el desarrollo histopatológico (HyE, Hoescht), el índice apoptótico (células TUNEL+), la distribución y valores relativos de la inmunomarcación de colágeno IV y de MMP-2 y -9 en decidua (De), cono ectoplacentario, interfase trofoblástico-decidual (InT-D), tejidos extraembrionarios y embrión. Las HT presentaron significativo retraso de diferenciación entre 8,5 y 24 hs. vs HC. En las De-HT, disminuyó colágeno IV, aumentaron las células TUNEL+ (p<0,01), se alteró la expresión de MMP-2 en De distal y proximal y aumentó MMP-9 en De distal y vascular. La zona proliferativa

del cono ectoplacentario de HT fue menor y aumentó MMP-9 vs HC. En InT-D de las HT aumentó la infiltración eritrocitaria con una deficiente calidad histológica (p<0,05), aumentaron las células TUNEL+ (p<0,01) y MMP-9 vs SI-HC. Entre el 40 y 65 % de los SI-HT vs 10% de los SI-HC presentaron tejidos extraembrionarios anormales aunque sin expresión de MMP-2 y sí de MMP-9. El 66% de los embriones-HT tuvieron anomalías ectodérmicas con aumento de MMP-2 y -9. La exposición periconcepcional de alcohol produce defectos embrio-trofoblasticos, muerte celular, alteración de colágeno IV y cambios en la expresión de la MMP-2 y 9, sugiriendo una relación con la pérdida embrionaria por consumo de alcohol hasta el DG 8.

429. (529) CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS SECRETORIAS DE VESÍCULA SEMINAL DE RATÓN CON CAPACIDAD DE INHIBIR ACTIVIDADES PROTEOLÍTICAS EN FLUIDO UTERINO Y SUPERFICIE ESPERMÁTICA

Alonso, C.¹, Zalazar, L.¹, Asis, D.², Juliano, L.², De Castro, R.¹, Cesari, A.¹

Instituto de investigaciones Biológicas-CONICET /UNMdP¹ Department of Biophysics-Universidade Federal de São Paulo, Brasil²

Existen proteínas producidas en la vesícula seminal (VS) y secretadas al plasma seminal que regulan la fisiología espermática. Se ha descrito en *Mus musculus* una familia de proteínas secretorias, a la cual pertenece SVS7 (*Seminal Vesicle Secretory protein 7*): una pequeña proteína rica en cisteínas, cuya función en el sistema reproductor aun no está elucidada. En la misma especie, se demostró la presencia de SPINK3 (*serine protease inhibitor Kazal type3*), también en VS. Hemos reportado previamente que al unirse SPINK3 al espermatozoide evita la entrada de Ca²⁺ afectando la reacción acrosomal y la fosforilación de proteínas. Aun no se conoce la proteína *target* de este inhibidor ni en que fluido/tejido cumpliría esta función. Con el objetivo de caracterizar a SVS7 y SPINK3 en cuanto a su posible rol como inhibidores de proteasas en el tracto reproductor se obtuvieron los ADNc correspondientes a *svs7* y *spink3* y las respectivas proteínas recombinantes fueron producidas en *E. coli*. Las proteínas rSVS7 y rSPINK3 (0.2 μ M) fueron capaces de inhibir un 66% y 99% respectivamente la actividad de tripsina *in vitro* y fueron inmunolocalizadas en la superficie espermática. A fin de caracterizar estas actividades se determinaron sus parámetros cinéticos. Por otro lado, para investigar el rol fisiológico de la actividad inhibitoria de SVS7 y SPINK3, se evaluó su capacidad de inhibir la actividad proteolítica del fluido uterino, plasma seminal y proteínas de membrana del espermatozoide de ratón. Se observó que rSVS7 inhibe parcialmente la actividad proteolítica de tipo tripsina detectada en fluido uterino, mientras que rSPINK3 fue efectiva sobre la actividad tipo tripsina de la superficie espermática. Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de inhibidores de serina proteasas en las secreciones de la vesícula seminal estaría relacionada con la regulación de proteasas presentes en el tracto reproductor de la hembra y en la superficie de los espermatozoides. Subsidios: PIP 0273, EXA 566/12.

INMUNOLOGÍA INNATA E INFLAMACIÓN 3

430. (211) LACTOBACILLUS REUTERI CRL1101 MODULA LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN UN MODELO MURINO DE SEPSIS INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO

Juárez, G., Villena, J., Font De Valdez, G., Rodríguez, A.
Centro de Referencia para Lactobacilos – CONICET

Los probióticos poseen propiedades inmunomoduladoras de interés en el campo de las enfermedades inflamatorias. Se ha propuesto que los efectos benéficos de estos microorganismos no están restringidos al intestino y que su administración oral puede modular la inmunidad sistémica. Previamente seleccionado por sus propiedades *in vitro*, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *L. reuteri* CRL 1101 (Lr) de modular la respuesta inflamatoria *in vivo*, empleando un modelo

murino de sepsis inducida por lipopolisacárido (LPS). Para ello, Lr se administró a ratones BALB/c adultos en 10^9 UFC/ratón/día en el agua de bebida por 7 días. Seguidamente, se indujo sepsis, inyectando vía intraperitoneal 20 mg/kg de LPS de *E. coli* O55:B5. Luego de 24 hr se tomaron muestras de sangre, pulmones, hígado y bazo. Se determinaron recuentos leucocitarios en sangre, niveles de urea, creatinina, aminotransferasas y citoquinas en suero, actividad mieloperoxidasa (MPO) en pulmón, contenido de malondialdehído (MDA) y tioles solubles en ácido (GSH) en hígado y células CD4 y CD8 en bazo. La administración preventiva de Lr no modificó la neutrofilia, (75%) de los ratones sépticos, mientras que redujo significativamente los niveles séricos de urea (67%), creatinina (100%), alanina aminotransferasa (53%), TNF- α (90%) e IL-6 (70%), comparado con los ratones no tratados. La actividad MPO en pulmón y el contenido MDA en tejido hepático fueron significativamente menores en los ratones alimentados con Lr (40 y 75%) respecto al grupo no tratado, en tanto que los valores de GSH en hígado aumentaron y se normalizaron en el grupo Lr. Los ratones alimentados con Lr presentaron un aumento en la población de células CD4 (8%) en bazo. Este trabajo demuestra que *L. reuteri* CRL 1101 posee propiedades antiinflamatorias *in vivo* que lo convierten en un posible candidato para la elaboración de un producto probiótico.

431. (398) LACTOBACILLUS. PLANTARUM: EFECTO SOBRE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOFILM, RESPUESTA INFLAMATORIA Y PROCESO DE REEPITELIZACIÓN EN HERIDAS

Montanari, J.¹, Herrera, L.², Ortiz Mayor, S.², Rachid, M.¹, Valdez, J.¹

Instituto de Microbiología- Cátedra de Inmunología- Facultad de Bioq. Química y Farmacia- U.N.T.¹ Laboratorio de Anatomía y Patología- Hospital Padilla- San Miguel de Tucumán²

Las heridas crónicas se caracterizan por presentar infecciones con bacterias formadoras de biofilm, siendo más resistentes a los mecanismos de defensa del hospedador. Esto retrasa el proceso de cicatrización. Estudiar cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de úlceras de pie diabético (capacidad formadora de biofilm, resistencia antibiótica), evaluar *in vitro* la capacidad antimicrobiana e inhibitoria de *L. plantarum* sobre formación de biofilm de *S. aureus* y establecer en un modelo murino de infección el rol de *S. aureus* en la inducción de un estado inflamatorio crónico y el efecto de *L. plantarum* en la cicatrización. Se estudio: Resistencia a antibióticos de cepas de *S. aureus* aisladas de biopsias de úlceras de pie diabético, usando métodos bacteriológicos, capacidad de las cepas para formar biofilm *in vitro* y actividad inhibitoria de *L. plantarum* sobre formación de biofilm mediante técnica de O'Toole y Kolter y viabilidad por técnica de XTT. Ensayos *in vivo*: modelo de Inducción e infección de herida en ratones con cepas de *S. aureus* (10^7 UFC/ml) y tratamiento con *L. plantarum*, durante 10 días. Se tomaron muestras a los 3, 6 y 10 días posttratamiento Se realizaron: a) Estudios Histológicos b) Cuantificación del infiltrado de células inflamatorias por inmunohistoquímica.. c) Coloración de Gram. d) Cuantificación de la carga bacteriana en la herida (UFC/g de tejido). Todas las cepas de *S. aureus* aisladas fueron capaces de formar biofilm *in vitro* los cuales fueron inhibidos en presencia de *L. plantarum*.. Los ratones tratados con *L. plantarum* mostraron disminución de las UFC/grs de tejido (3 días 10^6 UFC/ml, 6 días 10^5 UFC/ml y 10 días 10^3 UFC/ml) comparado con los no tratados $p < 0.01$ y aumento de tejido de granulación (angiogénesis y fibroplasia) y reepitelización a los 6 días pos-tratamiento, escasa infiltración de neutrófilos. *L. plantarum*, disminuye marcadamente el proceso inflamatorio, la infección y favorece el proceso de cicatrización de heridas.

432. (474) LACTOBACILLUS JENSENII TL2937 MODULA LA EXPRESIÓN DE REGULADORES NEGATIVOS DE TLR4 EN CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO DE INTESTINO PORCINO A TRAVÉS DE TLR2

Villena, J.^{1,2}, Fujie, H.², Aso, H.², Ikegami, S.², Itoh, H.², Alvarez, S.¹, Kitazawa, H.²

Centro de Referencia para Lactobacilos¹ Food Immunology Group, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan.²

Lactobacillus jensenii TL2937 (Lj) modula la respuesta inflamatoria producida por la activación de TLR4 en células presentadoras de antígeno (CPA) de placas de Peyer (PP) porcinas. En este trabajo estudiamos el papel de TLR2 y de los reguladores negativos de TLR (TNRs) en el efecto de Lj sobre las CPA. El estudio se llevó a cabo en cultivos de células adherentes de PP y en cultivos de células CD172a+ obtenidas por el sistema de separación celular MACS (separación celular magnética). Tres grupos de CPA fueron definidas por citometría de flujo: células CD172a+CD11R1-, CD172a-CD11R1low y CD172a+CD11R1high. La estimulación de CPA con Lj, en ausencia de estímulo inflamatorio, incrementó la expresión de MHCII, CD80/86, TLR2 e IL-10 en las células CD172a+CD11R1high y CD172a+CD11R1-, mientras que TGF- β se incrementó sólo en la población CD172a+CD11R1high. Se observó además un incremento en la expresión de tres TNRs en las CPA tratadas con Lj: SIGIRR, A20 e IRAK-M ($P < 0,01$). Se evaluó además la actividad inmunomoduladora de Lj en CPA desafiadas con LPS. El estímulo inflamatorio incrementó los niveles de MHCII, CD80/86, TNF- α , IL-6 e IFN- γ en las CPA; mientras que IL-10 y TGF- β se redujeron en las células CD172a+CD11R1- y CD172a+CD11R1high respectivamente ($P < 0,01$). Las CPA estimuladas con Lj antes del desafío con LPS mostraron niveles más bajos de TNF- α e IL-6. Además Lj evitó la disminución de IL-10 y TGF- β inducida por LPS. Demostramos también que TLR2 esta involucrado parcialmente en la actividad anti-inflamatoria de Lj, ya que el tratamiento conjunto de CPA con Lj y anticuerpos anti-TLR2 bloqueó los incrementos de SIGIRR e IRAK-M en las células CD172a+ así como la producción de IL-10 en respuesta a LPS. En este trabajo avanzamos en el conocimiento de los mecanismos implicados en la actividad anti-inflamatoria de Lj, demostrando que la bacteria láctica puede modular la expresión de TNRs en CPA y que dicho efecto esta parcialmente mediado por TLR2.

433. (714) EFECTO DE BACILLUS CEREUS SOBRE CÉLULAS EUCARIÓTICAS: MODULACIÓN DE LA RESPUESTA POR LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP LACTIS

Rolny, I.¹, Tiscornia, I.³, Bollati, M.³, Pérez, P.^{1,2}

Catedra de Microbiología-Facultad de Ciencias Exactas-UNLP¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA)- UNLP² Instituto Pasteur de Montevideo, Unidad de Biología Celular.³

Se determinó la producción de citoquinas, marcadores de diferenciación y activación en células HT-29-GFP y células dendríticas (CD) obtenidas por diferenciación de PBMC humanas en respuesta a la interacción con *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 y *Bacillus cereus* B10502. Se analizaron tres condiciones de infección, la cepa B10502 sola o en co-infección con la cepa 133, y la cepa 133 sola (Mult. de infección = 20); 18 hs de incubación. Se estudió la expresión de NF- κ B y la producción de IL-8 en células HT-29 transfectadas (reportero GFP). En co-cultivos de CD y HT-29 se determinó la producción de citoquinas y CD86. La infección con *B. cereus*, solo o con el lactobacilo, no produjo valores superiores al 10 % de células que expresen NF κ B (control con TNF- α 30%). La expresión de IL-8 (pg/ml) se vio incrementada en la infección con B10502 ($2009,8 \pm 131,8$), mientras que en la co-infección con 133 el incremento fue menor ($562,2 \pm 27,7$). La cepa 133 sola no indujo una expresión significativa de IL-8 ($143,7 \pm 18,9$). En cuanto a la producción de citoquinas en co-cultivos de CD/HT-29 la expresión de IL-8 se incrementó en las tres condiciones, mientras que IL-10 e IL-12 no se vieron modificadas. La expresión de IL-6 no se modificó al incubarse con la cepa 133 ($87,6 \pm 124$), mientras que la cepa B10502 produjo un aumento ($890,6 \pm 263$), el cual no se vio afectado por la presencia del lactobacilo ($1091,5 \pm 55,7$). La expresión de TNF- α aumentó en todas las condiciones (B10502: $2773,6 \pm 438,5$, B10502 + 133: $5990,5 \pm 421,31$, 133: $3781,9 \pm 2928,2$) y lo mismo

se observó para la expresión de CD86 (B10502: $611,1 \pm 77,8$, B10502 + 133: $546,2 \pm 13,9$, 133: $346,1 \pm 121,2$). Los resultados muestran que la cepa B10502 induce una respuesta en células eucarióticas (producción de IL-6, IL-8 y TNF- α). En ausencia de CD, la producción de IL-8 puede ser modulada por la cepa 133. Esto indicaría la importancia del entorno celular para modificar el efecto de patógenos a nivel intestinal.

434. (824) ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOMODULATORIA DE LACTOBACILLUS KEFIR EN UN MODELO MURINO DE COLITIS AGUDA INDUCIDA POR DSS

Carasi, P.¹, Racedo, S.², Serradell, M.¹, Urdaci, M.²
Cat Microbiologia Gral, Fac. Cs Exactas, UNLP¹ Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Appliquée, Bordeaux Science Agro, Francia²

Lactobacillus kefir es una especie presente en un producto fermentado artesanal que se obtiene por fermentación de la leche con gránulos de kefir. Estudios previos han demostrado el potencial probiótico de este microorganismo y su capacidad inmunomoduladora in vitro. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad inmunomoduladora de una cepa de *L.kefir* en un modelo de colitis aguda inducida por dextran sulfato de sodio (DSS) en ratones Swiss. Se administraron diariamente 10^8 ufc/animal de *L. kefir* CIDCA 8348 por vía oral durante 21 días, comenzándose el tratamiento con DSS 2% p/p en el agua de bebida a los 14 días de iniciado el tratamiento probiótico. Al finalizar la experiencia, se observó a nivel macroscópico que los ratones que sólo recibieron DSS sufrieron un importante acortamiento del colon, sin embargo, esto no ocurrió en los animales tratados con *L.kefir* ($P < 0.05$). Al estudiar la producción de citoquinas *ex vivo* por esplantes de colon, se pudo observar una disminución significativa en la producción de GM-CSF, IL-17, IFN-gamma y TNF-alfa en los tejidos provenientes de animales tratados respecto del grupo que recibió sólo DSS. Por otro lado, se analizó mediante qRT-PCR la expresión de interleuquinas, quimocinas y otros mediadores en colon: la expresión de los genes de IL-1, IL-6, CXCL1, GM-CSF, IL-17 e IFN-gamma fue significativamente menor en los ratones tratados que en los que recibieron sólo DSS ($P < 0.05$); TNF-alfa, IL12, IL-23, ROR γ T y FOXP3 no modificaron sus niveles. La expresión de IL-10 aumentó en los ratones tratados con *L. kefir* ($P < 0.05$), mientras de TGF-beta, APRIL, BAFF y plgR no mostraron variaciones respecto del grupo que solo recibió DSS. Estos resultados indican que la administración de *L.kefir* atenúa los daños generados por la administración de DSS al disminuir la expresión de mediadores proinflamatorios en el colon.

435. (243) LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE OMP16S COMO ADYUVANTE INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA EN PULMÓN CON RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS Y PRODUCCIÓN DE QUIMOCINAS

Ibañez, A.¹, Grossi Goncalves, L.², Coria, L.¹, Delpino, M.¹, Pasquevich, K.¹, Risso, G.¹, Bruno, L.¹, Oliveira, S.³, Giambartolomei, G.¹, Cassataro, J.¹
INIGEM, UBA¹ Instituto Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais², Dept of Biochemistry and Immunology, Inst of Biological Sciences, Fed University of Minas Gerais³

Resultados previos demuestran que la porción proteica de la lipoproteína de *Brucella* (Omp16S) al ser administrada por vía intranasal (i.n) utilizando como antígeno (Ag) modelo ovalbúmina (OVA) induce una respuesta T helper (Th) 1 sistémica. Los adyuvantes de mucosas pueden inducir respuestas inmunes de diferentes maneras, por ejemplo reclutando células inflamatorias o aumentando la cantidad de Ag en los sitios inductivos. Teniendo esto en cuenta, nos planteamos estudiar el mecanismo mediante el cual Omp16S puede inducir una respuesta Th1. Para estudiar si Omp16S induce el reclutamiento de células inflamatorias se administraron ratones por vía i.n con PBS u Omp16S. La administración de Omp16S induce un aumento en el reclutamiento de células inflamatorias en el lavado bronquio-alveolar (BAL) 12 hs post administración ($P = 0,035$). Omp16S indujo un aumento en los niveles de quimocinas y citocinas (CCL2, CCL3, CCL5, TNF- α e IL-10) en BAL y en pulmón a las 12 y

24 hs post-administración ($P = 0,003$). Luego evaluamos si Omp16S era capaz de aumentar la internalización del Ag en los tejidos de pulmón. La administración i.n con Omp16S+OVA-AlexaFluor (647) indujo un aumento en la cantidad de Ag en el pulmón a las 12 hs, respecto a los animales administrados con OVA ($P = 0,0158$). Luego estudiamos si Omp16S era capaz de inducir una respuesta Th1 en pulmón. Para esto se inmunizaron animales por vía i.n con OVA, Omp16S+OVA o toxina colérica (TC)+OVA. Mediante citometría de flujo determinamos que Omp16S indujo un aumento en el porcentaje de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ en pulmón (2,38%) respecto a los inmunizados con TC+OVA (0,2%) u OVA (1,3%). En conclusión Omp16S administrada i.n lleva a cabo su actividad adyuvante Th1 mediante la producción de quimocinas, el reclutamiento de células inflamatorias, la producción de TNF- α , y el aumento de la cantidad de Ag en pulmón.

436. (406) MODULATION OF NEUTROPHIL MIGRATORY PATTERN AFTER IMMUNE COMPLEX STIMULATION

Gorlino, C.^{1,2}, Harman, F.¹, Ranocchia, R.¹, García, A.¹, Morón, G.¹, Maletto, B.¹, Heeringa, P.², Pistoresi, M.¹
Departamento de Bioquímica Clínica (Facultad Ciencias Químicas UNC) - CIBICI (CONICET)¹ Department of Pathology and Medical Biology- UMCG, Groningen, The Netherlands²

Neutrophils recruited from the blood to inflammatory sites are key contributors to the nature of an immune response; however, their presence in chronic inflammatory sites, such as in immune complex (IC)-mediated autoimmune diseases, can be pathogenic. In this study we wanted to determine if IC-stimulation could modulate the expression of migratory molecules and receptors and, hence, drive neutrophil migration. We showed that after in vitro OVA/anti-OVA IC stimulation, murine neutrophils downregulated twofold the surface expression of CD62L ($p < 0.05$), whereas upregulated twofold their expression of LFA-1 ($p < 0.05$). Interestingly, IC also induced the expression of the chemokine receptor CXCR3 on neutrophils ($p < 0.05$). Additionally, we found that mRNA expression of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor S1PR4 was increased threefold in neutrophils stimulated with IC ($p < 0.01$). In parallel, we performed flow cytometric analysis in normal human blood samples to determine if IC could also regulate the expression of these migratory molecules on human neutrophils. We showed that a subset of CD16^{high}CD62L^{low} neutrophils appeared after stimulation with heat aggregated IgG (HAGG). Moreover, this subpopulation showed to decrease threefold the expression of CXCR2, while upregulated two- and four-fold the expression of both CXCR3 and CD54, respectively, in comparison to the CD16^{high}CD62L^{high} neutrophil subset ($p < 0.01$). When we investigated the signal pathways involved in the regulation of the surface expression of these molecules, we showed that the upregulation of CD54 on CD16^{high}CD62L^{low} neutrophils was altered after rapamycin treatment ($p < 0.05$), showing that mTOR could be a signal pathway involved in the modulation of CD54 expression. Taken together, the results presented here demonstrated that the stimulation with IC modulate the expression of multiple intercellular adhesion molecules and receptors comprised in neutrophil trafficking.

437. (420) LA DEFICIENCIA DE IL-12P40 MODIFICA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN PULMÓN LUEGO DE LA INFECCIÓN ORAL CON YERSINIA ENTEROCOLITICA O:3 EN RATONES

Gutiérrez, J.¹, Valdez, S.³, Di Genaro, S.², Gomez, N.¹
Depto de Bioquímica y Cs. Biológicas, Fac. de Qca. Bioqca y Fcia¹ IMIBIO- CONICET - UNSL² Universidad Nacional de Cuyo, Centro Científico Tecnológico (CCT), CONICET-Mendoza³

Yersinia enterocolitica es una enterobacteria que puede causar infección sistémica con formación de abscesos en hígado, bazo y pulmón. Se ha demostrado que interleuquina-12 (IL-12) cumple un rol crítico en la respuesta inmune frente a *Yersinia*. En trabajos previos demostramos que IL-12p40 contribuye a la protección de la injuria en pulmón luego de la infección oral con esta bacteria. Sin

embargo, los mecanismos que median esta respuesta protectora no han sido totalmente dilucidados. El objetivo fue determinar los niveles de expresión de ARNm de TLR2 y TLR4 y de moléculas asociadas con el incremento de la permeabilidad vascular y de quimiocinas y correlacionarlos con la infiltración de poliformonucleares en pulmón de ratones *IL-12p40^{-/-}* (KO) y wild-type (WT), tanto en la fase aguda como crónica de la infección. Ratones WT y KO fueron infectados por vía intragástrica con $2 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ UFC de *Y. enterocolitica* O:3. A los 3, 14 y 21 días post infección (pi) los ratones fueron sacrificados. Se evaluó la expresión de ARNm de MIP-2, KC, MCP-1, RANTES, ICAM-1, TLR2 y TLR4 por RT-PCR a partir del tejido pulmonar. Se comparó la histoarquitectura del órgano en ratones KO y WT. Se detectó el día 14 p.i., en ratones KO un incremento en la expresión de ICAM-1 y TLR2 ($p < 0,05$) y una disminución en la expresión de KC, MIP-2 y MCP-1 ($p < 0,05$) comparado con el grupo WT. La expresión del ARNm de TLR4 aumentó en ratones KO aunque no significativamente, en este mismo tiempo p.i. El aumento de la expresión de TLR2, e ICAM-1 se asoció con el mayor reclutamiento de poliformonucleares en los pulmones de ratones KO, exacerbando el cuadro inflamatorio en pulmón. Concluimos que la deficiencia en *IL-12p40* afecta mecanismos de defensa innata contra *Y. enterocolitica*, en pulmón.

438. (470) ACUMULACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN EL PULMÓN DE RATONES OBESOS

Della-Vedova, M.², Gomez, N.¹, Ramírez, D.², Gomez-Mejiba, S.²

Fac. de Química Bioqca y Fcia, UNSL, IMIBIO- CONICET¹
Lab. de Medicina Experimental y Terapéuticas. IMIBIO-
CONICET, UNSL²

Debido a su histología, la microvasculatura pulmonar tiene abundantes neutrófilos, lo cual podría ser modificado en una situación de obesidad y/o por la inhalación de irritantes. Mieloperoxidasa (MPO) es una proteína mayoritaria en neutrófilos y es la única que produce ácido hipocloroso o hipoclorito (HOCl/OCl), uno de los oxidantes más nocivos. La hipótesis que planteamos es que el pulmón de animales obesos es más sensible a los irritantes del aire debido a una mayor retención y/o activación de neutrófilos. Para probar esta hipótesis alimentamos por 20 semanas ratones machos C57BL/6 con a una dieta donde el (60% Kcal es provista por grasa saturada) grupo obeso (GO), o normal (10% Kcal provista por grasa saturada) grupo control (GC). Todos los estudios fueron llevados a cabo de acuerdo a las guías institucionales para el uso de animales de experimentación. El pulmón de ratones GO mostró mayor proporción de neutrófilos ($p < 0,05$), ICAM-1, actividad de MPO y un marcador de la activación de neutrófilos; clorotirosina (por western blot) que el pulmón de GC ($n=9$). La concentración de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1) en suero y la activación del NF- κ B incrementaron significativamente ($p < 0,05$) en GO instilados con lipopolisacáridos (LPS) con respecto a GC, en vías respiratorias. No obstante, al instilar en tráquea N-acetilcisteína, por 5 días (antes de la eutanasia) disminuyó la retención de neutrófilos, MPO, la activación de NF- κ B y la expresión de ICAM-1 ($p < 0,05$) en el pulmón de GO y también se regularizó la respuesta inflamatoria sistémica a LPS (similar a GC). Concluimos que la retención y activación de los neutrófilos en el pulmón GO contribuiría a una mayor sensibilidad de los sujetos obesos a la irritación de las vías respiratorias. Además, la retención/activación de neutrófilos en el pulmón GO podría ser un blanco terapéutico para disminuir la incidencia de anomalías metabólicas en sujetos obesos expuestos a endotoxina.

439. (480) LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA MODIFICA EL PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN DE CITOQUINAS EN DISTINTOS ÓRGANOS DEL SISTEMA INMUNE

Cela, E., Paz, M., Friedrich, A., Leoni, J., González Maglio, D.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, IDEHU,
CONICET

Introducción: La piel es el órgano más extenso del cuerpo y el principal blanco de la radiación UVB (rUVB). Ésta tiene efec-

tos benéficos (síntesis de vitamina D) y nocivos (tumorigénesis cutánea) e induce la expresión de citoquinas que, liberadas en la epidermis, pueden penetrar y ejercer efectos en las capas profundas de la piel (dermis) y en órganos linfoides. **Objetivo:** evaluar la expresión de diferentes citoquinas (a distintos tiempos) en la epidermis (*Ep*), dermis (*Der*), ganglios inguinales (*Gl*) y axilares (*GA*) de ratones expuestos a distintas dosis de rUVB. **Materiales:** Se usaron grupos de 5 ratones SKH:1: control; 400 mJ/cm² 24h; 400 mJ/cm² 8d; 4 dosis de 20 mJ/cm² 24h y 4 dosis de 20 mJ/cm² 8d. Se extrajo piel (se separó *Ep* de *Der*), *Gl* y *GA* de cada animal. El ARN, extraído utilizando TRIzol, fue copiado a ADNc mediante RT-PCR y amplificado por PCR para: TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-4 y GAPDH. Los productos (separados en un gel) se analizaron con el programa ImageJ. **Resultados:** *Ep*: 400 mJ/cm² disminuyen TNF- α e IL-10 a las 24h post-UVB ($p < 0,05$), acentuándose a los 8d ($p < 0,01$); 4x20 mJ/cm² disminuyen levemente TNF- α a las 24 h y 8d ($p < 0,05$), mientras que IL-10 recién disminuye a los 8d ($p < 0,05$). *Der*: 400 mJ/cm² disminuyen rápidamente TNF- α ($p < 0,01$) normalizándose a los 8d; 4x20 mJ/cm² disminuyen levemente TNF- α a las 24h y 8d ($p < 0,05$). No se detectó expresión de IL-10 e IL-6 en ninguna condición. *Gl*: no se detectaron IFN- γ ni IL-4 y los niveles de IL-10 fueron iguales a los normales. *GA*: no se detectó IL-10 ni IL-4 pero sí INF- γ : 400 mJ/cm² aumentan sus niveles a las 24h y a los 8d ($p < 0,05$) mientras que 4x20 mJ/cm² producen sólo un leve incremento recién a los 8d ($p < 0,05$). **Conclusión:** Se detectó la transcripción de citoquinas en diferentes órganos. Existe una dependencia de la dosis y del tiempo post-UVB en el perfil de inducción. El aporte principal del trabajo radica en evaluar la transcripción de citoquinas en órganos linfoides alejados del sitio de irradiación.

440. (525) YERSINIA ENTEROCOLITICA INTERACCIONA CON CÉLULAS DENDRÍTICAS DE PLACAS DE PEYER Y REDUCE LA FRECUENCIA DE SUBPOBLACIONES CLAVES EN LA ERRADICACIÓN DE LA INFECCIÓN

Eliçabe, J.¹, Silva, J.¹, Dave, M.¹, Cargnelutti, E.¹, Auntenrieth, I.², Di Genaro, S.¹

Lab de Inmunopatología y Citometría de Flujo IMIBIO
CONICET-UNSL¹ Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Hygiene. Universität Tübingen, Tübingen Alemania.²

El intestino está dotado de un sistema inmunológico que incluye como sitios inductores las placas de Peyrer (PP) y los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM). *Y. enterocolitica* (*Ye*) es una bacteria Gram-negativa que invade las PP y causa infecciones gastrointestinales. En las PP pueden hallarse tres subpoblaciones de células dendríticas (CDs), todas ellas expresan CD11c pero presentan localización y funciones diferentes. En la región del domo subepitelial (DSE), se encuentran CDs que expresan CD11b y secretan IL-10. Las CDs de la región interfolicular (RIF) expresan CD8aa. La tercera subpoblación, no expresan CD11b ni CD8aa (dobles negativas, DN) y se encuentran en la RIF y DSE. Las CDs CD8aa⁺ y DN secretan fundamentalmente IL-12p70. El objetivo del presente trabajo fue analizar la localización de *Ye* en PP y su interacción con CDs. Ratones C57BL/6 hembras (6-8 semanas de edad) fueron infectados por vía oral con *Ye* serotipo O:8 WA-314 (*Ye* WAP) o *Ye* que expresa la proteína fluorescente verde (*Ye*-GFP). Al día 3 o 5 post-infección (p.i), los ratones fueron sacrificados y las CDs de PP analizadas por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Al día 3 p.i, *Ye* coloniza las PP formando abscesos en la región apical de la PP que son rodeados de células CD11c⁺. El análisis de las células obtenidas de PP, demostró una fuerte asociación de *Ye*-GFP con células Gr-1⁺, CD11c⁺ y en menor medida con células CD3⁺. Por otro lado, al día 5 p.i se observó una marcada reducción en la frecuencia de CDs CD8a⁺ y DN en los ratones infectados con *Ye* en comparación con los no infectados ($p < 0,05$). En conclusión, estos resultados indican que *Ye* interacciona con CDs de PP y reduce la frecuencia de CDs CD8a⁺ y DN involucradas en la respuesta inmune frente a la infección.

441. (554) CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINAS 1, 3, 4 Y 9 EN LA MUCOSA INTESTINAL DE

PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTES-TINAL Y SU VALIDACIÓN COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA

Papa Gobbi, R.¹, Rocca, A.², Sambuelli, A.², Bellicoso, M.², De Francesco, P.¹, Toscano, M.³, Muglia, C.¹, Rabinovich, G.³, Docena, G.¹

Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune, UNLP¹ Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo² Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET³

Las galectinas son un grupo de proteínas evolutivamente muy conservado e implicado en diversas funciones biológicas, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Entre estas se encuentran: activación de células, regulación del ciclo celular y apoptosis. Las enfermedades inflamatorias gastrointestinales (EIG) son patologías multifactoriales, caracterizadas por focos inflamatorios persistentes y recidivantes, siendo la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) las formas mejor definidas. Se ha descrito que las EIG pueden estar relacionadas con cambios en la expresión de distintas galectinas, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue analizar la misma en distintas porciones del intestino grueso de pacientes control y con EIG y determinar su utilidad como predictores de la patología. A partir de muestras de mucosa intestinal se analizó la expresión de galectinas 1, 3, 4 y 9 por RT-qPCR, y determinó que en condiciones fisiológicas la misma es homogénea a lo largo del colon ($p > 0,05$). En una segunda instancia se analizaron muestras de pacientes con CU ($n=25$) y EC ($n=11$), observándose que la expresión de las galectinas 3, 4 y 9 es significativamente inferior que en los pacientes control ($n=22$) ($p < 0,01$). Contrariamente, en el caso de galectina 1 la misma resultado significativamente mayor en los pacientes con CU que en los pacientes control ($p < 0,001$) y EC ($p < 0,001$). Para probar que la expresión de galectinas puede ser usado como método predictivo de EIG se realizó un análisis discriminante basado en la expresión conjunta de las galectina 1, 3, 4 y 9, pudiéndose identificar en validación cruzada a los pacientes con EIG en un 91,7% de los casos, y diferenciar CU de EC con una tasa de acierto cercano al 70%. Estos resultados indican que la expresión de galectinas podría emplearse con valor diagnóstico o pronóstico y podría guardar relación con la fisiopatología de la enfermedad.

442. (611) GALECTINA 1 Y GALECTINA 3 SON EXPRESADAS Y PRODUCIDAS DE MANERA DIFERENCIAL EN LA MUCOSA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Papa Gobbi, R.¹, Sambuelli, A.², Rocca, A.², Drut, R.⁴, Toscano, M.³, Muglia, C.¹, Rabinovich, G.³, Docena, G.¹
Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune, UNLP¹ Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo² Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental³ Hospital de Niños Superiora Sor María Ludovica⁴

Las enfermedades inflamatorias gastrointestinales (EIG), enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerosa (CU), son patologías multifactoriales caracterizadas por la instauración de procesos inflamatorios crónicos en la mucosa del tracto gastrointestinal. Las galectinas son glicoproteínas que se expresan en la gran mayoría de los tejidos y han sido relacionadas con la fisiología del sistema inmune, tanto en condiciones de homeostasis como patológica. Dado que se las ha asignado un rol central en numerosos procesos inflamatorios decidimos estudiar su posible vinculación con estas patologías. En muestras de mucosa colónica de pacientes con EC y CU se analizó la expresión (RT-qPCR) y producción (inmunohistoquímica e inmunoblotting) de galectina 1 y 3, así también como la de sus receptores y su rol funcional en la inducción de apoptosis (citometría de flujo). Utilizando biopsias y piezas quirúrgicas de pacientes control ($n=22$), pacientes con CU ($n=25$) y EC ($n=11$) se observó que la expresión de Gal-1 se encuentra significativamente incrementada en los casos de CU, en relación a los controles y de los pacientes con EC ($p < 0,05$). Contrariamente, la expresión de Gal-3 esta disminuida, tanto en CU y EC en relación a los controles ($p < 0,01$). Sin embargo, los

niveles de ambas proteínas se hallaron disminuidas en zonas inflamadas, así como los receptores para Gal-3 en los linfocitos T CD3⁺ de pacientes con CU ($p=0,06$). En ensayos *in vitro* Gal-1 mostró un efecto pro-apoptótico sobre linfocitos T CD4⁺ de la lamina propia (12,4% vs 3,8%, Gal-1 vs controles). Dado que se ha descrito un efecto pro-apoptótico de estas galectinas sobre LT activados estos resultados indicarían que el déficit de ambas en el tejido inflamado así como la disminución de sus receptores específicos, podría contribuir a la persistencia del foco inflamatorio.

443. (635) EXPRESIÓN DE ALFA-1-ANTITRIPSINA (A1AT) EN LA RETINA DE RATAS DIABÉTICAS Y NO DIABÉTICAS

Ortiz, G., Mancini, J., Gallo, J.
Universidad Austral

Introducción: La retinopatía diabética (RD) es la causa más frecuente de ceguera en la población en edad laboral. Los procesos inflamatorios en patologías oculares son de relevancia debido a la posibilidad de causar ceguera. Las herramientas clásicas que dispone el oftalmólogo para limitar la reacción inflamatoria están circunscriptas a dos tipos de drogas: los anti-inflamatorios no esteroides (AINES) y los corticoides. Ambas drogas son efectivas y bastante bien toleradas en procesos inflamatorios. Sin embargo, el **problema aparece cuando se requiere la administración prolongada**. En este trabajo se desea evaluar la presencia de la alfa-1-antitripsina (A1AT), una enzima con propiedades anti-inflamatorias, en retinas de animales diabéticos y sanos. **Objetivo:** Identificar la presencia de la alfa-1-antitripsina (A1AT), un inhibidor de serino proteasas (*serpin*), en la retina de ratas diabéticas y no diabéticas. **Métodos:** Al segundo día de vida las ratas Wistar neonatales recibieron una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). Se clasificaron como ratas diabéticas aquellas que luego de 2 días desde la inducción con STZ tenían una glucemia mayor a 200 mg/dl. Grupos de cuatro ratas diabéticas y cuatro ratas control fueron sacrificadas y analizadas a las 16 semanas. Se realizaron extractos proteicos a partir de las retinas (control vs. diabéticos) y en ellos se analizó la expresión de A1AT con la técnica de *western blot* (WB). Para este ensayo se utilizó un anticuerpo primario anti-A1AT y como control anticuerpos anti-GAPDH. Además, cortes transversales de las retinas remanentes fueron montados en portaobjetos y analizados mediante inmunofluorescencia utilizando el mismo anticuerpo antiA1AT. **Resultados:** En los ensayos de WB se identificó la expresión de la proteína A1AT en extractos proteicos de retina en los animales diabéticos y no diabéticos. No se observaron diferencias significativas en la expresión de la enzima entre los dos grupos de animales. **Conclusión:** Nuestra investigación muestra por primera vez la presencia de la A1AT en la retina de animales diabéticos y no diabéticos. Estos resultados junto a la incorporación reciente de la A1AT en el tratamiento de la diabetes tipo 1 sugieren estudiar el posible rol de dicha proteína en procesos inflamatorios de la retina como es el caso de la RD.

444. (650) MODULACIÓN DE RECEPTORES QUIMIOTÁCTICOS EN CÉLULAS MICROGLIALES POR RECEPTORES SEMEJANTES A TOLL

Peralta Ramos, J., Gaviglio, E., Arroyo, D., Bussi, C., Rodríguez-Galán, M., Iribarren, P.
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología - CONICET, FCQ, UNC

Las células microgliales (CM) son componentes del sistema inmune intrínseco al sistema nervioso central (SNC) y participan en las respuestas inducidas por infecciones, inflamación aséptica, injuria y/o neurodegeneración. Estas células, se acumulan en los sitios de lesión en respuesta a agentes quimiotácticos que se generan bajo circunstancias inflamatorias. La capacidad de las CM de migrar y acumularse en los sitios de injuria depende en gran medida del grado de expresión y de la función de receptores quimiotácticos, tales como mFPR2, CCR2 y CX₃CR1 entre otros. En trabajos previos demostramos que un agonista del receptor semejante a Toll 2 (TLR2), peptidoglicano (PGN) derivado del *Staphylococcus aureus*, indujo un incremento considerable en

la expresión de mRNA del receptor quimiotáctico *mFPR2* en CM de ratón. En este trabajo evaluamos el papel que cumplen TLR2 y TLR4 en la regulación de la expresión y función de receptores quimiotácticos importantes en la neuroinflamación como CCR2 y CX₃CR1. En primer lugar, al evaluar la expresión de CCR2 en cerebros de ratones C57BL/6 inyectados sistémicamente con 40 ug de lipopolisacárido (LPS), observamos un aumento del transcrito del gen de CCR2 en cerebro total de ratones endotoxémicos, en comparación con los controles ($p < 0.01$). Además, observamos un aumento de la expresión de la quimiocina CCL2 (agonista de CCR2) en cerebros de ratones endotoxémicos ($p < 0.001$). Por otro lado, en experimentos preliminares observamos que la estimulación directa de una línea celular de CM murinas con PGN y LPS *in vitro*, induciría una disminución de la expresión de los genes de CCR2 y CX₃CR1. Estos datos sugieren que la estimulación de TLR2 y TLR4 en CM induciría la modulación de receptores quimiotácticos claves en la respuesta neuroinflamatoria, aunque es necesario profundizar estos estudios a los fines de determinar los mecanismos precisos de esta modulación y qué consecuencias tendrían sobre la respuesta neuroinflamatoria.

445. (99) AUMENTO DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS CCR1, CCR2 Y CCR5 EN MONOCITOS DURANTE EL PERÍODO AGUDO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

Ramos, M.¹, Panek, C.¹, Abrey-Recalde, M.¹, Exeni, A.², Laso, M.², Exeni, R.², Palermo, M.¹

Instituto de Medicina Experimental-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹, Hospital del Niño, San Justo²

Los monocitos (Mo) participan en la respuesta inflamatoria en el SUH. Diferentes subpoblaciones de Mo coexisten en circulación. En niños sanos, más del 80% de los Mo periféricos son CD14⁺CD16⁻, y están caracterizados como células CCR2⁺CCR5⁺CCR1⁺ (Mo clásicos). La subpoblación minoritaria CD14⁺CD16⁺ (Mo inflamatorios) expresan CCR5 pero niveles reducidos de CCR2 y CCR1. Los receptores de quimioquinas CCR1, CCR5 y CCR2 participan en diferentes nefropatías y su bloqueo mejora la función renal. Por ello, se propuso como objetivo analizar si la expresión de estos receptores está alterada en los Mo durante el SUH. Para ello se analizó en sangre periférica de pacientes con SUH durante el período agudo y de niños sanos ($n=12$), la expresión de los receptores CCR1, CCR2 ó CCR5 en ambas subpoblaciones de Mo identificadas por la presencia de CD14 y CD16 mediante citometría de flujo. Los pacientes con SUH mostraron un aumento de la expresión por célula del receptor CCR1 y CCR5 en ambas subpoblaciones de Mo mientras que el CCR2 está alterado básicamente en los Mo inflamatorios. Los resultados se expresan como la IMF de cada receptor en los Mo clásicos/Mo inflamatorios: CCR1 (sanos: $17 \pm 2/15.5 \pm 1$; SUH: $31 \pm 5^*/44.5 \pm 8^*$); CCR2 (sanos: $34 \pm 4/24 \pm 3$; SUH: $39 \pm 3/37 \pm 3^*$); CCR5 (sanos: $5 \pm 1/13 \pm 1$; SUH: $15 \pm 3^*/30 \pm 1^*$), * $p < 0.05$ versus sanos. Por otro lado, se observó una correlación positiva del incremento de CCR1 con la severidad de los pacientes, Spearman $r = 0.58$, * $p < 0.05$. Es interesante destacar que recientemente demostramos que el bloqueo de CCR1 en el modelo murino de SUH, disminuye la respuesta inflamatoria y mejora la función renal. El aumento en la expresión de CCR1, CCR2 ó CCR5 durante el período agudo, puede estar relacionado con la activación ó maduración de los Mo como resultado de la infección por toxina Shiga. Además, las quimioquinas MCP-1, MIP1-a ó RANTES, ligandos de estos receptores, se expresan en endotelio inflamado pudiendo contribuir al reclutamiento de los Mo.

446. (655) REGULACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN GÉNICA DE IL-12 E IL-18

Gaviglio, E., Peralta Ramos, J., Arroyo, D., Rodríguez-Galan, M., Iribarren, P.

Centro de investigaciones en bioquímica clínica e inmunología - CIBICI CONICET- FCQ - UNC

La administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS) genera una tormenta sistémica de citocinas proinflamatorias que inducen

inflamación cerebral y reclutamiento leucocitario. Previamente se reportó que la inyección por vía endovenosa de vectores de expresión (cDNA desnudo) que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18, induce niveles sistémicos altos y persistentes de IL-12, IL-18, TNF α e IFN γ . Este aumento de citocinas induce infiltración de leucocitos en el cerebro y activación de células microgliales (CM) residentes. Este trabajo tiene por objetivo evaluar el impacto de la ausencia de IL-4 sobre la respuesta neuroinflamatoria causada por la inyección hidrodinámica de cDNA de IL-12 e IL-18. Para ello, se inyectaron ratones C57BL6 WT e IL-4 KO con cDNA de IL-12 e IL-18, se sacrificaron siete días post inyección y se perfundieron. Posteriormente, se extrajeron los cerebros, se obtuvieron células totales y se analizaron a través de citometría de flujo utilizando cuatro colores. Los datos preliminares sugieren que la ausencia de IL-4 no modifica el número absoluto de CM, identificadas como CD11b⁺ CD45^{low} (expresión baja de CD45). Tampoco modificaría el aumento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) en CM, luego de la inyección de cDNA de IL-12 e IL-18. Sin embargo este tratamiento induce un mayor reclutamiento de leucocitos periféricos al cerebro, identificados como CD45^{high} (expresión alta de CD45), en ratones IL-4KO ($p < 0,05$). Además estos leucocitos presentan marcada expresión de Ly6C ($p < 0,05$). Mediante la aplicación de un modelo *in vivo* de neuroinflamación inducido por aumento de citocinas sistémicas, en ausencia de LPS, observamos activación de CM y reclutamiento de distintas poblaciones de leucocitos al cerebro. El reclutamiento leucocitario se exacerba en ausencia sistémica de IL-4. Por lo tanto, estos resultados sugieren que esta citocina participaría en la modulación de la neuroinflamación.

447. (668) ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN 5 CEPAS DE RATONES CON DIFERENTE PIGMENTACIÓN

Friedrich, A., Paz, M., Cela, E., Leoni, J., González Maglio, D.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. RA. Margni (IDEHU)-CONICET.

Introducción: la exposición de la piel a la radiación UV (rUV) produce daño directo sobre las células expuestas y afecta al sistema inmune cutáneo y de órganos distantes. Históricamente los estudios relacionados con fotodermatología y fotoimmunología se han desarrollado en diferentes modelos murinos (SKH:1, C57, Balb/c, Swiss) sin compararlos entre sí. **Objetivo:** comparar la respuesta de la piel libre de pelo de 5 cepas de ratones (SKH:1, C57, Swiss, Balb/c y DBA/2) a la irradiación (irrad) con 400 mJ/cm² de rUV, tanto respecto al daño celular directo producido (alteraciones mitocondriales -DiOC₆- y producción mitocondrial de O₂⁻-MitoSOX-) como a la producción de citoquinas en el tejido y en el suero luego de 72 hs. **Resultados:** todas las cepas disminuyeron la función mitocondrial de las células de la epidermis (irrad vs ctrl $p < 0.01$), pero sólo SKH:1 y Balb/c incrementaron la producción de O₂⁻ (irrad vs ctrl $p < 0.001$) mientras que DBA y Swiss no modificaron esta producción y C57 la disminuyó (irrad vs ctrl $p < 0.001$). La comparación entre los animales normales de las 5 cepas indicó diferencias basales entre ellos (DiOC₆: excepto DBA vs Swiss, Swiss vs C57, C57 vs SKH:1 y SKH:1 vs Balb/c, diferentes con $p < 0.05$; MitoSOX: excepto SKH:1 vs Balb/c y C57 vs DBA, diferentes con $p < 0.05$). En epidermis se observaron aumentos no significativos de IL-6 (irrad vs ctrl $p = 0.0556$) y TNF- α ($p = 0.1$) en DBA y sólo de TNF- α en C57 ($p < 0.01$), sin modificaciones en el resto de las cepas. En suero los niveles de IL-6 aumentaron en todas las cepas (irrad vs ctrl $p < 0.05$) obteniéndose para C57 irrad la mayor concentración (SKH:1: 26, C57: 138, Swiss: 95, Balb/c: 26 y DBA: 18 pg/ml). No hubo diferencias en la producción de IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ . **Conclusiones:** las distintas cepas de ratones tienen diferente capacidad de respuesta frente a la exposición cutánea a rUV, esto demuestra que la elección de la cepa a utilizar en ensayos *in vivo* debe ser fuertemente considerada.

448. (742) GENERACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA CON CAPACIDAD AGONISTA TLR4/TLR5

Hiriart, Y.¹, Rossi, A.², Errea, A.¹, Moreno, G.¹, Alzogaray, V.², Goldbaum, F.², Berguer, P.², Rumbo, M.¹

Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune, UNLP¹; Instituto Leloir²

Los agonistas de distintos TLRs han cobrado interés en los últimos años por su potencial aplicación como adyuvantes vacunales. Lumazina sintetasa de *B. abortus* (BLS) es una proteína decamérica que actúa como carrier de antígenos fusionados a su extremo N-terminal y es capaz de activar y madurar células dendríticas vía TLR4. Flagelina (FliC) es el monómero estructural del flagelo bacteriano y por su capacidad agonista de TLR5 ha sido propuesta como adyuvante. El objetivo del presente trabajo fue generar una proteína de fusión con la hipótesis de que la combinación de ambos agonistas en una misma estructura generaría un producto con propiedades biológicas de interés en el campo de los adyuvantes vacunales. Se generó una construcción insertando una secuencia codificante para FliC de *S. tiphimurium* en el extremo N-terminal de BLS. Se la expresó en un sistema bacteriano y purificado por cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales anti-FliC generados en nuestro laboratorio. El análisis por SDS-PAGE mostró una banda del tamaño esperado (52 kDa) que mostró reactividad por westernblot con anticuerpos anti-FliC y anti-BLS. La quimera mostró capacidad agonista TLR5 al estimular la línea reportera Caco-CCL20-luciferasa, que responde a flagelina pero no a otros agonistas de TLRs. La actividad agonista de TLR4 se demostró en un cultivo primario de células adherentes de bazo, poco respondedoras a agonistas TLR5, que produjeron IL-6 frente a la estimulación con la quimera o con BLS. Luego de estimular por vía intranasal o peritoneal animales C3H/HeJ, no respondedores vía TLR4, se analizaron las poblaciones reclutadas por citometría de flujo. En ambos casos el reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la quimera fue comparable al inducido por flagelina. Los resultados obtenidos indican que se ha obtenido una proteína quimera BLS-FliC con capacidad agonista para las vías de TLR4 y TLR5 en la misma molécula, con potenciales aplicaciones en el campo de la vacunación.

449. (749) MODULACIÓN POR EL SISTEMA ADRENÉRGICO DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN MONOCITOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS ACTIVADOS POR TSLP

Gori, S.¹, Vermeulen, M.¹, Scordo, W.², Jancic, C.¹, Ernst, G.¹, Larangeira, A.¹, Geffner, J.¹, Salamone, G.¹

IMEX CONICET, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires¹ Servicio de Medicina Transfusional, Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina²

Existen evidencias relevantes que sugieren que la Linfopoyetina Estromal Tímica (TSLP) juega un importante rol en la patogénesis de enfermedades alérgicas tales como el asma y la dermatitis atópica. El TSLP es capaz de activar células dendríticas (CD) mieloides inductoras de una respuesta Th2 inflamatoria caracterizada por una importante producción de TNF-alfa y baja producción de IL-10. Es sabido que el estrés puede favorecer la patogénesis y la progresión de diferentes enfermedades. El sistema nervioso simpático es el principal responsable de las alteraciones inmunes inducidas por estrés, mediante la liberación de Noradrenalina (NA), el principal neurotransmisor de este sistema. En este trabajo analizamos el impacto del sistema adrenérgico sobre la fisiología de monocitos (Mo) y CD activados con TSLP. Los Mo fueron purificados a partir de sangre periférica de dadores sanos no fumadores, por selección positiva (kit de CD14, Miltenyi, % pureza >95). Para la obtención de CD se diferenciaron a partir de Mo con GM-CSF+IL-4 durante 5 días. Posteriormente tanto los Mo como las CD fueron incubados durante 4 hs con TSLP (50ng/ml y 15ng/ml, respectivamente) y luego se cultivaron estas células con NA a diferentes concentraciones durante 24 hs más. Observamos un incremento en la producción de TNF-alfa y de IL-1 en los Mo cultivados en presencia de TSLP+NA (NA 10⁻⁸ y 5.10⁻⁷M; p<0.01). En el mismo sentido observamos un incremento en la producción de TNF-alfa en CD cultivadas en presencia de

TSLP+NA (NA 10⁻⁷M; p<0.01). Estos resultados sugieren que el sistema adrenérgico induce una clara actividad proinflamatoria sobre Mo y CDs activados con TSLP, mediada principalmente por la producción de TNF-alfa.

450. (784) DOPAMINA Y CABERGOLINA ESTIMULAN LA SECRECIÓN DE IL-6 E IL-8 EN QUERATINOCITOS HUMANOS

Parrado, A., Canellada, A., Abraham, M., Apicella, C., Gentile, T., Rey-Roldán, E.

Cátedra de Inmunología- Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA

Las catecolaminas regulan funciones del eje neuro-inmuno-endocrino. La dopamina podría modular la actividad de los queratinocitos, los cuales sintetizan y expresan receptores catecolaminérgicos además de producir citoquinas/quemoquinas. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la producción de IL-6 e IL-8 en una línea celular no tumoral de queratinocitos humanos (HaCaT) y la implicancia de los receptores dopaminérgicos/ β -adrenérgico y mecanismos oxidativos. Las células fueron estimuladas con dopamina (DA) y cabergolina (agonista dopaminérgico tipo D2). Se determinaron los niveles de IL-6 e IL-8 en los sobrenadantes de cultivo (ELISA) y la proliferación celular (prueba colorimétrica WST-1). Los ensayos se realizaron en presencia o ausencia de antagonistas de receptores dopaminérgicos y β -adrenérgicos (sulpirida y propranolol, respectivamente) y ácido ascórbico (antioxidante). La DA estimuló la producción de IL-6 (10⁻⁶M: 489 \pm 30% y 10⁻⁴M: 894 \pm 114 %, p<0.5) y de IL-8 (10⁻⁶M: 202 \pm 13% p<0.5). Los efectos observados sobre la secreción de IL-6 fueron más potentes que los correspondientes a IL-8 y además reducidos en presencia de ácido ascórbico (IL-6, 10⁻⁶M: 351 \pm 36%). La secreción de IL-6 inducida por DA fue parcialmente reducida por sulpirida (10⁻⁴M: 357 \pm 21% p<0.05 vs DA10⁻⁶M) y suprimida por propranolol (10⁻⁶M: 136 \pm 18% p<0.05 vs DA10⁻⁶M). El antagonista β -adrenérgico bloqueó el efecto de la DA sobre la secreción de IL-8. La inducción de IL-6 por cabergolina (10⁻⁴ M: 318 \pm 43 %) fue reducida por sulpirida (10⁻⁴ M: 148 \pm 11%, p<0.5). La viabilidad no fue afectada por ninguna droga. Los agonistas dopaminérgicos estimulan la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos, citoquinas relacionadas con procesos inflamatorios cutáneos. Estos efectos podrían ser mediados por receptores dopaminérgicos y β -adrenérgicos además de mecanismos oxidativos independientes de receptores.

TRANSDUCCIÓN SEÑALES Y PROLIFERACIÓN CELULAR

451. (6) EFECTOS DE IL-1BETA SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN FIBROSIS QUISTICA

Clazure, M., Valdivieso, A., Massip Copiz, M., Schulman, G., Santa Coloma, T.

Instituto de Investigaciones Biomédicas - UCA - CONICET

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva producida por mutaciones en el gen CFTR (canal transportador de Cl⁻). En trabajos previos estudiamos la posible regulación por CFTR de la expresión de interleuquina 1beta (IL-1beta) en dos líneas celulares: IB3-1 (mutación Δ F508 que afecta el transporte de Cl⁻) y S9 (IB3-1 corregidas mediante un vector viral que expresa CFTR wt). Por *Real Time RT-PCR* demostramos un aumento en la expresión del ARNm de la citoquina en las células FQ con respecto a las controles. En este trabajo se procedió a confirmar estos resultados analizando los niveles de secreción de IL-1beta mediante un inmunoensayo de *DotBlot*. Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa de expresión de IL-1beta en IB3-1 comparada con las células controles. Por otro lado, estudios previos de nuestro laboratorio confirman que existe una falla mitocondrial en FQ localizada en el Complejo I (mCx-I). A partir de estos resultados y conociendo los altos niveles de expresión de IL-1beta en FQ, nos interesó estudiar un posible rol de esta citoquina en la disminución de la actividad del mCx-I. El efecto

de IL-1beta en la actividad mitocondrial se determinó en estas mismas líneas celulares. Se incubaron las células con IL-1beta, se aislaron mitocondrias y se midió la actividad del mCx-I mediante la determinación de la actividad de NADH-citocromo c reductasa y por la técnica *Blue Native Gels*. Al estimular con IL-1beta, se observó una disminución de la actividad del mCx-I en las células controles, mientras que en las células FQ la actividad basal, que es más baja que en los controles, no se vio afectada. Podemos concluir que la IL-1beta se encuentra aumentada en FQ y que modifica la actividad mitocondrial de manera diferente en células normales y en células con la actividad del CFTR afectada. Agradecimientos: Subsidios CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007_0628) y UCA. Becas CONICET (MC, GS, MMMC) y UCA (AGV).

- 452. (732) GALECTINA 1 (GAL1) CO-OPTA POR LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE VEGFR2 (KDR) A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN DIRECTA CON N-GLICANOS COMPLEJOS**
Crocí, D., Salatino, M., Ilarregui, J., Cerliani, J., Dalotto Moreno, T., Mendez Huergo, S., Rabinovich, G.
Instituto de Biología y medicina experimental IBYME-CONICET

La resistencia a las terapias antiangiogénicas basadas en el bloqueo de VEGF, sugiere la presencia de vías alternativas que sostienen la angiogénesis tumoral. Previamente demostramos que Gal1 promueve neovascularización *in vitro* e *in vivo*. En este estudio nos propusimos explorar los mecanismos moleculares que gobiernan la generación de angiogénesis por Gal1. El análisis global de activación de receptores de tipo tirosina-quinasa asociados a fenómenos de neovascularización reveló que Gal1 induce en forma selectiva la fosforilación de VEGFR2 (KDR) en células endoteliales (CE) ($p < 0,01$). Esta activación fue acompañada de un incremento en la fosforilación de PI3K-Akt y Erk1/2 ($p < 0,05$). En este sentido, el silenciamiento de KDR en CE logró prevenir la activación de esta vía inducida tanto por Gal1 como por VEGF. Sin embargo, el silenciamiento de la glicosiltransferasa GnT5 encargada de la generación de N-glicanos complejos, inhibió únicamente la activación de KDR inducida por Gal1. Estos hallazgos fueron confirmados por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación CoIP donde observamos que la unión de Gal1 a KDR es prevenida al silenciar la glicosiltransferasa GnT5 ($p < 0,05$). En cuanto al rol biológico Gal1 sobre CE encontramos que la inhibición de las vías PI3K-Akt y Erk o el bloqueo de KDR inhiben la inducción de proliferación ($p < 0,01$), migración ($p < 0,01$) y morfogénesis endotelial ($p < 0,05$) inducidos por Gal1, mientras que la inhibición de las vías de STAT3, JNKs, p38 y NF-B o el bloqueo de NRP1 o VEGF no exhiben efectos significativos ($p < 0,01$). Notablemente, el bloqueo de la exposición de N-glicanos en CE, inhibió los efectos biológicos de Gal1 pero no los de VEGF sobre la tubulogénesis ($p < 0,05$). En conclusión, Estos hallazgos identifican una vía no clásica de activación de KDR mediada por la interacción entre lectinas endógenas y glicanos y aportan nuevos horizontes en la búsqueda de mecanismos de resistencias a las terapias anti-angiogénicas convencionales.

- 453. 695) PAPEL DE LA TIROSINA FOSFATASA SHP2 EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÁNCER DE MAMA: IDENTIFICACIÓN DE SUS POSIBLES SUSTRATOS**
Cooke, M., Orlando, U., Maloberti, P., Poderoso, C., Podesta, E., Cornejo Maciel, F.
INBIOMED, UBA-CONICET. Dept. Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA

La acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4) regula la agresividad tumoral en cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*. Su expresión está regulada por la tirosina fosfatasa SHP2, enzima también relacionada con la tumorigénesis. En este trabajo se analizó la relación entre SHP2, ACSL4 y la proliferación en células de cáncer de mama y se abordó la identificación de los sustratos de SHP2. El tratamiento de células MDA-MB-231 con NSC87877, potente inhibidor de SHP2, disminuyó la expresión de ACSL4

(45%, $p < 0,01$) y la proliferación celular (70%, $p < 0,001$). Para estudiar los sustratos de SHP2 comprometidos en este efecto, se generaron líneas celulares estables de cáncer de mama MDA-MB-231 que sobreexpresan SHP2. Para ello se utilizaron partículas virales obtenidas en células 293T co-transfectadas con un plásmido conteniendo el ADNc de interés y plásmidos de expresión de las proteínas gag-pol-env para el empaquetamiento viral. Se utilizaron dos ADNc que codifican una forma nativa (WT) y una doble mutante D245A/C459S de SHP2. La mutación D245A aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato y la mutación C459S disminuye la actividad catalítica de la enzima, resultando en una forma que une al sustrato sin defosforilarlo denominada atrapadora de sustrato (ST). Ambos insertos, con una secuencia FLAG marcadora, se incluyeron en un plásmido pBABB, seleccionándose las células resistentes a higromicina antibiótico para el que el plásmido porta resistencia. Las células que sobreexpresan estas formas de SHP2 se utilizaron para analizar las proteínas que co-inmunoprecipitan con SHP2. El patrón de pTyr en los inmunoprecipitados de las muestras que expresan WT-SHP2 y ST-SHP2 fue diferente, identificándose cuatro bandas diferenciales en las muestras provenientes de células conteniendo ST-SHP2, señal que fue aumentada por el tratamiento con EGF. Estos resultados demuestran que SHP2 interviene en la regulación de ACSL4 y la proliferación celular y que existen sustratos específicos para SHP2 regulados por EGF.

- 454. (363) LA ACTIVACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A2 POR DOPAMINA INVOLUCRA LA GENERACIÓN DE ROS Y LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 EN CÉLULAS DE TÚBULO PROXIMAL RENAL**
Acquier, A.^{1,2}, Mori Sequeiros García, M.¹, Gorostizaga, A.¹, Marchione, V.², Gómez, N.¹, Paz, C.¹, Mendez, C.^{1,2}
Instituto de Investigaciones Biomédicas INBIOMED, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²

Reportamos previamente la participación de la proteína quinasa C (PKC) y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en la activación de la quinasa de señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y del factor nuclear kB (NF-kB) en la vía de transducción de señales de la dopamina (DA) en células de túbulo proximal renal. Dado que en diversos sistemas la actividad de la enzima fosfolipasa A₂ (FLA₂) es regulada por fosforilación por ERK1/2, nuestro objetivo fue investigar el rol de esta quinasa en la regulación de la actividad de FLA₂ por la DA. Se utilizaron células de la línea OK (*opossum kidney*) y se estudió la expresión de las isoformas de la familia IV de la FLA₂ por RT-PCR semicuantitativa, la localización subcelular de FLA₂ IV A por microscopía de fluorescencia, la actividad de la enzima por fluorimetría y la liberación de ácido araquidónico (AA) por cromatografía en capa delgada (TLC). El análisis por PCR demostró que las células OK expresan en forma mayoritaria la isoforma IV A de la FLA₂ en favor de la forma IV B, no registrándose expresión de la isoenzima IV C. DA (10⁻⁶M) promovió la activación de FLA₂ en forma dependiente del tiempo, con un máximo a los 15 min de estimulación (control: 2,58±0,04; DA: 3,46±0,10 U/mg, $p < 0,01$) y su translocación desde el citosol a las regiones nuclear y perinuclear. La preincubación de las células con los inhibidores de la activación de ERK1/2 (PD98059, 5x10⁻⁵M) o de PKC (Ro-318220, 10⁻⁸M), o con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC, 10⁻³M) abolió el efecto de DA sobre la FLA₂. DA promovió también la liberación de AA al medio de cultivo, un efecto que fue abolido en presencia del inhibidor de FLA₂, AACOCF₃ (control: 2400±170 vs DA: 5200±260, $p < 0,01$). Nuestros resultados demuestran la activación de FLA₂ por DA, por un mecanismo que involucra la generación de ROS y la participación de ERK1/2.

- 455. (522) REGULACIÓN DUAL DEL SISTEMA GLUCOCORTICOIDE POR LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR H1 A HISTAMINA. ROL DE LAS VÍAS CANÓNICAS Y NO-CANÓNICAS**
Zappia, C.¹, Granja-Galeano, G.¹, Fernández, N.¹, Fitzsimons, C.², Monczor, F.¹

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA¹ Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam. SciencePark 903, 1098 XH, Amsterdam²

Diversos reportes señalan la interacción entre la señalización de receptores acoplados a proteína G y del 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, acoplado a Gq), dado que existen numerosas situaciones en que ligandos de ambos sistemas son coadministrados, incluso en una misma formulación. Para ello se cotransfectaron células HEK293T con el rH1, el GR y un sistema reportero TAT3-LUC. En este sistema la histamina incrementa en un 300% la respuesta a dexametasona (Dex) 0,1nM, en forma dosis dependiente, sin afectar la pCE50 (11,6±0,2). Para investigar el rol de las subunidades Gβγ, se sobreexpresó Gα transducina como secuestrador de las mismas. En estas condiciones, la potenciación por parte de histamina fue revertida, transformándose en una inhibición. Los resultados sugieren un efecto dual de la histamina sobre la actividad del GR: potenciador mediado por las subunidades βγ, e inhibitorio en ausencia de ellas. Cotransfectando con diversas combinaciones de Gβ y Gγ identificamos las subunidades β2γ5 y β2γ11 como responsables del efecto potenciador. Por otra parte, mediante el uso de inhibidores farmacológicos y una mutante de Rac dominante negativa (RacN17), observamos que el efecto inhibitorio sería mediado por PLC y Rac, pero no PKC. Para evaluar la modulación sobre la expresión de genes endógenos regulados por Dex en un sistema nativo, transfectamos células A549 con el rH1. En este sistema histamina incrementó la expresión relativa del gen ThBD mediada por Dex (50%), y dicho incremento fue mayor en presencia de β2γ5 (100%). Estos resultados resultan consistentes con los obtenidos para el sistema reportero y echan luz sobre el mecanismo molecular de interacción entre ambos sistemas, lo cual resulta de suma relevancia dado que ligandos de los mismos se encuentran entre los más vendidos y utilizados en el mundo.

456. (594) LA REGULACIÓN CRUZADA DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA H1 Y H2 INVOLUCRA LA HETERODIMERIZACIÓN DE LOS MISMOS. IMPLICANCIAS FISIOLÓGICAS EN UN SISTEMA DE EXPRESIÓN ENDÓGENA

Alonso, M.¹, Fernández, N.², Notcovich, C.¹, Monczor, F.², Baldi, A.¹, Gutkind, S.³, Davio, C.², Shayo, C.¹
 IBYME¹ Cátedra de Química Medicinal. FFyB.UBA² Oral and Pharyngeal Cancer Branch. National Institutes of Health.³

Los receptores H1 y H2 a histamina (RH1 y RH2) son receptores acoplados a proteína G y se coexpresan en varios tejidos, regulando la producción de IPs y de AMPc respectivamente. Previamente hemos descrito que en células CHO cotransfectadas, el tratamiento con agonistas H1 o H2 conduce a la desensibilización cruzada y cointernalización de ambos receptores. El objetivo del presente trabajo es profundizar el estudio de los mecanismos de respuesta cruzada entre ambos receptores y determinar su relevancia fisiológica en células U937 que expresan endógenamente ambos receptores. Mediante microscopía confocal en células HEK293T cotransfectadas con el RH1-CFP y el RH2-YFP observamos que el estímulo con agonistas H1 o H2 provoca la colocalización de los receptores en vesículas endosomales y la heterodimerización de los mismos (señal de FRET). Por otro lado, en células U937, el estímulo con cualquiera de los dos agonistas (H1 o H2) provocó una disminución en la capacidad de respuesta de ambos receptores y la cointernalización de los mismos (ensayos de unión) indicando la existencia de mecanismos de regulación cruzada entre RH1 y RH2 en este sistema. Al evaluar la implicancia de la misma, observamos una inhibición de la proliferación de un 40% luego de 48 h de tratamiento con el agonista H1 así como el arresto en SubG0/G1, que fueron revertidos significativamente por el agonista H2 (p<0,05, n=3). A su vez, detectamos la inducción de apoptosis por el agonista H1, evidenciada por ensayos de AnexinaV-FITC/ioduro de propidio y

aumento en los niveles de PARP clivado (western blot), revertidos en presencia del agonista H2 (p<0,05, n=3). Este trabajo aporta nuevas evidencias sobre el mecanismo de regulación cruzada de los RH1 y RH2 y su papel fisiopatológico. Los nuevos conocimientos presentados contribuyen a la comprensión de la compleja red de señalización de la histamina contribuyendo a la utilización más racional de sus ligandos.

457. (255) FUSIÓN Y FISIÓN MITOCONDRIAL: EVENTOS CLAVE EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR MANGANESO EN LA ASTROGLIA

Alaimo, A., Gorjod, R., Miglietta, E., Kotler, M.
 Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso / Nano-Oncología. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQUIBICEN-CONICET

El Manganismo es un desorden neurológico originado por exposición crónica al manganeso (Mn) que presenta características clínicas y vías de señales similares a las del Parkinson Idiopático. El Mn se acumula preferentemente en los ganglios basales y en particular, en las mitocondrias de los astrocitos. Estas organelas son dinámicas y de morfología variable como resultado del equilibrio entre eventos de fusión y fisión. Dicho balance es esencial para las funciones mitocondriales y está regulado por un grupo de GTPasas, entre las cuales, las más estudiadas son Opa-1 y Drp-1. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar el rol de estas proteínas en la apoptosis inducida por MnCl₂ 750μM en células de astroglia de rata. Empleando Mitotracker Red y microscopía de fluorescencia se determinó que el Mn indujo fragmentación de las redes mitocondriales (p<0,001) y disipación del Δφm (p<0,001). Mediante WB e inmunocitoquímica, se demostró que el Mn indujo clivaje y/o disminución de la expresión de la proteína de fusión Opa-1 (p<0,05) además de su liberación al citosol y un incremento de la expresión de la proteína de fisión Drp-1 (p<0,001) sumado a su translocación a la mitocondria. El rol de ambas proteínas en la apoptosis se estudió empleando inhibidores de Drp-1 (CsA y Mdivi-1) y sobre-expresando los niveles de Opa-1. Los resultados indicaron que CsA, Mdivi-1, Opa-1 WT y Q297V (mutante de ganancia de función) previnieron la muerte celular inducida por Mn en un 25, 30, 20 y 25%, respectivamente (Ensayo de MTT; p<0,01). Así mismo, se cuantificó un 35, 30, 20 y 20% (p<0,001) más de células con redes mitocondriales intactas y con preservación del Δφm (p<0,001), además de una prevención del 40, 40, 35 y 30% (p<0,001) en la aparición de núcleos apoptóticos detectados con Hoechst 33258. Los resultados demuestran que un desbalance en la dinámica mitocondrial que lleva a una fisión aumentada, contribuye a la apoptosis inducida por Mn en células astrogliales.

458. (795) PEQUEÑOS ARNS TRANSCRIPTOS DEL SATÉLITE α SON REGULADOS POR LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Susperreguy, S., Píwien Pílipuk, G.
 Instituto de Biología y Medicina Experimental

El ADN satelital es una región de ADN repetitivo ubicado en la región centromérica y pericentromérica cuya transcripción es necesaria para el ensamblado de la heterocromatina centromérica y la regulación de proteínas asociadas al ciclo celular. Resultado previos de nuestro laboratorio demuestran cambios en la expresión de pequeños RNAs del satélite α (RNA-sat-α) durante la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1, y mioblastos C2C12. Además, el nivel de estos transcritos aumenta en 3T3-L1, C2C12, así como también en células Caco-2 durante su proliferación. Es por ello que el objetivo de nuestro trabajo es evaluar si existe una relación entre el nivel de los pequeños transcritos satelitales y la tasa de proliferación celular frente a gradientes de estímulos mitogénicos y determinar el mecanismo que lo regula con el fin de encontrar un nuevo blanco regulatorio del proceso de proliferación celular. Encontramos que el nivel de RNA-sat-α se mantiene elevado mientras fibroblastos 3T3-L1 o C2C12 proliferan, siendo la quiescencia por contacto una señal para abrupta caída de su expresión. El núcleo en interfase se encuentra altamente

organizado, siendo los cuerpos PML (*Promyelocytic Leukemia*), uno de sus numerosos compartimentos. La proteína PML forma parte de los cuerpos PML y una de sus funciones es la de inhibir el progreso del ciclo celular. Empleando RIP (*RNA Immunoprecipitation*), encontramos que RNA-sat- α se asocian a la proteína PML, dato que sugiere que RNA-sat- α formarían parte de los gránulos PML y/o podría estar regulando la función de la proteína PML. Ello nos condujo a generar clones de células 3T3-L1 que sobreexpresan RNA-sat- α para analizar la dinámica de los gránulos PML especialmente durante la proliferación. Conocer los mecanismos moleculares que controlan el balance entre los estados proliferativo y quiescente, es esencial para entender como una célula normal se puede convertir en tumoral y ayudaría en el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales.

GASTROENTEROLOGÍA, METABOLISMO Y NUTRICIÓN 3

459. (302) LA MODULACIÓN HORMONAL DE AMPc HEPÁTICO PREVIENE DE LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRADIOL 17 β -D-GLUCURÓNIDO (E) EN HÍGADO PERFUNDIDO DE RATA (HPR)

L.³; Luquita, M.⁴; Roma, M.⁵; Crocenzi, F.⁶; Sánchez Pozzi, E.⁷
*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR)*¹

La acción colestásica de E se basa en la internalización de transportadores como Mrp2 y Bsep desde la membrana canalicular. En duplas de hepatocitos demostramos que moduladores hormonales de AMPc, un mensajero que promueve inserción de transportadores en membrana, previene los efectos de E por diferentes mecanismos. Glucagón (G) activó un mecanismo PKA-dependiente y salbutamol (S) una vía de Epac-MEK-microtúbulo-dependiente. Estudiamos entonces los efectos de G y S en HPR, donde existe mayor complejidad anatómica y se pueden realizar estudios en función del tiempo. Métodos: En HPR, G (0,1 μ M) ó S (1 μ M) se administraron 10min antes de E (3 μ mol/hígado). Se midió flujo biliar (FB) y velocidad de excreción (VE) de taurocolato (TC, sustrato de Bsep) y de dinitro-fenil glutatión (DNP-G, sustrato de Mrp2) por 60min. Por microscopía confocal se evaluó la localización de Bsep y Mrp2. En ambos tratamientos se evaluó el rol de los microtúbulos por administración de colchicina (Col, 1 μ mol/kg, 60 min antes de E). Resultados: G y S previnieron la disminución de FB, VETC y VEDNP-G inducida por E. La prevención por S dependió completamente de microtúbulos mientras que la de G fue afectada solo tardíamente por Col. Bsep y Mrp2 fueron internalizados por E, colocalizando estos parcialmente Rab11a (marcador endosomal), efecto revertido totalmente por S y parcialmente por G ya que, algunos transportadores permanecieron colocalizando con Rab11a luego de su tratamiento. Conclusión: La modulación hormonal de AMPc, previenen de la colestasis en modelos con arquitectura hepática conservada, por mecanismos similares a los postulados en estudios *in vitro*. El estudio temporal reveló que si bien la acción de G no requiere microtúbulos, requeriría de transportadores cercanos a la membrana cuyos niveles se sostienen por tráfico microtúbulo-dependiente desde el interior celular.

460. (43) ¿LA PRESENCIA DE SÍNDROME METABÓLICO AGRAVA EL PERFIL LIPÍDICO E INFLAMATORIO EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA BAJO HEMODIÁLISIS?

Cacciagiù, L.¹; González, A.¹; López, G.¹; De'Marziani, G.²; Lucero, D.¹; Elbert, A.²; Schreier, L.¹
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas- Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial²

La incidencia de mortalidad cardiovascular en pacientes en hemodiálisis (HD) no disminuye con el tratamiento. La dislipemia y el estado pro-inflamatorio contribuyen al aumento de riesgo aterogénico. Estas situaciones podrían acentuarse en la insuli-

norresistencia (IR). Objetivo: evaluar marcadores inflamatorios y lipídicos en HD con y sin síndrome metabólico (SM) y controles. Noventa y ocho HD de ambos sexos se subdividieron según la ausencia de SM (ATPIII) (HDnoSM, n=48, edad=61 \pm 20 años) y presencia de SM (HDSM, n=50, edad=61 \pm 16) de los cuales 21 presentaron diabetes tipo 2. Se incluyeron 40 sujetos sanos como controles (C) (edad=32 \pm 11, p<0,001). Se extrajo sangre con 12h ayuno. El col-LDL, col-HDL, col-VLDL y remanentes lipoproteicos (RLP), triglicéridos (TG), ácidos grasos libres (AGL), glucosa, insulina, HOMA-IR, PCRus, interleukina 6 (IL6) y adiponectina (ADPN) fueron medidos en suero. Se aplicó ANOVA/Bonferroni ajustando por edad. Ambos HD mostraron mayor grado de IR con respecto a C, a su vez el incremento de HOMA-IR en HDSM fue mayor (p<0,001). TG y col-VLDL fueron más altos y HDL más bajo en HDSM con respecto a HDnoSM y C, p<0,02 y <0,001 respectivamente. RLP y AGL fueron mayores en ambos grupos HD, p<0,001 y <0,05 respectivamente. Col-LDL fue menor en ambos grupos HD (p<0,002). En ambos HD en comparación con C, la PCRus (HDnoSM=5,2 \pm 3,0; HDSM=6,2 \pm 3,8mg/L; C=1,2 \pm 1,0g/mL) e IL6 (HDnoSM=12,5 \pm 11,1; HDSM=14,2 \pm 10,3pg/mL; C=1,9 \pm 1,7pg/mL) estaban aumentados p=0,039. Paradójicamente, ADPN mostró una elevación notable en los dos grupos HD (HDnoSM=20,1 \pm 7,5ug/mL y HDSM=16,4 \pm 6,7 vs C=12,8 \pm 5,8, p<0,001), siendo también diferente entre HDnoSM y HDSM, p=0,003. A excepción de TG, col-VLDL y col-HDL, la presencia de SM en pacientes HD, no agravaría aún más las alteraciones lipídicas-lipoproteicas y el perfil inflamatorio propio de la enfermedad renal crónica.

461. (60) LA SOBRENUTRICION EN LA VIDA INTRAUTERINA SE ASOCIA CON DISMINUCION EN LA LONGITUD DE LOS TELOMEROS

Tellechea, M.; Fernández Gianotti, T.; Alvarias, J.; González, C.; Sookoian, S.; Pirola, C.
Instituto de investigaciones Médicas A Lanari - IDIM (UBA-CONICET)

El peso anormal al nacer esta asociado al riesgo de padecer síndrome metabólico (SM) en la adultez. Nosotros mostramos que el mecanismo podría ser una programación metabólica intrauterina por modificaciones epigenéticas. La longitud de los telómeros en leucocitos (LTL) es un factor reconocido en la patogenia de componentes del SM. Postulamos que modificaciones en LTL podrían representar una mecanismo asociado con el stress metabólico fetal y la LTL materna jugaría además un papel crítico en la modulación de la LTL del recién nacido (RN). Se estudiaron 69 RN, 45 con normo peso (NP), 12 bajo peso (BP): < percentilo 10 y 12 alto peso (AP): > percentilo 90, para la edad gestacional y sus madres. Se evaluó la LTL en leucocitos mediante PCR en tiempo real, normalizada a un gen de copia única, β globina y una muestra control única. La LTL correlacionó inversamente con el peso al nacer corregido por edad gestacional (R= -0.32, p=0.008) y subrogantes de crecimiento fetal como el perímetro cefálico (R=-0.26, p=0.032), siendo significativamente menor en los RN de AP (media \pm ES) (1.01 \pm 0.16) vs RN de BP (1.73 \pm 0.19) y NP (1.41 \pm 0.09). La LTL de la madre no se asocio con la LTL de los RN, sin embargo estuvo significativamente asociada con el antecedente de hipertensión en embarazos previos R= -0.27, p=0.04 y antecedentes familiares de hipercolesterolemia R= -0.29, p=0.01. La LTL de los RN se asoció significativa y negativamente con los antecedentes de hipertensión gravídica de la madre en embarazos previos (R=-0.3, p=0.04). Conclusiones: este es el primer trabajo que demuestra que un ambiente de sobrenutrición intrauterina y la hipertensión arterial materna impactarían en la LTL de los RN con potenciales implicancias en la vida adulta. Nuestros hallazgos sugieren que el AP podría condicionar un incremento en la susceptibilidad de padecer SM en adultez mediante una disminución en la LTL. Estudios de cohortes serían de vital importancia para confirmar estos hallazgos.

462. (380) INTERRELACIÓN ENTRE LA OSTEOCALCINA (BGP) Y EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN DOS CEPAS DE RATAS

Marotte, C.¹⁴; Bryk, G.¹; Weisstaub, A.²; Lucero, D.³; Schreier, L.³; De Portela, M.³; Zeni, S.¹⁴

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, INIGEM-CONICET-UBA¹ Cátedra de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA² Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA³ CONICET⁴

La BGP es una pequeña proteína con tres residuos de ácido glutámico secretada exclusivamente por el osteoblasto, que regularía el metabolismo energético a través de la señal del receptor de insulina en dicha célula. Se han estudiado comparativamente los niveles de BGP total en dos cepas de ratas: espontáneamente obesas (OB) y Wistar (W), alimentadas desde la preñez de sus madres hasta el final de la experiencia (50 días de vida) con una dieta isocalórica con un aporte normal (N) de calcio (Ca) (0.6mg%). En suero se determinaron: BGP, insulina y CrossLaps (CTX) por ELISA, glucosa por enzimología colorimétrica. El HOMA-IR fue calculado. Al final de la experiencia se evaluó la composición corporal según metodología AOAC. **Resultados:** (promedio \pm SD): OBN vs WN, respectivamente: grasa total: 39 \pm 10 vs 18 \pm 4g% (p<0.01); cenizas (g%): 2.6 \pm 0.2 vs 3.2 \pm 0.4; BGP (ng/ml): 375 \pm 46 vs 840 \pm 106 (p<0.01); glucosa (mg/dl): 152 \pm 69 vs 99 \pm 41; insulina (mg/dl): 4.1 \pm 1.6 vs 0.1 \pm 0.0; CTX (ng/ml): 83 \pm 8 vs 94 \pm 6 (p<0.01). Los animales OB presentaron menor contenido mineral, BGP, insulina y resorción ósea, pero mayores valores de glucosa y resistencia a la insulina. Conclusión: Tal como se observara en animales genéticamente modificados, la obesidad reduce los niveles de BGP circulantes, que al mismo tiempo debido a una menor resorción ósea presentaría una disminución en la BGP biológicamente activa. Esta reducción en la BGP induciría un aumento en los niveles de glucosa en ayunas y en la resistencia a la insulina, a pesar de que la secreción de insulina se encuentra aumentada por el mayor contenido corporal de grasa.

463. (95) PREBIÓTICOS Y SU RELACIÓN SOBRE LA ABSORCIÓN Y BIODISPONIBILIDAD DE Ca DURANTE EL CRECIMIENTO

Bryk, G.²³; Orzuza, R.²; Zeni Coronel, M.³; Marotte, C.²³; Somoza, J.³; Portela, M.⁴; Zeni, S.²³
INIGEM, Sección Osteopatías Médicas, H. de Clínicas, UBA, Cat. de Bioquímica General y Bucal, Fac. Odontología, UBA¹ Cátedra de Bioquímica Gral. y Bucal, Fac. Odontología, UBA² Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, Hospital de Clínicas, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo³ Cátedra de Nutrición, FFYB, UBA⁴

Estudios nacionales demuestran que la ingesta de calcio es inadecuada independientemente de la edad y nivel socioeconómico, disminuyendo el pico de masa ósea que se consigue en la pubertad, exponiendo a aumentar el riesgo de osteoporosis en la adultez. Los oligosacáridos no digeribles (OND) aumentarían la absorción y la biodisponibilidad de Ca, aunque aún es materia de debate. El objetivo fue evaluar el efecto del consumo de OND en dietas con bajo aporte de Ca sobre el desarrollo de flora colónica benéfica, la absorción de Ca y su relación con la salud ósea en ratas en crecimiento. Al destete ratas machos Wistar (40-47g) recibieron dietas isocalóricas AIN93-G con 0.5% Ca (A5), AIN93-G con 0.3% Ca (A3) y A3 con el agregado de OND (F3) hasta los 40 días. Semanalmente se calculó la ganancia de peso corporal (GPC), consumo alimenticio (CD), desarrollo de Lactobacilos (DL) (log CFU/g heces en agar MRS). Al sacrificio se midió pH cecal, peso de Tibia/PC, contenido y densidad mineral ósea (CMO, DMO) de esqueleto total (ET) (Lunar DXA). Resultados: (promedio \pm DE) A5, A3 y F3 respectivamente. GPC (g): 92 \pm 10, 82 \pm 9, 83 \pm 9; CD (g): 12.9 \pm 1.0, 10.6 \pm 0.5, 11.6 \pm 0.5; DL (UFC/g heces) -T.f: 9.1 \pm 0.7, 8.9 \pm 0.7, 11.6 \pm 0.5*; pH Cecal: 6.3 \pm 0.6, 6.4 \pm 0.7, 4.1 \pm 0.3*; PT/PC: 0.27 \pm 0.04, 0.24 \pm 0.02, 0.34 \pm 0.01*; CMO/Peso (mg/g): 2.4 \pm 0.3, 2.3 \pm 0.3, 4.1 \pm 0.5*; DMO (mg/cm²): 224.5 \pm 5.7, 221.8 \pm 5.0, 236.0 \pm 7.1*. *p<0.05 respecto a los grupos restantes. No hubo diferencias en PC ni en CD. F3 presentó inferior pH cecal vs controles, y superior en desarrollo de lactobacilos, peso de tibia, CMO y DMO del ET. Conclusión: La mezcla de OND utilizada aumentaría la absorción favoreciendo la biodisponibilidad de Ca y por ende optimizando la masa ósea.

464. (103) PROTEÍNA LIGADORA DE ELEMENTOS REGULADORES DE ESTEROLES 1C (SREBP-1C) Y SOBREPDUCCIÓN DE VLDL ALTERADAS EN UN MODELO DE INSULINO-RESISTENCIA

Lucero, D.¹; Miksztowicz, V.¹; Macri, V.²; Friedman, S.²; Zago, V.¹; Schreier, L.¹
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-INFIBIOC-UBA¹ Cátedra de Bioquímica Gral. y Bucal. Facultad de Odontología-UBA²

En un modelo de insulino-resistencia (IR) hemos demostrado aumento de secreción de VLDL anómalas, más grandes y sobre-enriquecidas en triglicéridos (TG), a pesar de un mayor depósito de grasa hepático. El pool intrahepático de ácidos grasos (AG) es determinante de la sobreproducción de TG y VLDL, y depende —en parte— de la acción de la proteína ligadora de elementos reguladores de esteroles 1c (SREBP-1c). Objetivo: Estudiar la relación del factor SREBP-1c con las alteraciones de la VLDL producida en un modelo de IR inducida por dieta. Se estudiaron ratas wistar macho, 180-200g, n=16, alimentadas con dieta estándar. Se dividieron en 2 grupos (n=8 c/u), a uno se le suministró 30% de sacarosa en el agua de bebida (DRS) por 12 semanas. A ambos grupos, en suero se les determinó parámetros metabólicos y se aisló y caracterizó VLDL (d=1,006 g/ml). En hígado se cuantificó grasa hepática y se determinó la expresión del factor SREBP-1c mediante Western-blot y densitometría. DRS presentó mayores niveles de TG, AG libres e insulina (p<0,05), sin diferencias en glucemia. También, menores niveles de col-HDL (p=0,02) y mayor contenido de grasa hepática (p=0,04). En DRS, VLDL presentó mayor masa (124 \pm 32 vs. 48 \pm 12 mg/dl; p=0,01) y mayor contenido de TG (68 \pm 4 vs. 57 \pm 7%; p=0,01). La expresión hepática de SREBP-1c fue mayor en DRS, mediana (rango): 1,4 (0,9-2,4) vs. 1,0 UA (0,6-1,2); p=0,045. Además, el nivel de expresión de SREBP-1c se asoció en forma directa con insulina (r=0,77; p=0,01), masa total de VLDL (r=0,67; p=0,01) y contenido de TG de VLDL (r=0,66; p=0,02), además de una tendencia a correlacionar con el contenido de proteínas de VLDL (r=0,56; p=0,06). No se observó asociación entre SREBP-1c y el tamaño de VLDL, ni tampoco con AG libres circulantes (p>0,301). En la IR, SREBP-1c regularía la secreción hepática de VLDL sobre-enriquecidas en TG, descritas con mayor potencialidad aterogénica

465. (154) EL ÁCIDO LIPOICO REDUCE LA INSULINORRESISTENCIA Y LA DISFUNCIÓN METABÓLICA HEPÁTICA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA (DRF) A TRAVÉS DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA

Castro, M.¹; Francini, F.¹; Schinella, G.²; González Arbelez, L.³; Gagliardino, J.¹; Massa, M.¹
CENEXA Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada¹ Cátedra de Farmacología Básica, Facultad de Ciencias Médicas UNLP² Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CONICET-Facultad de Ciencias Médicas UNLP³

La administración de DRF a ratas normales genera disfunción metabólica hepática e insulinoresistencia (IR) con aumento de estrés oxidativo (EO) e inflamación. Objetivo: Evaluar el efecto del antioxidante ácido lipoico (AL) sobre las mencionadas alteraciones. Metodología: se alimentaron ratas macho Wistar (180-200 g) con dieta comercial estándar y agua corriente sin (control [C]) y con fructosa al 10% (F) y C y F más AL (35 mg/kg peso corporal/día, i.p. durante los últimos 5 días de tratamiento) (CL y FL). Los animales se sacrificaron a los 21 días de tratamiento y se midió: glucemia (GOD-PAP), trigliceridemia (TG) (Kit comercial) e insulinemia (RIA). En hígado se determinó: GSH y proteínas carboniladas, expresión génica y proteica de SOD1, SOD2 y catalasa, expresión génica de GPAT, FAS y SREBP-1c, esteatosis hepática (Oil-Red), actividad de glucoquinasa, G-6-Pasa y G-6-PDH y expresión de marcadores de inflamación. La actividad antioxidante del hígado se determinó mediante el ensayo con catión ABTS. Resultados: El AL previno los cambios inducidos por DRF: mejoró la IR; disminuyó la TG y la esteatosis hepática vía disminución en la expresión de FAS y GPAT y de su modulador SREBP-1c (p<0.05). Corrigió el aumento

de la actividad de enzimas del metabolismo de carbohidratos ($p < 0.05$). Disminuyó el EO y aumentó la expresión de las enzimas antioxidantes ($p < 0.05$). La actividad antioxidante del hígado de animales tratados con AL fue mayor que los grupos control ($p < 0.05$). Finalmente redujo el incremento en la expresión proteica de COX2 y TNFalfa y en la expresión génica de IL-1B y TNFalfa inducidos por DRF ($p < 0.05$). Conclusión: La corrección de la IR y la disfunción metabólica inducidos por DRF a través del empleo de un agente antioxidante sugiere que el EO podría ser el desencadenante de tales alteraciones. Si bien se observó un efecto antiinflamatorio del AL queda por demostrar la relación causal con el EO y la secuencia temporal de aparición de tales alteraciones.

466. (236) CONSECUENCIAS DEL CONSUMO MATERNO DE DIETA RICA EN FRUCTOSA DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LA PROGENIE MACHO ADULTA

Alzamendi, A.; Castrogiovanni, D.; Spinedi, E.; Giovambattista, A.

Unidad de Neuroendocrinología. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular

Existen evidencias demostrando la importancia del estado nutricional materno y el aumento en el riesgo de alteraciones endocrino-metabólicas en su progenie adulta. Nuestro objetivo fue evaluar si cambios inducidos en el estado nutricional materno en ratas durante la gestación condicionan el desarrollo neuroendocrino-metabólico en su progenie macho. Ratas preñadas fueron divididas en dos grupos alimentados *ad libitum* con dieta sólida normal, mientras uno bebió agua (MC), el otro dieta rica en fructosa (DRF, fructosa 10% p/v en agua de bebida; MF) durante la gestación. Ambos grupos de madres se alimentaron *ad libitum* con dieta sólida normal y bebieron agua mientras lactaban. A partir del destete y hasta el día 60 de vida las crías C y F (provenientes de madres MC y MF, respectivamente) recibieron alimento sólido normal y agua *ad libitum* y, se les registró el peso corporal (PC) y el consumo de alimento. El día experimental (edad 60 días) se obtuvo sangre para determinar triglicéridos (TG), leptina (LEP) y PAI-1. Se disecó el tejido adiposo retroperitoneal [TARP; que se pesó y utilizó para determinar los niveles de ARNm de LEP (OB), análisis histológicos e incubados de adipocitos, evaluando la secreción de LEP], y el hipotalámico (HMB; determinándose los niveles de ARNm de ObRb). No encontramos diferencias en los PC, y entre los días 35-60 de vida las ratas F resultaron hipofágicas ($p < 0.05$ vs.C). El día 60 encontramos en animales F una disminución ($p < 0.05$ vs.C) de TG, TARP (masa) y ObRb en HMB; y un incremento ($p < 0.05$ vs.C) en los niveles séricos de LEP y PAI-1, y de OB en TARP. Los adipocitos F resultaron hipertróficos y liberaron más LEP ($p < 0.05$ vs.C). Los resultados indican que el consumo de DRF durante la gestación induce en la cría macho adulta alteraciones neuroendocrino-metabólicas y de la función del TA. La disminución de la masa de TA y su hipertrofia celular sería un indicativo de cambios en el desarrollo de ese tejido (PICT 2007-1051 y PIP 2009-0704).

ONCOLOGÍA 6

467. (62) EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LA TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL (EMT) Y DE LA PROTEÍNA DISADHERINA (DYS) EN CÁNCER DE OVARIO

Rosso, M.¹; Majem, B.²; Lapyckyj, L.¹; Llauradó, M.²; Matos, M.¹; Edelsztejn, N.¹; Besso, M.¹; Reventós, J.²; Vazquez-Levin, M.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET¹ Unidad de Investigación del Hospital de Vall d'Hebron, Barcelona, España²

El cáncer de ovario es la 4ta causa de muerte en mujeres. Sin embargo no hay marcadores moleculares para su detección/seguimiento. Cadherina epitelial (CadE) es una proteína clave en la adhesión celular. Una menor expresión de CadE se acompaña con eventos de la EMT: expresión de represores transcripcionales (Twist y Snail) y marcadores mesenquimales (vimentina y cad-

herina neural, CadN). Más recientemente, la falta de CadE se ha vinculado a la expresión de Dys, glicoproteína sobreexpresada en algunos tumores y asociada a metástasis. En los cánceres avanzados de ovario la disminución de CadE se ha relacionado con la propagación metastásica. Si bien hay antecedentes de EMT en este cáncer, los datos no son concluyentes y la expresión de Dys no se conoce. Objetivo: Evaluar marcadores de EMT y Dys en 4 líneas celulares de cáncer de ovario y en biopsias de ovario No Tumoral (NT) y Tumoral (T) y Metástasis (M). Métodos: Se evaluó la expresión de cadE, marcadores de EMT y Dys en las líneas TOV-112D (tumor primario), SKOV-3, OAW-42 y OV-90 (de ascites). ARNm: PCR-tiempo real, proteína: WIB/inmunocitoquímica. Se evaluó la expresión de Dys en las biopsias. Resultados: Los estudios revelaron 1) Niveles variables de cadE (máxima expresión en OAW-42 y mínima en TOV-112D) 2) Correlación inversa entre niveles de ARNm de CadE y Twist, CadE y CadN, y CadE y Vimentina 3) Niveles similares de expresión de β -catenina y Snail en las 4 líneas 4) Niveles variables de Dys en las 4 líneas 5) Menores niveles de Dys en muestras T respecto de las NT y mayores en las M, comparables a las NT. Conclusión: a) Del estudio de marcadores de EMT se identificó una línea celular con perfil molecular epitelioide (OV-90), una mesenquimal (TOV-112D) y 2 con perfil mixto b) Por 1ra vez se describe la presencia de Dys en las líneas estudiadas, con diferentes niveles de expresión en las de perfil mixto c) Se describe la expresión de Dys en biopsias de cáncer de ovario, con mayor expresión en tejidos NT y M que en el T.

468. (317) EL SISTEMA NOTCH POSEE UN ROL DE SUPERVIVENCIA, ALTERANDO LA PROLIFERACIÓN Y PARÁMETROS APOPTÓTICOS DE UNA LÍNEA OVÁRICA TUMORAL DE GRANULOSA HUMANA

Pazos, C.¹; Abramovich, D.¹; De Zúñiga, I.²; Parborell, F.¹; Tesone, M.¹; Iruستا, G.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Centro Médico PREGNA, Buenos Aires, Argentina.²

El cáncer de ovario es uno de los tipos de tumores sólidos cuya respuesta a los tratamientos es generalmente temporal. En la mayoría de los casos es recurrente y entre las enfermedades ginecológicas es una de las que posee una mayor relación fatalidad/caso. El sistema de señalización Notch comprende un camino intracelular que regula el crecimiento y la homeostasis de células embrionarias. Además, se ha demostrado que se encuentra involucrado en la supervivencia de células tumorales de diversos orígenes. El objetivo del presente trabajo es estudiar la expresión de miembros del sistema Notch en células de granulosa normales humanas (CGN) y en una línea ovárica tumoral humana (KGN). Conjuntamente, investigamos el efecto de la inhibición de la vía de Notch sobre la proliferación, esteroidogénesis, y expresión de proteínas pro y antiapoptóticas en células KGN. Este protocolo ha sido aprobado por el comité de ética del IBYME. Se observó una expresión diferencial del ligando JAGGED1, y de los receptores NOTCH1 y NOTCH4 entre CGN y KGN. Además, se detectó una disminución significativa de la proliferación de células KGN en presencia del inhibidor de la vía de Notch (DAPT) de forma dosis-dependiente ($p < 0.01$). La inhibición del sistema Notch disminuyó la síntesis de progesterona ($p < 0.05$) y estradiol ($p < 0.0001$), y aumentó significativamente las relaciones proapoptóticas BAX/BCL2 y BCLXs/BCLXI. Asimismo, la incubación con DAPT aumentó el clivaje de las proteínas PARP y caspasa 8 ($p < 0.05$). Por el contrario no se detectaron cambios en el ligando FAS y su receptor FASL. Estos resultados muestran una expresión diferencial de miembros de este sistema entre células normales y células tumorales y además, demuestran que el sistema Notch posee un rol de supervivencia en la línea ovárica tumoral humana (KGN). En resumen, esta vía se encuentra involucrada a la proliferación, esteroidogénesis y parámetros apoptóticos en este tipo celular.

469. (104) LA ACCIÓN ESTIMULATORIA DEL FGF2 SOBRE CARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES INVOLUCRA TANTO LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA, COMO LA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

Giulianelli, S.; Gorostiaga, M.; Guillardoy, T.; Lanari, C.
Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

El tumor mamario murino progestágeno-independiente C4-HI, expresa mayores niveles del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), en comparación a la variante progestágeno-dependiente C4-HD. Este último es capaz de crecer *in vivo* en presencia del FGF2. Hemos demostrado que dicho factor activa al receptor de progesterona (RP) de forma ligando independiente y así estimula el crecimiento tumoral. Por otra parte, demostramos que es necesaria una asociación entre el receptor de estrógenos alfa (RE α) y el RP para activar la proliferación celular por acetato de medroxiprogesterona (MPA). Postulamos que el RE α también está involucrado en el crecimiento tumoral mediado por FGF2. Observamos altos niveles de expresión y fosforilación del RE α en tumores C4-HD creciendo *in vivo* en presencia de FGF2, en comparación al tumor sin MPA. El tratamiento con un inhibidor del receptor de FGF2 (FGFR2; PD173074), redujo significativamente la expresión y fosforilación del RE α ($p < 0.001$) en tumores C4-HI. El FGF2 (50ng/ml) estimuló la proliferación celular de cultivos primarios de ambos tumores ($p < 0.001$), y de líneas celulares humanas T47D y MCF7 ($p < 0.001$), siendo el antiestrógeno puro ICI182.780 (ICI), capaz de inhibir dicha estimulación. En ensayos con genes reporteros bajo el control transcripcional de secuencias respondedoras al RE α (ERE-Luc), observamos que el FGF2 indujo la activación del receptor, en ausencia de ligando, en células T47D ($p < 0.001$). El bloqueo del RE α con ICI, o del FGFR2 con PD, inhibió la activación del RE α mediada por FGF2 ($p < 0.001$). Los resultados muestran que el RE α es activado por FGF2, y mediaría al menos en parte, su actividad sobre células tumorales de mama, sugiriendo que pacientes seleccionados con cáncer de mama podrían tener una mejor respuesta a la terapia combinada con antiestrógenos e inhibidores de la señalización por FGF2.

470. (548) HO-1 ATENÚA LA RESPUESTA A ANDRÓGENOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA INTERFERIENDO CON LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE STAT3

Elguero, M.; Gueron, G.; Giudice, J.; Toscani, A.; De Luca, P.; Paez, A.; Colluccio-Leskow, F.; De Siervi, A.; Vazquez, E.
Depto de Química Biológica, FCEN, UBA - IQUIBICEN CONICET

El cáncer de próstata (PCa) es una de las malignidades más frecuentes entre los hombres y la respuesta a andrógenos es crítica durante la progresión tumoral. Varios mecanismos se han identificado en la activación del receptor de andrógenos (AR), entre ellos la vía de STAT3. Previamente demostramos que Hemo oxigenasa-1 (HO-1), una proteína citoprotectora y antiinflamatoria, regula la activación de AR. El objetivo de este trabajo fue estudiar el mecanismo por el cual la interacción entre HO-1 y STAT3 afecta la señalización de AR. Las células LNCaP fueron sometidas a los siguientes tratamientos: inducción de HO-1 con hemina (80 μ M, 24h), activación de AR con testosterona (10 μ M, 24h) y estimulación de STAT3 con IL6 (10ng/ml, 24h). Los controles fueron cultivados en presencia de los respectivos vehículos. Por análisis de WB comprobamos una disminución significativa de los niveles de pSTAT3 y su retención citoplasmática por fraccionamiento subcelular en presencia de hemina. En estas condiciones mediante RT-qPCR también detectamos la represión de la actividad de STAT3 por disminución de la expresión de blancos de esta vía (ciclina D1, Bcl XL y survivina). Estos resultados fueron confirmados por silenciamiento específico de STAT3 con shRNA. Mediante microscopía confocal se observó que al inducir HO-1 la proteína STAT3 disminuye su localización nuclear estimulada por IL6 y también la interacción con AR después del tratamiento con testosterona. Por inmunoprecipitación de STAT3 confirmamos la disminución de la interacción con AR cuando las células fueron tratadas con hemina e IL6 en presencia o no de testosterona. Estos resultados demuestran que HO-1 regula la señalización de AR modificando su interacción con STAT3, induciendo su retención citoplasmática.

471. (368) LA DELECCIÓN DE KLF4 IN VIVO PRODUCE AUMENTO DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA MUCOSA

BUCAL Y LUEGO DE LA ACTIVACIÓN DE K-RAS TRANSFORMACIÓN MALIGNA DE LA LENGUA

Abrigo, M.¹; Alvarez, R.¹; Paparella, M.²; Bal De Kier Joffé E, E.¹; Gutkind, J.³; Raimondi, A.¹
Instituto Angel H. Roffo¹ Cátedra de Anatomía Patológica, FOUBA. Bs. As. Argentina² NIDCR, National Institute of Health, USA³

El cáncer de cabeza y cuello, incluyendo el cáncer bucal es el sexto cáncer más frecuente a nivel mundial y su tasa de supervivencia luego del diagnóstico es menor al 50%, lo cual refleja la necesidad de generar nuevo conocimiento sobre su carcinogénesis. El factor de transcripción Klf4 participa en el control de la proliferación y diferenciación celular, expresándose en tejidos epiteliales y habiendo sido reportada su ausencia en distintas neoplasias. Nuestro objetivo fue estudiar el rol de Klf4 en el mantenimiento de la homeostasia del epitelio bucal normal y su contribución a la carcinogénesis bucal luego de la activación de K-Ras. Se utilizó un modelo transgénico (K14-CreER^{TAM}/K-ras^{G12D}) específico para cáncer bucal, trabajando con las líneas murinas: K14-CreER^{TAM}, K-ras^{G12D} y Klf4^{fllox-fllox}. Los ratones fueron genotipados por PCR y a los 30 días de edad se realizó la inducción del sistema con tamoxifeno. Los animales K14-CreER^{TAM}/Klf4^{-/-} (KO-Klf4) no desarrollaron fenotipo evidente luego de 2 y 3 meses de tratamiento. Las lenguas KO-Klf4 revelaron cuadros de acantosis a los dos meses y displasias desde leves a moderadas entre los 4 y 6 meses después del tratamiento. Luego de 9 meses de evolución las lenguas KO no presentaron diferencias respecto de los casos de 6 meses. El índice proliferativo evaluado a través de PCNA (células positivas/células totales) reveló que las lenguas KO-Klf4 difirieron significativamente del resto (K-ras^{G12D}: 0,57 \pm 0,03, Klf4^{-/-} 0,69 \pm 0,008, *wild type*: 0,54 \pm 0,01) $p < 0,001$. Previamente hemos reportado que los ratones K14-CreER^{TAM}/K-ras^{G12D} desarrollan papilomas bucales e hiperplasias de lengua y al generar animales triples transgénicos (K14-CreER^{TAM}/K-ras^{G12D}/Klf4^{-/-}) desarrollaban CIS y carcinomas. Ahora estudiamos por western blot e inmunohistoquímica la expresión de diversos reguladores del ciclo celular, encontrando expresión de ciclina D1, KLF5, aumento de p63 y ausencia de p21 en los carcinomas y papilomas estudiados. El aumento de proliferación descrito en las lenguas KO se suma a la activación de K-Ras en el fenotipo bucal observado en los ratones triples transgénicos. La ablación de Klf4 cooperaría en la transformación, cumpliendo un rol como gen supresor de tumor al afectar la función de p21 y ciclina D1 en el modelo de cáncer bucal estudiado.

472. (209) CAMBIOS MORFOLÓGICOS ASOCIADOS A LA SOBREEXPRESIÓN DE LA METALOTIONEÍNA 1G (MT1G) EN LAS CÉLULAS TUMORALES COLORRECTALES

Arriaga, J.^{1,2}; Bravo, A.³; Baffa Trasci, S.¹; Rocca, Y.²; Roberti, M.¹; Barrio, M.¹; Levy, E.¹; Mordoh, J.²; Bianchini, M.¹
Fundación Instituto Leloir-IBBA-CONICET¹ Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA)² Hospital Interzonal General de Agudos (HIGA) Eva Perón³

Las metalotioneínas (MTs) son una familia de proteínas que poseen capacidad de transferir zinc hacia otras proteínas, regulando así su función. El zinc es requerido por muchas proteínas, incluyendo varios factores de transcripción importantes para el crecimiento tumoral. Trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que las MTs se pierden progresivamente a lo largo de la progresión neoplásica, especialmente la isoforma MT1G, y que dicha pérdida está asociada a un peor pronóstico. Con el objetivo de estudiar los efectos de la re-expresión de esta proteína en cáncer colorrectal (CCR), a partir de líneas celulares de CCR generamos clones que expresan establemente altos niveles de MT1G (MT1G⁺). Estos tumores fueron crecidos en ratones *nude*, con el objetivo de evaluar su velocidad de crecimiento y morfológica. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento midiendo tanto el volumen tumoral en el tiempo, como el porcentaje de células que expresan el marcador de proliferación Ki-67. Su capacidad proliferativa tampoco resultó diferente en ensayos *in vitro* utilizando la técnica del MTT. Sin embargo, los

tumores MT1G⁺ poseen una morfología alterada, que indicaría un mayor grado de diferenciación. Para corroborar esto, realizamos tinción de los cortes histológicos con Alcian Blue, método que permite la coloración de mucinas ácidas producidas por las células goblet, evidenciando un claro aumento tanto del número de vacuolas de mucina, como de su tamaño ($p < 0,001$). Finalmente, determinamos por inmunohistoquímica que varios marcadores de diferenciación (CDX2, KRT18 y KRT20) se encuentran aumentados en los tumores MT1G⁺ ($p < 0,01$). Estos resultados sugieren que la MT1G podría contribuir a generar tumores más diferenciados y menos agresivos, quizás a través de la modulación de factores de transcripción involucrados en la diferenciación colorrectal, como CDX2. Estudios ulteriores serán necesarios para identificar los blancos moleculares de dicho efecto.

473. (411) LA ANHIDRASA CARBÓNICA IX (CAIX) COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES DE CÉLULAS CLARAS (CCRCC)

Knott, M.¹; Núñez, M.²; Gandur Quiroga, M.¹; Boggio, G.²; Grasselli, J.²; Gueglio, G.²; Rondot Radío, P.¹; Brzezinski, M.¹; Pasik, L.¹; Alvarez, A.¹; Malagrino, H.¹; García Marchiñena, P.²; Bal De Kier Joffé, E.¹; Pallotta, M.²; Puricelli, L.¹ *Instituto de Oncología Ángel H. Roffo¹ Hospital Italiano de Buenos Aires- Buenos Aires- Argentina² Facultad de Farmacia y Bioquímica- Buenos Aires- Argentina³*

El CCRcc es el tipo histológico más frecuente de carcinoma renal y comprende un grupo heterogéneo de cánceres con evolución clínica variable. A nivel molecular, se demostró inactivación del supresor VHL, involucrado en la expresión de la proteína transmembrana CAIX, cuya función es mantener el pH intra y extracelular. CAIX se encuentra sobreexpresada en tumores CCRcc, pero su expresión a nivel sérico es poco conocida. Ya que las moléculas circulantes pueden reflejar la biología tumoral, nuestro objetivo fue estudiar la expresión de CAIX, mediante ELISA, en el suero de pacientes con CCRcc vírgenes de tratamiento y en el de controles sanos. Las muestras se obtuvieron al momento del diagnóstico (M1) y después de la cirugía (M2) (n=30, 10 EI, 4 EII, 6 EIII y 10 EIV). Se realizaron tests no paramétricos y se calcularon la especificidad (Es) y la sensibilidad (S) del marcador. Los pacientes CCRcc presentaron valores elevados de CAIX circulante (Md 75,89 pg/ml, rango 30,8-1482,9) respecto a los observados en controles (23,29 pg/ml; 0,0-79,9) (MW test: $p < 0,001$). Considerando como valor de corte el percentilo 85 de la población control (34,82 pg/ml), la Es de CAIX para la portación de CCRcc fue de 93,8% y la S 73,3%. Además, se encontró que los pacientes EI mostraron valores de CAIX sérica menores respecto de los pacientes con estadios más avanzados [EI=45,25 (30,8-107,9) vs EIV=102,93 (36,2-1482,9) (pg/ml), MW $p < 0,001$]. En 20/30 (66,67%) de los pacientes se observó que los valores de CAIX descendieron significativamente en la M2, mientras que en 4 no se modificaron y en 6 aumentaron. La cuantificación de CAIX sérica podría ser un potencial marcador para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con CCRcc. Estos valores incrementan en pacientes con CCRcc, son más elevados en los E avanzados y descienden en el 67% de los pacientes después de la cirugía. Estos datos son de relevancia, ya que para el CCRcc no se cuenta con marcadores moleculares de utilidad clínica.

474. (752) TERAPIAS COMBINADAS CON INHIBIDORES DE LA VÍA PI3K/AKT Y ANTIPROGESTÁGENOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE MAMA

Polo, M.; Riggio, M.; Lanari, C.; Novaro, V. *Instituto de Biología y Medicina Experimental*

Cerca de 40% de los tumores mamaros que expresan receptores de estrógenos (ER) y progesterona (PR) presentan alguna alteración en la vía PI3K/AKT, por lo que terapias que combinen inhibidores de dicha vía junto con antagonistas hormonales podrían resultar prometedoras para el tratamiento del cáncer de mama. El objetivo de este trabajo fue analizar fenómenos de regresión tumoral asociados al tratamiento con el antiprogestá-

geno Mifepristona (MIF) y el inhibidor de PI3K Wortmanin (WTM) en las variantes tumorales C4-HI y C4-2-HI, pertenecientes al modelo de carcinomas mamaros murinos inducidos con acetato de medroxiprogesterona. Los tumores C4-HI son sensibles al tratamiento endócrino y presentan altos niveles de la vía PI3K/AKT. Luego de 2 días de tratamiento con MIF o WTM (12 y 1 mg/kg/día respectivamente) el crecimiento de los tumores se inhibió ($p < 0,01$). A nivel histológico, ambas drogas provocaron una disminución en el índice mitótico y un aumento en el área estromal ($p < 0,01$); sólo WTM indujo un aumento en el índice apoptótico y en el área necrótica tumoral ($p < 0,001$). Cuando las drogas se aplicaron en conjunto, los parámetros anteriores resultaron potenciados y a nivel macroscópico los tumores regresaron, es decir, disminuyeron su tamaño (pendiente negativa, $p < 0,01$). Asimismo se evaluó el efecto de inhibir la vía PI3K en tumores que no responden al tratamiento endócrino. La administración de WTM a tumores C4-2-HI fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral ($p < 0,001$) pero no afectó la sensibilidad a MIF por lo que el tratamiento combinado no produjo mejores resultados. En conclusión, la inhibición de la vía PI3K resulta efectiva en impedir el crecimiento tumoral en dos variantes tumorales que difieren en su sensibilidad hormonal. En la variante que responde a antiprogestágenos es capaz de potenciar la regresión tumoral, por lo que podría resultar una estrategia adicional para el tratamiento de tumores mamaros.

CARDIOLOGÍA 3

475. (269) EFECTO DE ALENDRONATO (ALN) Y ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) EN LOS PROCESOS CELULARES QUE AFECTAN LA SALUD VASCULAR

Cutini, P.¹; Rauschemberger, M.¹; Campelo, A.¹; Sandoval, M.¹²; Massheimer, V.¹ *Cát. de Bioquímica Clínica II, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, Bahía Blanca. CONICET¹ Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Bahía Blanca²*

El ALN es un agente recuperador de masa ósea utilizado en el tratamiento de la osteoporosis, patología prevalente en la menopausia. El reemplazo hormonal con estrógenos combinado con progestágenos sintéticos (MPA) se ha propuesto como alternativa terapéutica para contrarrestar las disfunciones postmenopáusicas. La biodisponibilidad de óxido nítrico, la adhesión de monocitos y plaquetas al endotelio (CE) y la migración de células de músculo liso vascular (CLMV) son eventos que afectan la salud vascular. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto directo de ALN y MPA sobre el tejido vascular. Se emplearon cultivos de CE y CMLV obtenidos por explante de aorta de ratas Wistar hembras. Ensayos de migración celular mostraron que, 48 hs de tratamiento con diferentes concentraciones de ALN no alteró la movilidad de CMLV, en tanto que MPA indujo un marcado aumento de la migración a todas las dosis ensayadas (337-313% s/c; MPA 1-100 nM; $p < 0,001$). Se evaluó la adhesión de monocitos y plaquetas a CE, en presencia ó no de un estímulo inflamatorio (LPS). LPS estimuló la adhesión de monocitos ó de plaquetas al endotelio (66; 61% s/c resp. $p < 0,01$). El ALN no alteró la adhesión basal de monocitos pero revirtió parcialmente el efecto de LPS (35% s/c, $p < 0,01$). MPA incrementó la adhesión plaquetaria basal (44% s/c; MPA 10 nM; $p < 0,05$) y además potenció significativamente el efecto inducido por LPS ($p < 0,05$). Sobre la biodisponibilidad de NO, 15 min. de tratamiento con ALN (1-50µM) estimuló la producción de NO en CE (49-104% s/c $p < 0,01$). En cambio, MPA inhibió marcadamente la producción del vasoactivo (32.3±3.3 vs 19.4±2.1 nmol NO/mg prot; control vs MPA 10 nM; $p < 0,02$). La adición conjunta de ambos fármacos potenció la producción de NO (246% s/c, $p < 0,05$). Demostramos que ALN y MPA ejercen acciones contrapuestas sobre la homeostasis vascular, favorables ó potencialmente de riesgo respectivamente.

476. (293) EL PROCESO DE BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL NO RESTABLECE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN CORAZÓN DE RATA EN UN MODELO DE ENDOTOXEMIA

Vanasco, V.¹; Saez, T.²; Cimolai, M.¹; Evelson, P.¹; Boveris, A.¹; Alvarez, S.¹

IBIMOL-UBA-CONICET¹ IBCN -UBA-CONICET²

La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que podría participar en procesos de recuperación tisular durante la sepsis, permitiendo reestablecer la función mitocondrial, evitando la iniciación de mecanismos apoptóticos y/o necróticos desencadenados por el desequilibrio energético y disfunción orgánica. El objetivo de este trabajo fue estudiar la ocurrencia de biogénesis mitocondrial y su relación con la función mitocondrial desencadenado durante la endotoxemia. Ratas Sprague-Dawley hembras de 45 días fueron inyectadas con LPS (10 mg/kg, ip), y las determinaciones se realizaron a distintos tiempos del tratamiento. La endotoxemia indujo el proceso de biogénesis determinado por el aumento significativo de a) la expresión de PGC-1 α a partir de las 6 h del tratamiento, b) la relación entre la actividad del complejo IV mitocondrial presente en fracción homogeneizado y mitocondrial, incrementada un 30 % a las 24 h; c) y a través de la microscopía de transmisión (MET) la cual mostró morfologías mitocondriales asociadas a fusión y fisión. El consumo de O₂ mitocondrial se encontró disminuido (20-25%; control: 226,1 \pm 15 ng-at O/min.mg prot.) en todos los animales tratados con LPS sin mostrar mejoría hasta las 24h, así como el complejo I mitocondrial. Finalmente se analizó por MET la evolución del daño mitocondrial relacionado con el estrés oxidativo. A partir de estos resultados se puede inferir que el proceso de biogénesis mitocondrial sería uno de los mecanismos involucrados durante este síndrome, el cual no es suficiente para reestablecer la función mitocondrial hasta las 24 h. Tratamientos con antioxidantes podrían disminuir el daño ocurrido por estrés oxidativo, mejorando la recuperación mitocondrial durante este síndrome.

477. (395) LA REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DECORINA MEDIADA POR LPS PROMUEVE EL COMPORTAMIENTO ANGIOGÉNICO

González, A.¹; Camisay, M.²; Oberkersch, R.¹; Egitto, P.¹; Wainstok, R.²; Gazzaniga, S.²; Calabrese, G.¹

Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.¹ Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA²

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) estimula la angiogénesis e inflamación vascular a través de la vía de señalización asociada al receptor TLR-4. La remodelación de la matriz extracelular vascular que resulta de esta activación ha sido poco descripta. Nuestro objetivo fue estudiar las etapas tempranas de la angiogénesis en presencia de LPS y su asociación con el patrón de expresión del proteoglicano decorina (DCN). Células de endotelio murino (H5V), arrestadas durante 4 hs, fueron cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de LPS (1-5 μ g/ml) por 12 hs. La producción y secreción de DCN fue estudiada por Western-blot en la fracción microsomal y en el medio de cultivo. La distribución celular de NF κ B y STAT3 fue analizada por inmunofluorescencia. La actividad de metaloproteasas de matriz (MMP) se evaluó por zimografía y la migración endotelial mediante el ensayo de *scratch*. Los estudios revelaron una disminución significativa de DCN a partir de 2,5 μ g/ml de LPS ($p < 0,05$) junto a una movilización de factores transcripcionales (salida de STAT3 y aumento de NF κ B en el núcleo). Se detectó actividad de MMP-2 y -9, registrándose un incremento significativo de la MMP-2 en presencia de 2,5 μ g/ml de LPS versus el control (7,03 \pm 0,93 vs 3,15 \pm 0,28 DO/ μ g proteína; $p < 0,001$). La adhesión sobre colágeno I de las células tratadas registró una disminución con respecto al control (100%, 0 μ g/ml; 77%, 1,5 μ g/ml y 64%, 5 μ g/ml; $p < 0,001$). Paralelamente, se observó un aumento progresivo de la migración con un máximo a 5 μ g/ml ($p < 0,0001$). Los resultados sugieren que el LPS induciría: (a) la salida del núcleo de STAT3, modulador de la expresión de DCN, y la consecuente disminución en la expresión del proteoglicano; (b) un aumento en la actividad de MMP-2 y (c) una disminución de la adhesión a la matriz acompañado de un incremento en la migración endotelial. En suma, estos eventos contribuyen al remodelado de la matriz y adquieren relevancia en el proceso de angiogénesis.

478. (541) PARTICIPACIÓN DE LA TRH EN LA CARDIOTOXICIDAD INDUCIDA POR DOXORRUBICINA (D)

Peres Díaz, L.¹; Landa, M.¹; Toblli, J.²; Gonzales Mansilla, N.¹; Pirola, C.¹; García, S.¹

Lab. Cardiología Molecular, Inst. Inv. Med. A Lanari, UBA; IDIM-CONICET¹ Lab. Medicina Experimental, Hospital Alemán, Bs As²

El sistema de TRH está hiperactivado en el ventrículo izquierdo (VI) hipertrofiado de SHR. Su bloqueo previene la hipertrofia (HVI) a pesar de la hipertensión. En la HVI participan diferentes procesos como la fibrosis y la apoptosis. Como demostramos que la TRH es inducida por D en células cardíacas, estudiamos la participación de la TRH en la cardiotoxicidad inducida por D en ratones C57 inhibiendo la TRH mediante siRNA intracardiaco previo al estímulo con D. Se dividieron 75 ratones macho C57 en 6 grupos de $n=10$. Al día 1 se les inyectó en corazón bajo anestesia 50 μ l de siRNA-TRH o siRNA-Con (5 μ g/ μ l) a 4 de los grupos. En el día 2, todos los grupos fueron inyectados ip. con D (200 μ l, 10 mg/kg ip. o solución salina, SF). Así se obtuvieron 6 grupos de animales: D; SF; D+siRNA-TRH; D+siRNA-Con; SF+si-TRH y SF+siRNA-Con. Los animales se sacrificaron a los 2, 4 y 7 días post inyección de D. El peso corporal presentó una tendencia a ser menor en los grupos con D que no llega a ser significativa. En el E1 cuantificamos la expresión génica (PCR tiempo real) del precursor de TRH (pTRH) y de diferentes marcadores de daño BNP y BMHC (hipertrofia), colágeno III (fibrosis), Bax/Bcl2 y caspasa 3 (apoptosis). Observamos un aumento (ANOVA y Tukey t) de la expresión del pTRH en los grupos con D a los 2 y 4 días que fue más marcado a los 7 días (2d: 145%, 4d: 190% y 7d: 250%) confirmado por inmunohistoquímica. Este aumento no se observó en el grupo D+siRNA-TRH demostrando la eficiencia del bloqueo siRNA-TRH. El bloqueo de TRH a los 7 días de D atenuó (respecto a SF, $p < 0,05$), el aumento del índice Bax/Bcl2 y la expresión de caspasa 3 (Bax/Bcl2 D+siRNA-TRH: 120% vs D+siRNA-Con: 214%; Caspasa 3 D+siRNA-TRH: 95% vs D+siRNA-Con: 193%). El mismo efecto del siRNA-TRH se observó en la expresión de bMHC (bMHC D+siRNA-TRH: 111% vs D+siRNA-Con: 305%). Nuestros resultados demuestran la participación de la TRH cardíaca en la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina.

479. (565) AUMENTO DE PROGENITORES ENDOTELIALES ASOCIADO A LA ATEROGENÉISIS: CUANDO LOS BUENOS SE VUELVEN MALOS

Castro, C.; Cerioni, S.; López, M.; Cannizzo, B.; Redondo, A.; Cruzado, M.

IMBECU-CONICET CCTMendoza, Facultad de Ciencias Médicas UNCuyo

La movilización endógena o la inyección ex-vivo de células progenitoras endoteliales (EPC) se asocia con una reendotelialización, una mejora de la función endotelial y una disminución de la placa aterosclerótica. En contraste, las EPC pueden promover la angiogénesis de la placa de ateroma e influir en el desarrollo e inestabilidad de la misma. Nos propusimos identificar EPC y cuantificar factores angiogénicos en la pared vascular durante el desarrollo de las placas de ateroma en un modelo experimental de aterosclerosis. Ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE-KO) fueron alimentados con dieta aterogénica (D-ATG: 15,8% de materia grasa, 1,25% de colesterol), o Dieta Control (CD) durante un mes. Luego del sacrificio se obtuvieron aortas y carótidas para evaluar la presencia de EPC por medio de Inmunofluorescencia y citometría de flujo con anticuerpos específicos anti-Sca-1 y anti-FLK-1, y la expresión de factores angiogénicos, por medio de RT-PCR a tiempo real. En ratones ApoE-KO la D-ATG aumentó significativamente las células SCA-1+/FLK+ en la adventicia arterial. Además se encontró un aumento significativo de la expresión de factores angiogénicos como el VEGF (0,26 \pm 0,12 vs 1,27 \pm 0,13) y el factor inducible por hipoxia (HIF) (0,24 \pm 0,04 vs 8,22 \pm 1,46) comparado con los ApoE-KO alimentados con DC. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que en la aterogénesis se produce un incremento de EPC en la adventicia que junto con un aumento de factores angiogénicos contribuirían a la neovascularización

de la pared vascular, proceso asociado a la inestabilidad de la placa de aterosclerosis.

480. (587) MODIFICACIONES OXIDATIVAS EN EL CORAZÓN DE RATAS CON SOBRECARGA DE FRUCTOSA: PREVENCIÓN POR (-)-EPICATEQUINA

Calabró, V.¹; Aschettino, G.¹; Fischerman, L.¹; Vázquez-Prieto, M.²; Galleano, M.¹; Fraga, C.¹³; Piotrkowski, B.¹
*Fisicoquímica-Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Universidad de Buenos Aires-CONICET, Buenos Aires, Argentina*¹ *Dpto de Patología, Facultad de Medicina, UNC y Lab de Patofisiología Cardiovascular IMBECU-CONICET*² *Departamento de Nutrición, Universidad de California, Davis, California, Estados Unidos*³

El modelo experimental de ratas con sobrecarga de fructosa se considera un modelo de síndrome metabólico, siendo la hipertensión, hipertrigliceridemia, disminución en la tolerancia a la insulina, características típicas de este modelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la (-)-epicatequina sobre las modificaciones oxidativas en el corazón de ratas sometidas a sobrecarga de fructosa. Para ello, ratas Sprague-Dawley machos se dividieron en 3 grupos y recibieron durante 8 semanas: i) dieta control y agua potable (C); ii) dieta control y 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida (F), y iii) 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida, y dieta suplementada con (-)-epicatequina (20 mg/Kg de peso/día; FE). La presión arterial en las ratas F fue significativamente mayor que la de ratas C y FE ($p < 0.05$). La producción de anión superóxido, medido siguiendo la quimioluminiscencia de lucigenina inducida por NADH, fue mayor en las ratas con sobrecarga de fructosa que en las ratas control. En las ratas que recibieron (-)-epicatequina, no se observó dicho aumento ($p < 0.05$). En concordancia, la expresión de NOX4 fue mayor en las ratas F con respecto a C y FE ($p < 0.05$). En las ratas F, tanto la actividad de superóxido dismutasa como la de glutatión peroxidasa, fue menor que en el grupo control. En las ratas que recibieron (-)-epicatequina, la actividad de ambas enzimas no se vio disminuida. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron similares en el grupo F y C, pero la suplementación con (-)-epicatequina mostró una disminución del 50% en la producción de MDA. En resumen, estos resultados muestran que la suplementación con (-)-epicatequina previno las modificaciones oxidativas asociadas a la sobrecarga de fructosa en el corazón, protegiendo del aumento en la producción de oxidantes asociado al síndrome metabólico. Subsidios: UBACYT 20020100300012, 20020090100111 and 20020100100659 and CONICET (PIP 112-201101-00612). BP, MVP, MG y CGF son miembros de la carrera de Investigador de CONICET, Argentina. VC es becario CONICET.

481. (689) GALECTINA-1 REGULA LA INFLAMACIÓN CARDÍACA Y EL REMODELAMIENTO VENTRICULAR POST-INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Seropian, I.⁴; Cerliani, J.¹; González, G.²; Toldo, S.³; Matoso, M.²; Stupirski, J.¹; Van Tassel, B.³; Gelpi, R.²; Morales, M.²; Abbate, A.³; Rabinovich, G.¹
*Laboratorio de Inmunopatología, IBYME*¹ *Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, UBA*² *VCU Pauley Heart Center, Richmond VA (Estados Unidos)*³ *Servicio de Cardiología, FLENI*⁴

Galectina-1 (Gal-1), una lectina que participa en la resolución de la inflamación, la inmunidad y angiogénesis, fue recientemente identificada como componente del aparato contráctil del cardiomiocito; pero su rol en la función cardíaca es desconocido. El objetivo del estudio fue caracterizar la expresión y función de Gal-1 en el corazón con infarto agudo de miocardio (IAM). Ratonos wild type (WT) y animales deficientes en Gal-1 (*Lgals1*^{-/-}) fueron sometidos a IAM mediante ligadura de la arteria coronaria izquierda, sin reperfusión o con reperfusión luego de 30 min de isquemia. Se realizó ecocardiografía basal y 7 días post-IAM para medir diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI),

diámetro sistólico (DSVI) y fracción de acortamiento (Fac %). Se realizó western blot para cuantificar Gal-1 en corazones de ratones post-IAM y de pacientes con insuficiencia cardíaca (IC). Se realizó inmunohistoquímica para Gal-1 e inmunofluorescencia para células inflamatorias post-IAM sin reperfusión. Se utilizaron cultivos de cardiomiocitos HL-1 sometidos a hipoxia o estimulados con diversas citoquinas para medir Gal-1 por ELISA y western blot. La expresión cardíaca de Gal-1 aumentó significativamente 7 días luego del IAM al igual que en pacientes con IC avanzada. Gal-1 se observó principalmente en el infiltrado inflamatorio y en los miocitos de la zona del infarto pero no en áreas remotas. In vitro, hipoxia simulada y el estímulo con citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ y IL-17) aumentaron la expresión y la secreción de Gal-1 en cultivos de cardiomiocitos, mientras que citoquinas anti-inflamatorias como TGF- β y IL-10, inhibieron o no tuvieron efecto significativo. Los ratones *Lgals1*^{-/-} presentaron inflamación cardíaca caracterizada por mayor infiltrado de linfocitos T, células natural killer y macrófagos y menor infiltrado de células T regulatorias, generando dilatación (20% de incremento del DDVI, 6% incremento DSVI) y deterioro de la función ventricular (20% de reducción de Fac %) previo a la cirugía (basal) y peor remodelamiento ventricular 7 días post-IAM sin reperfusión. El tratamiento con Gal-1 recombinante redujo el daño cardíaco en el modelo de IAM con reperfusión (DSVI $p < 0.01$, Fac% $p < 0.05$ vs control). Nuestros resultados indican un rol protector de Gal-1 en la homeostasis cardíaca y el remodelamiento ventricular post-IAM previniendo la inflamación cardíaca. Gal-1 representa una estrategia terapéutica novedosa para prevenir la IC post-IAM.

482. (706) METABOLISMO ENERGÉTICO Y FUNCIÓN CARDÍACA EN UN MODELO AGUDO DE EXPOSICIÓN A PARTÍCULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Marchini, T.¹; Magnani, N.¹; D' Annunzio, V.³; Tasat, D.²; Gelpi, R.³; Alvarez, S.¹; Evelson, P.¹
*IBIMOL-CONICET, Química General e Inorgánica, FFyB, UBA*¹ *Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Martín*² *Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, UBA*³

La exposición a partículas de contaminación ambiental se encuentra asociada a incrementos en la morbilidad y mortalidad cardiovascular. Las alteraciones en el metabolismo energético cardíaco podrían estar implicadas en los efectos adversos observados. El objetivo del presente trabajo fue evaluar dicha hipótesis, enfocando el estudio en la función mitocondrial y en su relación con la contractilidad cardíaca en corazón de ratón. Se utilizó un modelo de exposición aguda a partículas derivadas de la combustión del petróleo (ROFA, 1,0 mg/kg peso) mediante instilación intranasal. Las mediciones se realizaron a las 3 h del tratamiento. Se evaluó el consumo de O₂ mediante polarografía, el potencial de membrana por citometría de flujo y la producción de ATP por quimioluminiscencia en mitocondrias aisladas de corazón. El estudio de la función contráctil se realizó en corazones perfundidos según la técnica de Langendorff a volumen constante. La exposición a ROFA disminuyó el consumo de O₂ mitocondrial tanto en estado de respiración pasiva como activa, en un 30 y 24%, respectivamente (control: 88 \pm 5 y 240 \pm 20 ng-at O/min mg prot; $p < 0,05$). Dicha disminución fue acompañada de una caída en el potencial de membrana mitocondrial y de una disminución del 52% en la producción de ATP (control: 560 \pm 20 nmol/min mg prot; $p < 0,05$). La relación ATP/O para los ratones expuestos a ROFA fue de 1,6 (control: 2,3). La presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) no mostró cambios en condiciones basales (control: 77 \pm 5 mmHg). Sin embargo, se observó una disminución en la respuesta a un estímulo β (isoproterenol 1 μ M) en los animales expuestos a ROFA (Δ PDVI control: +52 \pm 9% vs. Δ PDVI ROFA: +19 \pm 4%; $p < 0,001$). Estos resultados muestran alteraciones en la función mitocondrial asociadas con una disminución en la reserva contráctil del músculo cardíaco, lo que podría encontrarse relacionado con los efectos cardiovasculares adversos producto de la exposición a partículas de contaminación ambiental.

INMUNOLOGÍA INNATA E INFLAMACIÓN 4

483. (747) LPS MODULA EN FORMA DIFERENCIAL LA INFLAMACIÓN ALÉRGICA DEL EPITELIO BRONQUIOLAR SEGÚN SEA ADMINISTRADO PREVIO O POSTERIOR AL DESARROLLO DEL ASMA

García, L.^{1,3}, Leimgruber C.^{1,3}, Uribe Echevarría, E.², Maldonado C.^{1,3}

Centro de Microscopía Electrónica, FCM, UNC¹ Servicio de Neumonología, Sanatorio Allende² Instituto de Investigación Médica (INICSA)- CONICET³

Recientes trabajos estudiaron la interacción entre procesos alérgicos y componentes bacterianos; sin embargo no se ha dilucidado si la estimulación de inmunidad innata de las vías aéreas con moléculas microbianas resulta eficaz para contrabalancear la inflamación alérgica, o por el contrario la empeoran. Utilizando un modelo de asma con ovoalbumina (OVA), el objetivo fue estudiar la modulación de la inflamación alérgica por estímulo con LPS de *E. coli*, antes o después de desarrollar el proceso alérgico. Para ello utilizamos hembras Balb/c asignadas a los siguientes grupos (n=9): OVA, sensibilizado por vía i.p. con una solución de OVA/Alumm (1mg/mL) los días 0 y 14 y desafiado vía intranasal (i.n) con OVA (1mg/mL) los días 24 al 34, el grupo LPS-OVA que recibió LPS i.n. (200µg/mL) los días -3 y -1 previos al esquema de OVA, y OVA-LPS que recibió LPS en lugar de OVA los días 32 al 34 del desafío; cada grupo tuvo su CONTROL en el que el desafío se realizó con PBS. Se obtuvo tejido pulmonar para análisis ultraestructural, técnica ABPAS; y lavado bronqueoalveolar (LBA) para recuento poblacional, dosaje de citocinas Th1/Th2 por ELISA y de muc5ac por Western Blot. Los resultados mostraron que en LPS-OVA, se redujo la metaplasia mucosa (ABPAS p<0.001) y la expresión de Muc5ac (p<0.01) preservando mejor el fenotipo epitelial con respecto a OVA; también disminuyó la eosinofilia (p<0.001) y el nivel de IL-4 (p<0.001) mientras incrementó IFN γ (p<0.001) y el porcentaje de macrófagos y neutrófilos (p<0.01). OVA-LPS en cambio, fue menos eficiente para controlar la metaplasia (ABPAS p<0.05 vs OVA; MUC5AC ns vs OVA) y para disminuir IL-4 (p<0.05 vs OVA) e IFN γ no cambió respecto OVA. Si bien los eosinófilos disminuyeron en este modelo, también hubo mayor infiltrado de neutrófilos (p<0.01 vs LPS-OVA). Como conclusión el estímulo de LPS logra mayor protección del epitelio aéreo al aplicarlo sobre el epitelio en condiciones normales que sobre un epitelio modificado por el asma.

484. (754) EFECTO DE IL-23 E IL-27 SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS NK HUMANAS

Ziblat, A., Spallanzani, R., Avila, D., Raffo, I., Domaica, C., Fuertes, M., Zvirner, N.

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET.

IL-23 e IL-27 integran la familia de citoquinas de la IL-12, y como ésta, son secretadas por células dendríticas (CDs). Debido al rol de IL-12 en la activación de las células NK, previamente investigamos el efecto de IL-23 e IL-27 sobre estas células y demostramos que promueven la secreción de IFN-g a través de un *priming* para IL-15 e IL-18. El objetivo de este trabajo fue profundizar estos estudios para lo cual cultivamos células NK de dadores sanos con IL-15 (factor de sobrevida) e IL-18 y/o IL-23 e IL-27, y evaluamos por citometría de flujo (CF) la expresión de receptores, marcadores de activación y actividad citotóxica. Células NK estimuladas durante 5 d con IL-15 + IL-23 mostraron un aumento significativo en la expresión de MHC-I (p<0,01), NKp46 (p<0,001) y CD25 (p<0,01) respecto a IL-15. El aumento en CD25 fue biológicamente relevante ya que la re-estimulación con IL-2 indujo un aumento significativo (p<0,05) en la secreción de IFN-g respecto de células NK estimuladas con IL-15. Además, células NK estimuladas con IL-15 + IL-27 mostraron un aumento significativo en la expresión de MHC-I (p<0,01), CD69 (p<0,05) y NKp46 (p<0,001), respecto a IL-15. También observamos un aumento significativo en la expresión de NKp46 en células NK estimuladas con IL-15 + IL-18 + IL-27 respecto a células estimuladas con IL-15 + IL-18 (p<0,01). Mediante tinción con 7-AAD y CF observamos que IL-27 (pero no IL-23) indujo un

aumento de la citotoxicidad dependiente de NKp46 de las células NK co-estimuladas con IL-15 (p<0,001) o con IL-15 + IL-18 (p<0,01) contra células Raji, respecto a células NK estimuladas con IL-15 o IL-15 + IL-18, respectivamente. Ensayos de inhibición y bloqueo mostraron la participación de la vía secretoria y de TRAIL en esta citotoxicidad. Concluimos que IL-23 e IL-27, en presencia de IL-15 y/o IL-18, estimulan diferencialmente la activación y funciones efectoras de las células NK humanas, lo que podría ser relevante durante su interacción con CDs.

485. (275) ¿LOS FITOESTRÓGENOS REDUCEN LA INFLAMACIÓN VASCULAR?

Sandoval, M.^{1,3}, Rauschemberger, M.^{1,2}, Cutini, P.^{1,2}, Campelo, A.^{1,2}, Massheimer, V.^{1,2}

Cátedra de Bioquímica Clínica II, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, Bahía Blanca¹ CONICET² Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Bahía Blanca³

La aterosclerosis es un desorden que involucra a células de la pared vascular, endoteliales (CE) y musculares lisas (CMLV), y del sistema inmune. La adhesión de monocitos al endotelio vascular y la desdiferenciación de la CMLV a linaje óseo (CMLV-OB) son procesos clave en el deterioro de la arquitectura vascular. Los fitoestrógenos (FE) son suplementos dietarios usados para atenuar síntomas menopáusicos con potencial acción cardioprotectora. El objetivo del trabajo fue investigar el efecto del FE genisteína (Gen) sobre: a) la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) que median la adhesión de monocitos y, b) la transdiferenciación de la CMLV. Usamos cultivos primarios de CE y CMLV aisladas de aorta de rata. Se observó en CE que el tratamiento de 24 hs con Gen 10 nM disminuyó los niveles de expresión del ARNm (RT-PCR) de ICAM-1 mientras que el tratamiento con LPS (21 hs) la estimuló (2 veces el basal). Empleando citometría de flujo evaluamos la expresión inmunofenotípica del complejo de integrinas CD11b/CD18 en monocitos de sangre periférica. Mientras que el tratamiento con LPS aumentó la expresión en un 30% (p<0.01), el FE la disminuyó respecto al control (57 y 45% s/c, CD11b y CD18 respectivamente, p<0.01). La progresiva inflamación vascular deriva en calcificación vascular. *In vitro* la transdiferenciación de CMLV se induce por tratamientos prolongados con elevadas concentraciones de calcio y glicerofosfato. Bajo estas condiciones, observamos que las CMLV-OB expresan FAL (marcador óseo). CMLV-OB calcificadas expuestas a Gen presentaron una marcada reducción de FAL (430 \pm 35 vs 32 \pm 1.9 UI/mg proteínas). El análisis morfológico de las monocapas de CMLV-OB (microscopía óptica) demostró que los nódulos de calcificación fueron significativamente reducidos en células calcificadas tratadas con Gen. Estos resultados sugieren que la Gen tendría una importante acción vasoprotectora actuando a diferentes niveles de este proceso inflamatorio crónico.

486. (738) LA INTERACCIÓN ENTRE GALECTINA-7 Y SUS GLICANOS MODULA EL DIÁLOGO ENTRE QUERATINOCITOS Y CÉLULAS DE LANGERHANS: IMPLICANCIAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Pinto, N., Méndez Huergo, S., Dergar Dylon, S., Datollo, T., Rabinovich, G., Cerliani, J.

IBYME

La epidermis es un epitelio pavimentoso estratificado conformado predominantemente por queratinocitos. Estas células al activarse, producen una variedad de citoquinas y quimiocinas que modulan la función de Células de Langerhans (CLs) CD1+ CD34+ Langerina+) ancladas a través de uniones mediadas por E-Caderinas. El objetivo principal de este trabajo es estudiar la relevancia de galectina-7 (Gal-7), lectina endógena de expresión preferencial en queratinocitos, en la regulación del diálogo entre queratinocitos y células de Langerhans (CLs) frente a diferentes desafíos inflamatorios y tolerogénicos y analizar los mecanismos subyacentes. Cultivos primarios *in vitro* de queratinocitos estimulados con diferentes citoquinas demostraron que IL-10, IL-12, TGF- β y TNF incrementaron la expresión y secreción de Gal-7 tal

como lo revelaron ensayos de WB y ELISA ($p < 0,05$). En cultivos mixtos con linfocitos T, CLs diferenciadas de médula y activadas en presencia Gal-7 revelaron capacidad inhibitoria comparadas con cultivos desarrollados en ausencia de Gal-7 o con CLs sin activar ($p < 0,05$). A su vez observamos que las CLs al activarse alteran su glicofenotipo de superficie permitiendo mayor unión de Gal-7 a glicanos expuestos por glicoproteínas de estas células. En ensayos hipersensibilidad *in vivo* con ratones WT, deficientes en Gal-7 (KO) y transgénicos para Gal-7 (que sobreexpresan Gal-7) observamos que los animales transgénicos no desarrollan inflamación en la zona afectada en comparación con ratones WT y KO los cuales poseen mayor infiltrado de macrófagos y células NK ($p < 0,05$ y $p < 0,01$). Estos resultados sugieren que la interacción entre Gal-7 y glicanos específicos direccionan la actividad de CLs y polarizan el tipo de respuesta subsecuente.

NEUROCIENCIAS 5

487. (393) UTILIDAD DIAGNÓSTICA DEL PERFIL DE BIOMARCADORES EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN DEMENCIA FRONTOTEMPORAL Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Surace, E.; Chrem-Méndez, P.; Campos, J.; Allegri, R.; Sevever, G.

Instituto de Investigaciones Neurológicas Dr. Raul Carrea FLENI

Un gran número de estudios han validado el uso de los biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR): $A\beta_{42}$, tau total (t-tau) y tau fosforilada (p-tau), en el diagnóstico y predicción de progresión en Enfermedad de Alzheimer (EA). La Demencia Frontotemporal (DFT) representa una entidad heterogénea caracterizada por cambios en el comportamiento y el lenguaje. Si bien las formas clínicas típicas de EA y DFT son distinguibles entre sí, existen casos en los que ocurre solapamiento de síntomas, lo cual dificulta el diagnóstico inicial. Un ejemplo de ello son los pacientes con afasia progresiva primaria (APP), en donde la patología subyacente podría corresponder a EA ó a DFT. Por esta razón, nos propusimos estudiar el perfil de biomarcadores en LCR en casos de DFT en busca de un patrón molecular distintivo. Para ello, se reclutaron, con la aprobación del comité de ética institucional, 7 pacientes con diagnóstico inicial de DFT, 5 casos de Demencia Tipo Alzheimer (DTA), y 3 pacientes con afasia progresiva primaria (APP). La determinación de biomarcadores se realizó en LCR, obtenido por punción lumbar, mediante ensayos de ELISA. En primer lugar, se observaron diferencias significativas en los niveles de cada biomarcador analizado entre los casos de DFT y DTA (Mann-Whitney test para todos; t-tau y p-tau $p = 0,048$). En particular, $A\beta_{42}$, el índice $A\beta_{42}/p$ -tau y el índice conocido como "Perfil EA" que relaciona los niveles de $A\beta_{42}$ y t-tau, fueron los que mayores diferencias presentaron ($A\beta_{42}$ y $A\beta_{42}/p$ -tau $p = 0,0025$; Perfil EA $p = 0,0057$). Interesantemente, el análisis del perfil molecular de los tres pacientes con APP reveló que éste era compatible con EA, permitiendo así la diferenciación con DFT. Si bien el número de pacientes de este estudio es bajo, los datos obtenidos sugieren fuertemente que el análisis combinado de biomarcadores en LCR es útil para caracterizar la patología subyacente en síndromes como DFT y DTA en los cuales ocurre solapamiento de características clínicas.

488. (141) MECANISMOS CALCIO-DEPENDIENTES INVOLUCRADOS EN LA MODULACION DE LA TIROSINA HIDROXILASA POR LAS ENDOTELINAS EN EL BULBO OLFATORIO

Nabhen, S.¹²; Guil, M.¹²; Hope, S.¹²; Bianciotti, L.³; Vatta, M.¹²

Catedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA¹ IQUIMEFA-CONICET² Catedra de Fisiopatología, INIGEM-CONICET, FFyB-UBA³

En trabajos previos demostramos que las endotelinas 1 y 3 (ET-1 y -3) están involucradas en la regulación a largo plazo de

la actividad y expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en bulbo olfatorio (BO). Estos mecanismos regulatorios involucran múltiples vías de señalización, sin embargo el papel de los procesos Ca^{2+} -dependientes no fueron dilucidados. El objetivo del presente trabajo es estudiar la participación del Ca^{2+} sobre la regulación a largo plazo de la TH producida por las ETs en el BO de ratas normotensas. Los estudios se realizaron en BO incubados *in vitro* durante 240 min. En los mismos se determina la actividad, niveles totales de TH y el mRNA-TH (Media \pm SEM). Los resultados mostraron que el aumento de la actividad de TH inducida por ET-1 y -3 involucra al Ca^{2+} liberado de los depósitos rianodina dependientes (Dantrolona; DNT) y el extracelular (medio bajo en Ca^{2+} ; LCM) (ET-1 144.0 \pm 7.9, ET-1+DNT 100.5 \pm 16.0*, ET-1+LCM 105.6 \pm 1.4* y ET-3 152.1 \pm 9.0, ET-3+DNT 94.0 \pm 5.8*, ET-3+LCM 86.3 \pm 3.2*; * $p < 0.05$ vs ETs). Además, el aumento del mRNA-TH evocado por las ETs es parcialmente mediado por el calcio del retículo endoplasmico (depósitos rianodina e IP3 (APB) dependientes) (Control 1.0 \pm 0.1; ET-1 5.2 \pm 0.4*, ET-1+DNT 2.6 \pm 0.2* †, ET-1+APB 3.6 \pm 0.41* † y ET-3: 5.8 \pm 0.4*, ET-3+DNT: 3.7 \pm 0.5* ‡, ET-3+APB 2.6 \pm 0.2* ‡; * $p < 0.05$ vs Control, † y ‡ $p < 0.05$ vs ET-1 y ET-3, respectivamente), mientras que fue totalmente inhibido por la ausencia del Ca^{2+} extracelular. Sin embargo, el Ca^{2+} no afectó el incremento en los niveles totales de la enzima. Estos resultados permiten concluir que el Ca^{2+} proveniente de distintas vías contribuye en la regulación de la TH por las ETs en el BO de ratas normotensas.

489. (440) EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN CELULAR DEL RECEPTOR CLÁSICO DE PROGESTERONA (PR) EN LA MÉDULA ESPINAL DE CONTROLES Y PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA).

Gargiulo-Monachelli, G.¹²⁴; Campos-Melo, D.²; Droppelmann, C.²; Keller, B.²; Leystra-Lantz, C.²; De Nicola, A.¹³; González Deniselle, M.¹³; Volkening, K.²; Strong, M.²
Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET¹ Department of Clinical Neurological Sciences, University of Western Ontario, Robarts Research Institut² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.³ Servicio de Neurología, Hospital J.A. Fernández⁴

La progesterona (PROG) es neuroprotectora en el ratón Wobler modelo de degeneración de motoneurona. Los efectos de la PROG son en parte mediados por el PR que regula la expresión génica. Objetivo: determinar la expresión y localización celular de las isoformas A y B del PR en tejido post-mortem de controles y pacientes con ELA esporádica. La región cervical y lumbar de la médula espinal fue obtenida para realizar RT-PCR semi-cuantitativa, inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF). Se utilizaron anticuerpos y primers para PRA y PRB (PR A+B) o sólo para PRB. La co-localización por IF se realizó utilizando marcadores de endotelio (VWF), astrocitos reactivos (GFAP), neurofilamentos fosforilados de cadena pesada (SMI31) y de neuronas (NSE). La expresión del ARNm de PR A+B a nivel lumbar fue significativamente mayor en ELA (n=6) que en controles (n=3, $p = 0,04$), mientras que fue similar en la médula cervical. En ambas regiones espinales, el ARNm de PRB fue 2 veces mayor en ELA ($p = ns$). Se halló inmunoreactividad del PR A+B en ELA (n=8) y controles (n=6) en vasos y procesos axonales. En vasos, se localizó en células del músculo liso y el endotelio. Las motoneuronas se tiñeron irregularmente a nivel citoplasmático y del cono axonal, y fuertemente en, y recubriendo, los axones de las raíces ventrales. Ante la semi-cuantificación, pacientes con ELA presentaron mayor reactividad que controles a nivel de vasos y raíces nerviosas. PRB por IHQ se observó sólo en núcleos del endotelio, células gliales y también en motoneuronas. La co-localización del PR A+B fue positiva para VWF, SMI-31, NSE y negativa para GFAP. Ambas isoformas del PR están presentes en la médula espinal humana y parece existir una mayor expresión en la ELA. Vasos y raíces nerviosas presentaron los niveles más altos de inmunoreactividad. Estos hallazgos sugieren que el PR puede tener un papel en la neovascularización, la integridad axonal y la mielinización en la ELA.

490. (580) EFECTOS DEL ANTIDEPRESIVO TIANEPTINA SOBRE EL VOLUMEN HIPOCAMPAL DE RATAS SOMETIDAS A SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA Y ESTRÉS CRÓNICO VARIABLE EN EDAD ADULTA

Zaloznik Figueroa, M.; Trujillo, V.; Pollano, A.; Suárez, M.; Durando, P.

Cátedra de Fisiología Animal. FCEyN- UNC

Distintos estudios han demostrado que la separación materna temprana estimula al eje hipotálamo-hipofiso-adrenal. En individuos vulnerables, tal respuesta podría inducir depresión frente a situaciones de estrés en la vida adulta. Esta patología produciría alteraciones en el volumen hipocampal, que podrían revertirse por medio del antidepresivo tianeptina. En base a estos antecedentes, se propone analizar -por estereología- si la administración de tianeptina a ratas macho sometidas a separación materna temprana y a estrés crónico en la edad adulta, reverte las alteraciones en el volumen total del hipocampo dorsal y/o de las áreas CA1, CA2/3 y/o giro dentado. Este trabajo se realizó en ratas macho, a las que se sometió a separación materna temprana (4,5 h del día 1 posnatal [PN] al 21 PN inclusive). Desde el día 50 PN, se les aplicó -durante 24 días- un protocolo de estrés crónico variable, aleatorio e impredecible: ruido (4 h), anestesia etérea, dos inyecciones de solución salina isotónica, ayuno (24 h) e inmovilización (1 h). Durante todo el protocolo de estrés, los animales se inyectaron (ip) con: vehículo o tianeptina (Servier) (10 mg/Kg). Los volúmenes del hipocampo dorsal y de sus áreas se calcularon por el método de Cavalieri. Los volúmenes totales de los hipocampos dorsales de los animales sometidos a estrés disminuyen significativamente ($p < 0,05$) respecto a los que no lo recibieron. Además, se evidenció un efecto significativo ($p < 0,05$) a nivel de la interacción triple de factores, tanto en el volumen de hipocampos dorsales como de las áreas CA3/CA2. Así, los animales tratados con tianeptina, separados y no estresados presentaron un volumen mayor respecto al resto de los grupos que recibieron el antidepresivo. Estos resultados permitirían concluir que el antidepresivo tianeptina revertiría la disminución del volumen hipocampal y de las áreas CA3/CA2 sólo cuando los animales se someten al estrés emocional de la separación materna temprana.

491. (596) EFECTO DE LA TOXINA SHIGA 2 (STX2) Y LPS PRODUCIDAS POR ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) EN LA MICROVASCULATURA MOTORA CEREBRAL DE RATONES

Vasconcelos Esteves Pinto, A.¹; Cangelosi, A.²; Geoghegan, P.²; Zeolla, M.¹; Jacobsen, M.¹; Tironi Farinati, C.¹; Goldstein, J.¹

Laboratorio de Neurofisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA¹ Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos, Anlis, Malbran²

El sistema motor central es frecuentemente afectado en pacientes que sufren de síndrome urémico hemolítico infectados con EHEC. Además de la Stx2, el LPS secretado puede estar involucrado en la patología, por lo que el estudio de los cambios de la unidad neurovascular por ambas toxinas es relevante. El objetivo fue determinar si Stx2 altera la distribución de la microvasculatura, y si el LPS la exacerba. Ratones hembras NIH fueron inyectadas vía endovenosa con Stx2 (0,7DL₅₀)+LPS (13ng/g), Stx2 (0,7DL₅₀), LPS (13ng/g) o vehículo y perfundidos intracardiamente con paraformaldehído 4% en B.F. 0,1M a 0, 2, 4, 7 y 20 días de tratamiento. Las secciones de cerebros obtenidas fueron sometidas para histofluorescencia con lectinas (*Lycopersicon esculentum*) e inmunofluorescencia para detectar VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) para estudiar el perfil de la microvasculatura, y anti-NeuN para detectar lesión neuronal. Las mismas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia, las imágenes capturadas con una cámara digital y cuantificadas con el software Image J. Se observó un aumento significativo máximo ($p < 0,05$) en el número de microvasos en los tratados con Stx2+LPS en el día 4 respecto de sus controles en la corteza motora y en el cuerpo estriado. Por el contrario se

observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el tamaño de los mismos. Por otra parte se observan cambios significativos ($p < 0,05$) en la expresión microvascular de VEGF y de la distribución nuclear de Neu-n con Stx2+LPS, Stx2 y LPS respecto del vehículo. Sin embargo un tratamiento con el anti-inflamatorio dexametasona (7,5mg/kg) redujo significativamente ($p < 0,05$) los cambios observados de la microvasculatura y neuronas en los tratamientos descriptos. Se concluye que Stx2 logra cambiar el perfil de la unidad neurovascular, el LPS potencializa su acción deletérea, y la acción protectora de la dexametasona indica el aporte inflamatorio en la encefalopatía generada por estas toxinas.

492. (607) RETRACCIÓN DEL VOLUMEN DEL HIPOCAMPO, CAMBIOS ASTROGLIALES TEMPRANOS Y VASCULARES EN EL PROCESO NEURODEGENERATIVO DEL RATÓN TRANSGÉNICO PDAPP, MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Pomilio, C.; Pavía, P.; Vinuesa, Á.; Beauquis, J.; Saravia, F. *Laboratorio de Neurobiología, IQUIBICEN, FCEyN, UBA / IByME, CONICET*

La incidencia de la enfermedad de Alzheimer (AD) está en aumento y constituye un importante problema de salud pública. El proceso neurodegenerativo afecta distintas estructuras cerebrales provocando una progresiva pérdida de habilidades cognitivas. En la actualidad, se propone la activa participación de alteraciones vasculares y gliales, además de neuronales, en su patogenia. En esta línea, nuestro objetivo fue estudiar la evolución temporal de cambios vasculares y gliales en el hipocampo de ratones transgénicos (Tg) y no Tg (NTg) para APP humana (portando las mutaciones *Swe* e *Ind*) entre los 5 y 20 meses (m) de edad. El volumen hipocampal mostró una disminución a los 9m en el Tg respecto al Ntg, medido en cortes de vibrátomo procesados para el marcador neuronal NeuN ($P < 0,05$). Se evaluaron las placas amiloides usando tinción de Rojo Congo e inmunohistoquímica para beta amiloide; en tanto que se estudió la astrogliosis por GFAP y S100B, observando que casi la totalidad de astrocitos en la región estudiada coexpresaba ambos marcadores. Encontramos que los cambios gliales tienen un inicio temprano en el Tg, manifestándose un aumento en la ramificación astrocitaria a los 5 m (previo a la aparición de placas amiloides; $p < 0,01$). Se evaluaron los vasos sanguíneos mediante histoquímica para lectina acoplada a fluoresceína. Aplicando análisis computarizado de imágenes, se detectó una disminución de la densidad de ramificaciones vasculares en el Tg respecto al NTg de 9m ($P < 0,05$), en los cuales este evento ocurre más tardíamente, a los 17m. Si bien el área ocupada por vasos no mostró diferencias, se observó la presencia de depósitos amiloides intravasculares en los Tg. Nuestros resultados muestran que dos entidades (vasos y glía) funcionalmente ligadas muestran importantes cambios en el hipocampo durante la progresión de la enfermedad, probablemente contribuyendo a la alteración de la homeostasis del microambiente cerebral en forma concomitante a la atrofia de la estructura.

493. (671) PARTICIPACION DE LA MOLECULA DE ADHESION PSA-NCAM EN LOS EFECTOS CONDUCTUALES Y SINAPTICOS DEL ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA

Podestá, M.^{1,2}; Codagnone, M.^{1,2}; Saborido, M.³; Lorenzo López, R.¹; Brusco, A.¹; Reinés, A.^{1,2}

Instituto de Biología Celular y Neurociencia de Robertis IBCN UBA CONICET¹ Cátedra de Farmacología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA² Instituto de Investigaciones Farmacológicas ININFA UBA CONICET³

La neurobiología de la depresión se asocia con alteraciones en la plasticidad hipocampal. Sin embargo, se desconoce en qué medida los cambios plásticos se relacionan con las alteraciones conductuales y con los efectos antidepresivos. En este trabajo estudiamos las características de las sinapsis hipocampales de animales expuestos a un modelo experimental de depresión (paradigma de desesperanza aprendida) y tratados crónicamente con fluoxetina (Flx) y determinamos su correlación con la conducta de desesperanza (LH). Cuatro días después del entrenamiento (4 PE), los animales LH evidenciaron la conducta de desespe-

ranza en ausencia de alteraciones en la ultraestructura sináptica. Mientras que la inmunomarcación para la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) no se modificó, su forma polisialilada (PSA-NCAM) se redujo. A los 4 PE, los animales recibieron solución salina o Flx (C-S, C-Flx, LH-S, LH-Flx) durante 21 días. La conducta de desesperanza persistió en los animales LH-S, así como el descenso de los niveles hipocámpales de PSA-NCAM. NCAM disminuyó, aumentó la brecha sináptica y las vesículas sinápticas mostraron una morfología no clásica. En los animales LH-Flx que normalizaron la conducta, el tratamiento aumentó PSA-NCAM, intensificó la reducción de NCAM y previno la alteración de los parámetros ultraestructurales. En los animales resistentes (LH-FlxR), PSA-NCAM permaneció disminuido. La administración intrahipocámpal de un péptido mimético funcional de PSA-NCAM indujo una mejoría conductual e incrementó la inmunomarcación para sinaptofisina en los animales LH. Nuestros resultados indican que la aparición de la conducta de desesperanza y la disminución de PSA-NCAM anteceden a los cambios sinápticos y al descenso de NCAM y sugieren que estos formarían parte de un cambio adaptativo. En suma, la acción farmacológica de la Flx conlleva beneficios conductuales e inducción concomitante de remodelado sináptico positivo, ambos dependientes de PSA-NCAM.

494. (709) EFECTOS DE LA SITAGLIPTINA SOBRE LA ZONA SUBVENTRICULAR DE RATONES DIABÉTICOS

Bachor, T.; Cubilla, M.; Bianchi, A.; Suburo, A.
Hospital Austral

La diabetes tipo 2 (DBT2) es un predictor independiente del deterioro cognitivo y la demencia. Ya que la diabetes reduce la proliferación en los nichos neurogénicos adultos, nos preguntamos si las gliptinas pueden prevenir el deterioro de la zona subventricular (ZSV) en ratones diabéticos. Empleamos ratones C57Bl/6J machos, con curvas de tolerancia a la glucosa (CTG) en límites normales. Los ratones fueron repartidos en 3 grupos (n = 4). Dos grupos recibieron estreptozotocina (Ezt, 100 mg/kg) y nicotina-mida (120 mg/kg) en los días 1 y 3 del experimento. A partir del cuarto día, uno de los grupos (DBT + S) recibió sitagliptina (100 mg/kg/día, ip). Los otros dos grupos (DBT y control) recibieron placebo. Se efectuó una CTG el día 13. Todos los ratones recibieron bromodeoxiuridina (BrdU, 150 mg/kg) el día 15, y al día siguiente fueron sacrificados y perfundidos con paraformaldehído. Se obtuvieron cortes que fueron inmunoteñidos para BrdU y la densidad de marca en la ZSV fue evaluada cuantitativamente (px/corte). A los 12 días, las glucemias en ayunas fueron: controles, 126.6 ± 9.8; DBT, 257.5 ± 32.7 y DBT+S, 148.3 ± 14.9. Treinta min después de la administración de glucosa, los niveles fueron 180.8 ± 6.6, 404.3 ± 30.8 y 267.5 ± 38.7, respectivamente. Estos valores son compatibles con DBT2. En la ZSV, las áreas BrdU+ fueron: controles, 703 ± 61; DBT 452 ± 40; DBT + S, 741 ± 58. La reducción de núcleos BrdU+ en los animales DBT fue estadísticamente significativa (p < 0.01), pero no hubo diferencias entre los controles y los DBT + S. Concluimos que la diabetes, aún moderada, altera la proliferación en la ZSV. A pesar del trastorno metabólico, el tratamiento con sitagliptina protegió la proliferación de los precursores neurogénicos. Este efecto podría ser atribuido tanto a la mejora de la glucemia como a un efecto directo de GLP-1 sobre los precursores neurogénicos.

495. (710) LAS ISOFORMAS ALFA Y BETA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES EN LA RETINA

Marquioni Ramella, M.; Cubilla, M.; Suburo, A.
Universidad Austral

Los glucocorticoides constituyen un conocido agente protector de los fotorreceptores dañados por el exceso de iluminación. Los efectos de estos esteroides son mediados por un receptor nuclear codificado por el gen NR3C1, que origina esencialmente dos proteínas, alfa y beta. La primera es el receptor nuclear, actúa como inhibidor. A fin de valorar la participación de estas dos isoformas, GRalfa y GRbeta, en las respuestas de la retina a la luz, determinamos su localización en retinas expuestas a

distintas condiciones de iluminación. Empleamos ratones Balb-c, hembras, de 5-7 semanas de edad, criados bajo iluminación cíclica (12 h 60 lux: 12 h oscuridad). Obtuvimos muestras a mediodía o a medianoche, y después de exposición a 1500 lux durante 6 h u oscuridad prolongada por 7 d. Se realizó un estudio inmunohistoquímico con anticuerpos que reconocen específicamente a cada isoforma (AShGR y BShGR, generosamente proporcionados por el Dr. J.A. Cidlowski). A mediodía y a medianoche se detectó inmunoreactividad (IR) GRalfa en las capas nuclear externa, nuclear interna y de células ganglionares (CNE, CNI y CCG), siendo los núcleos de las células de Müller los sitios de mayor IR. No se detectó GRalfa-IR en el epitelio pigmentario (EP) que, por el contrario, mostró abundante GRbeta-IR. La limitante externa solo fue marcada por GRalfa durante el día. En la oscuridad prolongada, GRalfa- y GRbeta-IR se redujeron en las CCG, sin modificaciones en las otras capas. Después de injuria por luz, GRalfa-IR aumentó en la limitante externa, mientras que GRbeta desapareció del EP. Estos hallazgos implican que las isoformas alfa y beta del GR intervienen en los mecanismos de protección de los fotorreceptores. Además, la presencia de GRbeta en el EP, donde no se detecta GRalfa, sugiere que estas hormonas tendrían sobre el EP efectos opuestos a los que ocurren en los fotorreceptores.

496. (322) VÍAS INTRACELULARES ASOCIADAS A LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA A3 EN SINAPSIS NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO

Cinalli, A.; Guarracino, J.; Losavio, A.
Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari, IDIM-CONICET

En trabajos anteriores encontramos que en sinapsis neuromuscular (SNM) de ratón la inosina (IN, 100 μM), metabolito de adenosina (AD), es capaz de inhibir presinápticamente la liberación espontánea y evocada de ACh al activar receptores (R) AD A₃. Nuestro objetivo fue investigar los mecanismos de transducción intracelular involucrados en la acción de IN sobre la secreción de ACh. En diafragmas de ratones CF1 se estudió el efecto de IN sobre la frecuencia de potenciales de placa miniatura (fMEPPs) y amplitud de potenciales de placa (aEPPs) en presencia de antagonistas de diferentes vías de señalización. Los resultados demuestran que los RAD A₃ están acoplados a proteína G_{i/o}, ya que NEM (desacopla proteína G_{i/o} del receptor) abolió el efecto inhibitorio de IN (NEM 125.7±13.9% respecto al control, NEM+IN 123.8±6.6%, n=5). Cuando investigamos la vía intracelular asociada a la activación de estos R encontramos que el inhibidor de PKA H-89 no previno el efecto de IN sobre la fMEPPs (H-89 101.8±5.0% respecto al control, H-89+IN 67.9±5.0%, p<0.05, n=4), mientras que el inhibidor de PKC queleritrina (QL) ocluyó su acción (QL 102.7±9.3%, QL+IN 105.9±10.7%, n=4). Además, el inhibidor de calmodulina (CaM) W-7 previno la modulación inducida por IN (W-7 97.8±1.7%, W-7+IN 97.6±7.5%), pero esta acción fue independiente de la fosforilación provocada por CaMKII; su inhibidor KN-62 no modificó el efecto de IN (KN-62 104.4±7.9%, KN-62+IN 68.0±4.9%, p<0.05, n=4). Consistente con estos resultados, el efecto de IN sobre aEPPs, también fue abolida por QL y W-7, pero no por H-89 y KN-62 (QL 102.9±9.8% respecto al control, QL+IN 109.3±9.2%, n=4; W-7 107.4±9.1%, W-7+IN 101.4±8.9%, n=4; H-89 92.9±0.9%, H-89+IN 63.4±2.4%, p<0.05, n=4; KN-62 108.7±9.9%, KN-62+IN 69.1±8.5%, p<0.05, n=4). Estos resultados sugieren que, en SNM de mamífero, la IN activa RAD A₃ que están acoplados a proteína G_{i/o} y que PKC y CaM podrían estar involucradas en la acción moduladora de IN sobre la liberación de ACh.

497. (489) ROL DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN LA INDUCCIÓN DE LA ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

Garay, L.^{1,2}; Willemse, E.¹; González Deniselle, M.^{1,2}; Lima, A.¹; Roig, P.¹; De Nicola, A.^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.²

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante, inflamatoria y neurodegenerativa del sistema nervioso central. En trabajos previos describimos acciones beneficiosas del tratamiento

con dosis suprafisiológicas de progesterona en el modelo animal de EM, la encefalitis autoinmune experimental (EAE) utilizando ratones C57BL/6 (C57). Con el objetivo de dilucidar el rol del receptor clásico de progesterona (PR), se indujo la enfermedad en ratones hembra C57 en paralelo con ratones Knock out (PRKO) y su cepa salvaje (WT) de origen 129SvxC57BL/6. Se comparó el grado de enfermedad, incidencia y parámetros histopatológicos en la médula espinal en los 3 grupos. Los resultados mostraron menor grado de enfermedad en la cepa 129SvxC57BL/6 vs. C57 (Índice enfermedad: 4.94 ± 1.37 vs. 30.50 ± 5.6 ; $p < 0.001$) y además, menor incidencia en los PRKO vs. WT (31% vs. 80%; $p < 0.01$). Por otro lado, no se observaron diferencias en el número de células precursoras de oligodendrocitos NG2+, oligodendrocitos CC1+, astrocitos GFAP+, ni células microgliales iba1+ entre C57, PRKO y WT en condiciones basales ni luego de la inducción de EAE. Conclusión: la cepa 129SvxC57BL/6 mostró cierta resistencia a la inducción de EAE. La ausencia del PR no modificó el número de células gliales ni en animales sanos ni enfermos, sin embargo confirió mayor resistencia a la enfermedad. Sugerimos que cambios en la expresión de diferentes receptores esteroideos o de otros factores compensando la falta del PR, podrían tener un rol protector frente a la EAE. Los mecanismos involucrados en las acciones protectoras de la progesterona en EAE resultarían ser más complejos de lo previamente considerado.

498. (559) EVOLUCIÓN DE LA PÉRDIDA DE CONECTIVIDAD NEURONAL Y ESTUDIO DE MARCADORES EPIGÉNÉTICOS EN ESTRUCTURAS CEREBRALES EN EL RATÓN PDAPP-J20, MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Vinuesa, A.¹; Beauquis, J.¹; Sonzogni, S.²; Pomilio, C.¹; Pavia, P.¹; Cánepa, E.²; Saravia, F.¹
 Laboratorio de Neurobiología - IQUIBICEN - FCEyN - UBA / IBYME- CONICET¹ Laboratorio de Biología Molecular - IQUIBICEN - FCEyN - UBA²

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes y constituye la principal causa de demencia. Los cambios cerebrales que ocurren son progresivos y afectan a los diferentes componentes del SNC aunque aún no hay consenso sobre la secuencia de eventos asociados a la vulnerabilidad neuronal y sináptica presente en esta enfermedad. En este trabajo nos propusimos estudiar la evolución temporal de los cambios neuronales en estructuras cerebrales en un modelo animal de la AD en consonancia con potenciales modificaciones epigenéticas. Estudiamos ratones PDAPP-J20 transgénicos (Tg) para la APP humana conteniendo las mutaciones *Swe* e *Ind* (presentes en la AD familiar) y sus hermanos no transgénicos (NTg) de diferentes edades (entre los 5 y los 20 meses (m) de edad). Ya a los 8m, la conectividad sináptica de las neuronas piramidales de CA1 hipocámpales, evaluada mediante densidad de espinas dendríticas por impregnación argéntica de Golgi, se encuentra disminuida en el Tg respecto al NTg ($P < 0.001$). Este cambio se acompaña de una menor densidad óptica de la marca de sinaptofisina en el área de CA3 ($P < 0.01$), detectada por inmunohistoquímica en cortes de vibrátomo conteniendo hipocampo. Adicionalmente se evaluaron los niveles de HP1 γ y H3 diacetilada, marcadores del estado de la cromatina y de la expresión génica global, por WB de homogenatos de distintas estructuras cerebrales. En los Tg de 20m se hallaron niveles aumentados de HP1 γ en la corteza e hipocampo y bajos de H3 diacetilada en corteza, sugiriendo senescencia y retracción de la actividad transcripcional. Concluimos que los cambios que ocurren en distintas regiones cerebrales en este modelo transgénico presentan dinámicas temporales diferentes. El estudio en profundidad de estos cambios permitirá conocer la evolución e interrelación que existe entre las alteraciones cerebrales, necesarias para identificar potenciales blancos terapéuticos.

GENÉTICA 2

499. (40) ESTADO MUTACIONAL Y REARREGLOS DEL GEN IGVH EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA

CRÓNICA. ANÁLISIS COMPARATIVO CON DIFERENTES REGIONES GEOGRÁFICAS

Stanganelli, C.¹; Travella, A.²; Bezares, R.³; Slavutsky, I.²
 Academia Nacional de Medicina¹ IMEX, CONICET-ANMP² Hospital Alvarez³

El estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV) es uno de los principales factores pronóstico en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC), habiendo permitido definir dos grupos de pacientes con diferente evolución clínica: IGVH mutado (M) y no mutado (NM), asociado a mal pronóstico. En este trabajo, evaluamos el estado mutacional de IGHV en 64 pacientes con LLC (33 varones; edad media: 65 años; 73,4% en estadios iniciales). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Se trabajó con cDNA obtenido de células mononucleares de sangre periférica, empleando primers sentido específicos para las familias VH1-VH7 y consenso antisentido JH o C μ . Se efectuó secuenciación de los productos de PCR, utilizando las bases de datos IMGIT/V-QUEST e IgBlast para su análisis. Se consideraron como NM las secuencias con una homología >98% respecto de la línea germinal. Se realizó análisis por FISH con sondas específicas para LLC. El 56,25% de los casos presentaron IGVH M y el 43,75% NM. Un paciente mostró doble rearreglo. La delección 13q14 como única alteración se encontró asociada a LLC-M ($p=0.018$). El análisis de las familias presentó un mayor uso de VH3 (50,8%), seguido por VH1 (24,6%), VH4 (15,4%), VH2 (7,7%) y VH7 (1,5%), mostrando una distribución similar a las series de occidente, con diferencias respecto de Asia y Brasil ($p < 0,03$). VH3 (67%) y VH4 (70%) fueron más frecuentes en LLC-M, en tanto que VH1 se asoció a LLC-NM (81,25%), con diferencias respecto de VH3 ($p=0.002$) y VH4 ($p=0.015$). Los genes IGHV4-34 e IGVH3-21 presentaron baja frecuencia en nuestra cohorte (3,1%) mientras que IGHV2-5 (7,7%) e IGHV4-59 (6,2%) se encontraron sobre-representados respecto de otras series ($p < 0.02$). Estos resultados muestran diferencias y similitudes con estudios de distintas regiones geográficas, sustentando la importancia de los factores genéticos y/o ambientales en la patogénesis de la enfermedad.

500. (87) ANÁLISIS DE LONGITUD TELOMÉRICA EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC). SU CORRELACIÓN CON CITOGENÉTICA, FISH E IGVH

Dos Santos, P.; Panero, J.; Stanganelli, C.; Travella, A.; Slavutsky, I.
 Academia Nacional de Medicina

Los telómeros son regiones de ADN no codificante ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos que desempeñan un papel esencial en la preservación de la integridad cromosómica y la estabilidad genómica. En el presente trabajo se efectuó el análisis de la longitud telomérica (LT) en 26 pacientes con LLC (12 mujeres; edad media: 62,8 años; estadios Rai: 0: 35%; I-II: 45%; III-IV: 20%) y su correlación con las características citogenéticas, FISH y el estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV). Se efectuó extracción de ADN y ARN de células mononucleares de sangre periférica de pacientes y controles. Se analizó la LT mediante TRF (*Terminal Restriction Fragments*) y PCR en tiempo real (qRT-PCR). La evaluación de IGVH se efectuó por RT-PCR y secuenciación. Se realizó estudio citogenético con bandejo G y análisis por FISH con sondas específicas de LLC. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Se observó acortamiento significativo de la LT en los pacientes (qRT-PCR: $6,15 \pm 0,33$ kb; TRF: $6,45 \pm 0,35$ kb) respecto de controles (qRT-PCR: $7,86 \pm 0,53$ kb; TRF: $7,93 \pm 0,11$ kb) ($p=0,01$). Se detectaron telómeros más cortos en los casos con anomalías cromosómicas respecto de aquellos con cariotipo normal ($p=0,028$), así como en los pacientes con trisomía 12 por FISH comparados con los casos con delección 13q14 como única alteración o sin anomalías ($p=0,05$). Si bien no se alcanzaron diferencias significativas, los pacientes con IGHV no mutado ($5,16 \pm 0,97$ kb) mostraron menor LT respecto de aquellos con IGVH mutado ($6,32 \pm 0,44$ kb). Los dos casos con IGVH3-21, asociado a mal pronóstico, presentaron telómeros sustancialmente

cortos (3,04 Kb y 3,77 kb). Nuestros resultados sugieren la utilidad de la LT en combinación con otros marcadores pronóstico para definir en forma más específica la evolución de los pacientes con LLC, pudiendo contribuir a definir grupos con diferentes características biológicas.

501. (271) ANÁLISIS DE EXPRESIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN *CKS1B* EN PACIENTES CON DESÓRDENES A CÉLULAS PLASMÁTICAS. SU CORRELACIONES CON PARÁMETROS CLÍNICOS

Stella, F.¹; Pedrazzini, E.^{1,2}; Baialardo, E.³; Roisman, A.¹; Schutz, N.⁴; Fantl, D.⁴; Slavutsky, I.¹
IMEX, CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ UN-NOBA² Centro de Estudios Genéticos³ Hospital Italiano⁴

La ganancia o amplificación de la región 1q21 es una de las alteraciones más frecuentes en los desórdenes a células plasmáticas. El gen *CKS1B* (1q21) cumple un rol crítico en la progresión del ciclo celular. En este trabajo se analizó la expresión y amplificación del gen *CKS1B* en 107 pacientes con desórdenes a células plasmáticas (47 varones; edad media: 66 años; rango: 24-86 años): 76 con diagnóstico de mieloma múltiple (MM) y 31 con gamapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), y en 15 controles (C). La expresión de *CKS1B* se evaluó por PCR en tiempo real. Se realizó análisis citogenético con bandejo G y FISH con el panel para MM más la sonda *CKS1B/CDKN2C*. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. El 70,3% de los pacientes con MM ($1,7^{E-03} \pm 4,07^{E-04}$) y el 61,2% con MGUS ($1,07^{E-03} \pm 2,2^{E-04}$) mostraron sobre-expresión de *CKS1B* respecto de la media de los C ($1,2^{E-04} \pm 2,9^{E-05}$), con diferencias significativas para MM ($p < 0,02$). La correlación con los parámetros clínicos presentó asociación positiva de la expresión de *CKS1B* con los niveles de proteína M ($p = 0,0002$), calcio sérico ($p = 0,039$) y β_2 Microglobulina ($p = 0,028$), marcador de masa tumoral. En 27 pacientes con MM se efectuó el análisis del número de copias génicas de *CKS1B* por FISH, observándose amplificación (3 o más copias) en el 89% de los casos con alteraciones del cromosoma 1 (C1) respecto del 37,5% de aquellos con cariotipo normal. El análisis de evolución de la enfermedad mostró una menor supervivencia en los pacientes con alteraciones del C1 (17,7 meses) y con amplificación de *CKS1B* (36,5 meses) respecto de aquellos con cariotipo normal y sin amplificación de *CKS1B* (64,1 meses), con diferencias significativas para el primer grupo ($p = 0,0007$). Estos resultados indican la importancia del análisis de las alteraciones del C1 y de la expresión/amplificación de *CKS1B* en MM, y el posible rol de este gen como marcador molecular en esta patología.

502. (356) HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) COMO NUEVO MÉTODO DE DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES G1691A DEL GEN FACTOR V LEIDEN Y C677T DEL GEN METILEN TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR). COMPARACIÓN CON EL MÉTODO DE RFLP

Quintana, S.; Di Gernimo, V.
Laboratorio de Biología Molecular, Fares Taie Instituto de Análisis. Mar del Plata, Argentina.

Existen diversos métodos para la detección de mutaciones puntuales en los genes del Factor V de Leiden (FVL) y MTHFR. La mayoría se basan en el método de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), el cual requiere de una amplificación por PCR, digestión con enzima de restricción y posterior electroforesis en gel de agarosa; ésta última presenta limitaciones. Los nuevos métodos basados en PCR en tiempo real y HRM presentan ventajas con respecto a los métodos clásicos. Es el objetivo de este trabajo determinar la utilidad de la técnica de HRM como método de detección de las mutaciones G1691A del gen FVL y la mutación C677T del gen MTHFR y comparar su sensibilidad y especificidad con la técnica de RFLP. Para la detección de la mutación G1691A del gen FVL se efectuó un ensayo de validación con 43 muestras de ADN de pacientes estudiadas anteriormente mediante RFLP con la enzima de restricción Mnl I; mientras que para la detección de la mutación C677T del gen MTHFR, se efectuó un ensayo con 10 muestras de pacientes genotipificados previamente por RFLP

con la enzima Hinf I. Todas las muestras utilizadas presentaron una concentración de ADN de entre 10 y 50 ng/μl. Las amplificaciones por PCR en Tiempo Real y el análisis por HRM se llevaron a cabo en un Termociclador Rotor Gene 6000 con Evagreen como intercalante fluorescente. Las técnicas desarrolladas mostraron una especificidad y sensibilidad del 100% para la detección de ambas mutaciones. Una ventaja importante del análisis por HRM con respecto al RFLP es que es un método en tubo cerrado lo cual disminuye los riesgos de contaminación, además al no ser un método destructivo, el producto generado puede ser utilizado directamente para su secuenciación. En conclusión, la técnica de HRM presenta varias ventajas como método de detección de la presencia de las mutaciones G1691A del gen FVL y C677T del gen MTHFR, debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez (<1,5 horas).

503. (528) IDENTIFICACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MODULADAS POR *RHBDD2* EN ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO POST-TRANSCRIPCIONAL EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Canzoneri, R.; Lacunza, E.; Abba, M.
Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas CINIBA Fac de Cs Médicas UNLP

El gen Rhomboid Domain Containing 2 (*RHBDD2*) pertenece a la familia Rhoide, representada en humanos por 9 genes, algunos de ellos involucrados en vías de señalización relacionadas al desarrollo, proliferación celular y apoptosis. Recientemente, demostramos que *RHBDD2* se encuentra sobreexpresado y correlaciona con estadios avanzados de carcinomas infiltrantes de mama y metástasis ganglionares. El objetivo de este trabajo fue identificar las vías de señalización celulares moduladas por *RHBDD2*, analizando la respuesta genómica transcripcional asociada a su silenciamiento, en líneas celulares de cáncer de mama. Se recurrió a un modelo de silenciamiento post-transcripcional transitorio, con siRNA en cultivos de las líneas celulares MCF7 y T47D. El ARN total extraído se hibridó con el microarreglo de oligonucleótidos 3D-Gene Human Oligochip 25K. Se efectuó el análisis estadístico de los perfiles de expresión, con el programa MultiExperiment Viewer 4.8. Los resultados se validaron por RT-PCR cuantitativa. Las vías de señalización se identificaron con los programas DAVID 6.7 y STRING 9.0. Se detectaron los niveles de expresión de aproximadamente 25.000 transcritos del genoma humano en nuestro modelo experimental. El análisis estadístico permitió identificar 281 genes comunes a ambas líneas celulares cuya expresión aumenta y 284 genes cuya expresión disminuye significativamente ($p < 0,0001$), en respuesta al silenciamiento de *RHBDD2*. Entre las principales vías de señalización moduladas por *RHBDD2* se encuentran genes relacionados con el ciclo celular, la reparación de daño en el ADN (CDCA8, CDKN3, MLH1, MORF4L1), el proceso apoptótico (TNFSF10, BCL6, IRAK1, AIFM1) y el metabolismo celular (CYC1, AK2, PHB2). Los resultados obtenidos contribuyen y orientan en la definición de futuros ensayos a fin de especificar los procesos celulares en los cuales estaría involucrado el gen *RHBDD2* en el desarrollo del cáncer de mama.

504. (539) ESTUDIO DE LAS METILACIONES EN LOS PROMOTORES DE GENES PANCREÁTICOS Y PLURIPOTENCIALES EN FIBROBLASTOS TRANSFERENCIADOS QUÍMICAMENTE HASTA EL LINAJE PANCREÁTICO

Giménez, C.; Pereyra-Bonnet, F.; Argibay, P.
Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires

En epigenética se considera que un gen con un promotor hipometilado o hipermetilado esta transcripcionalmente activo o inactivo respectivamente. En el resumen 55 de este congreso, reportamos la transdiferenciación (convertir una célula de un linaje a otro sin pasar por pluripotencialidad) de fibroblastos de pacientes con diabetes tipo 1 hasta células tipo pancreáticas que expresan genes como *PDX1* e Insulina (*INS*) usando solo agentes químicos. El objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de metilación de los promotores

de *PDX1*, *INS*, *OCT-4* y *NANOG* en células transdiferenciadas de dos pacientes. Para *PDX1* e *INS* se analizaron dos repeticiones positivas por RT-PCR para cada gen y para *OCT-4* y *NANOG* (genes relacionados a pluripotencialidad) se evaluó la metilación en tres repeticiones por paciente. Para ello se extrajo ADN de los fibroblastos transdiferenciados, se los trató con bisulfito sódico, se amplificaron los promotores de interés por PCR utilizando *primers* específicos y se examinaron los sitios CpG mediante secuenciación. Como control se usaron fibroblastos sin transdiferenciar. En una repetición *INS* positiva se observó que el promotor de *INS* estaba hipometilado en 4 de los 6 sitios CpG analizados y por el contrario en la segunda repetición uno de 5 sitios CpG analizados se encontró hipermetilado respecto a los controles. Para *PDX1* se analizaron 31 sitios CpG, hallándose 10 hipometilados en las dos repeticiones *PDX1* positivas respecto a los controles. En cuanto a los promotores de *OCT4* y *NANOG* no se hallaron diferencias significativas en la metilación de las células transdiferenciadas con respecto a los controles ($P > 0,05$; *t* test). Nuestros resultados indican que (salvo en una de las repeticiones *INS* positiva), los promotores de los genes pancreáticos fueron desmetilados como consecuencia de la reprogramación celular conseguida. Los resultados obtenidos respecto a *OCT4* y *NANOG* potencian la hipótesis de que el destino celular fue hacia el linaje pancreático y no hacia la pluripotencialidad luego de la transdiferenciación. Será necesario analizar un mayor número de casos para establecer el patrón de metilación de los fibroblastos transdiferenciados.

505. (674) RELEVANCIA DE LA TÉCNICA DE MLPA EN EL DIAGNÓSTICO DE UN CASO COMPLEJO DE Distrofia MUSCULAR DE DUCHENNE

Samara, M.¹; Cantarella, F.¹; Moya, G.^{1,2}; López, S.¹; Ferreira, V.¹

Fundación Genos¹ Universidad Católica Argentina²

La Distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500). Es recesiva, ligada al X, con síntomas clínicos progresivos y de evolución fatal. Se produce por mutaciones en el gen de la distrofina (Xp21), principalmente deleciones (70%), menos frecuentemente duplicaciones (20%) y mutaciones puntuales (8 a 10%). El diagnóstico molecular de la patología involucra las técnicas de PCR, segregación de alelos polimórficos (STRs), MLPA (amplificación múltiple de sondas ligadas) y secuenciación directa del gen de la distrofina. Presentamos un caso de una familia con tres afectados fallecidos de quienes no se disponía de material para hacer el análisis. El estudio de STRs mostró que dos hijas de una portadora obligada (mamá de un afectado y hermana de dos) heredaron cromosomas maternos diferentes por lo que una de ellas sería portadora y la otra no. Un estudio indirecto previo realizado en el exterior señalaba a una de ellas como posible portadora (80% de certeza), sin embargo el resultado era poco claro. Ambas mujeres tenían dos hijos cada una (la supuesta portadora, una mujer y un varón sano que heredó de su mamá el X paterno; y la otra, dos mujeres) por lo que cobraba gran importancia poder establecer el estado de portadoras de las mismas. Para resolver el problema se puso a punto la técnica de MLPA la cual evidenció en forma directa una duplicación de los exones 19 al 43 en la portadora obligada, la hija señalada como posible portadora y su hija. La otra hija de la portadora obligada no presentó la duplicación, como era esperado, por lo que sus dos hijas pudieron ser excluidas del riesgo de ser portadoras de la patología. Se quiere demostrar la importancia de la utilización de una estrategia diagnóstica particular mediante el uso conjunto de numerosas técnicas moleculares para la resolución de casos complejos de distrofia muscular de Duchenne, con el objeto de brindar el correcto asesoramiento genético a las familias implicadas.

506. (716) DIFICULTADES EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL DE LOS SÍNDROMES DE PRADER WILLI Y ANGELMAN: MOSAICOS DE TRISOMÍA 15 DE BAJO PORCENTAJE CON RESCATE ISODISÓMICO

Cantarella, F.¹; Samara, M.¹; Moya, G.^{1,2}; Collia, V.¹; López, S.¹; Ferreira, V.¹

Fundación Genos¹ Universidad Católica Argentina²

Los síndromes de Prader-Willi (PWS) y Angelman (AS) se caracterizan por retardo mental y trastornos del crecimiento. Son causados por defectos en la herencia y función de genes distintos pero estrechamente ligados sobre el cromosoma 15 (15q11-q13). Múltiples mecanismos genéticos llevan a PWS o a AS, y todos ellos conllevan la pérdida de expresión imprimeada parental específica de uno o varios genes: deleciones (70%), disomías uniparentales (materna PWS (25%), paterna AS (5%)) o anomalías de imprinting. El principal mecanismo responsable de la disomía uniparental involucra un rescate cromosómico de una concepción trisómica. En algunos casos, la trisomía puede persistir pero es rara en nacidos vivos y es causa de aborto espontáneo en el primer trimestre de embarazo. Sin embargo, mosaicos de trisomía del cromosoma 15 fueron reportados en niños nacidos vivos. Presentamos un caso con trisomía 15 en línea pura en muestra de vellosidades corónicas (semana 13). Una muestra de líquido amniótico de semana 17 resultó 47,XY(+15)[2]/46,XY[28], lo que indicaría un proceso de rescate de la trisomía. Mediante un estudio de segregación de alelos polimórficos en dicha muestra, que mostró aporte biparental, fue posible descartar una heterodisomía uniparental. El asesoramiento genético se dificultó por la imposibilidad de descartar la presencia de isodisomía (baja frecuencia), por lo que se asesoró con bajo riesgo. Luego del nacimiento pretérmino del niño, se lo observa hipotónico y se solicita un nuevo estudio genético. El cariotipo resultó 46,XY[100] y el estudio de STRs mostró una isodisomía uniparental materna lo que determinó el diagnóstico de PWS. Debido a la clínica severa del paciente queda por confirmar la presencia de una línea trisómica remanente (<1%) que no puede ser evidenciada con ninguna de las técnicas disponibles. Es importante el manejo cuidadoso de los casos de diagnóstico prenatal complejo donde existe la presencia de mosaicismo de bajo porcentaje no detectable.

507. (729) COEXISTENCIA DE TRISOMIAS 12, 18 Y 19 EN LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Palau Nagore, M.¹; Travella, A.¹; Stanganelli, C.²; Slavutsky, I.¹

Instituto de Medicina Experimental CONICET Academia Nacional de Medicina¹ Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina²

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en adultos. La trisomía 12 (+12) es una de las alteraciones recurrentes más comunes en LLC (10-30% de los casos), relacionada a morfología atípica y pronóstico intermedio. En un escaso número de pacientes se la observa asociada a trisomías de otros cromosomas. En el presente trabajo se evaluó la coexistencia de las trisomías 12, 18 y 19 en nuestra población de pacientes con LLC. Se analizaron 218 casos, 92 (42,2%) con anomalías cromosómicas (AC), y 126 (57,8%) con cariotipo normal. Se realizó análisis citogenético con bandeó G y FISH con las sondas específicas de LLC: CEP 12, D13S319 (13q14), ATM (11q22) y TP53 (17p13). Se evaluó el estado mutacional de la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGVH*) mediante RT-PCR y secuenciación. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. El análisis de los pacientes con AC mostró un total de 30 casos (32,6%) con +12. Cuatro de ellos (13%) (4 varones; edad media: 62 años; rango: 52-75 años; estadios Rai: II-III) presentaron coexistencia de las trisomías: 12 y 19 [1], y 12, 18 y 19 [3]. Un caso de este último grupo mostró además el marcador: der(1)t(1;4)(q25;q12). En todos ellos se confirmó la trisomía 12 por FISH. En tres casos se evaluó *IGVH*, dos pacientes mostraron *IGVH* mutado (<98 de homología con la línea germinal) y uno fue no mutado (≥98%). Nuestros datos muestran una frecuencia de coexistencia de estas trisomías similar a lo publicado en la literatura (12%). El análisis de los cariotipos indica que las trisomías 18 y 19 son eventos secundarios originados a partir de un proceso de evolución clonal que conferiría ventajas selectivas y proliferativas a estas células. Si bien el número de casos es reducido, nuestros resultados sustentan una posible asociación entre coexistencia de estas trisomías e *IGVH* mutado previamente detectada, que sugeriría un subgrupo diferente de pacientes con LLC.

508. (737) DIAGNÓSTICO MOLECULAR PRENATAL DE X FRÁGIL: EXPERIENCIA EN NUEVE FAMILIAS

Ferreiro, V.¹; Espeche, L.^{1,3}; Cantarella, F.¹; Samara, M.¹; Collia, V.¹; López, S.¹; Moya, G.^{1,2}
Fundación Genos¹ Universidad Católica Argentina² Centro Nacional de Genética Médica. A.N.L.I.S.³

El Síndrome de Cromosoma X Frágil (FraX) es una patología producida por mutaciones en el gen FMR-1 (Xq27.3). Es responsable de alrededor de la mitad de los casos de retardo mental ligado al cromosoma X y la segunda causa de retardo mental después del Síndrome de Down. El diagnóstico molecular de Fra X se realiza habitualmente por una combinación de las técnicas de PCR y Southern Blot (SB). La complejidad del diagnóstico prenatal de familias en riesgo radica en la decisión del momento de toma de muestra en relación al establecimiento del patrón de metilación fisiológico del cromosoma X durante la gestación. Se analizaron mediante la técnica de PCR y/o SB nueve muestras prenatales pertenecientes a familias con antecedentes de mutaciones y premutaciones del gen FMR-1. El estudio molecular permitió 1: Excluir a dos vellosidades coriónicas de sexo masculino y tres de sexo femenino de ser futuros afectados por heredar el alelo materno no expandido. 2: Incluir una vellosidad coriónica de sexo femenino debido a la ausencia de alelo materno normal y presencia sólo de alelo paterno en el estudio de PCR. 3: Incluir a una vellosidad de sexo femenino como portadora de una premutación con 30 repeticiones más que su madre. 4: Incluir como futuro afectado una muestra de líquido amniótico de semana 17 de sexo masculino debido a un resultado negativo por PCR que mostró un patrón de mutación completa por SB. 5: Incluir a una vellosidad coriónica femenina de semana 15 como portadora de del alelo premutado materno por PCR y SB. Ocho gestaciones fueron seguidas a término y una de ellas se encuentra en curso. El estudio molecular prenatal de Fra X resultó una valiosa herramienta para aproximar el diagnóstico en familias con antecedentes de la patología lo que se traduce en un correcto asesoramiento genético a las familias implicadas.

509. (764) TERAPIA IN VITRO CON AMINOGLICÓSIDOS Y PTC124 PARA MUTACIONES NONSENSE EN PACIENTES CON ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AL CROMOSOMA X (ALD-X)

Amorosi, C.¹; Kemp, S.²; Dodelson De Kremer, R.¹; Argaraa, C.³; Oller De Ramírez, A.¹
CEMECO-Hospital de niños de Córdoba¹ Genetic Metabolic Diseases, Academic Medical Center, University of Amsterdam² CIQUIBIC, Departamento de Química Biológica Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba, Argentina.³

La ALD-X (MIM 300100) es una enfermedad neurodegenerativa producida por mutaciones en el gen ABCD1 que causa una disminución en la beta-oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga. Un enfoque terapéutico para pacientes que portan mutaciones nonsense es promover la lectura de los ARNm a través de los codones de terminación prematura (PTC), denominado readthrough, posibilitando la expresión parcial o total de la proteína. Los transcritos con PTC son detectados y degradados por el mecanismo "Nonsense mediated mRNA decay" (NMD). Diversas proteínas participan en esta vía, entre ellas una helicasa de RNA denominada UPF1, esencial en el NMD. Objetivos: Determinar la eficiencia de lectura readthrough de los ARNm a través de los PTC por la administración de aminoglicósidos y PTC124 (Ataluren) en distintas dosis en cultivos de fibroblastos humanos de pacientes con ALD-X. Inhibir directamente el mecanismo NMD mediante downregulation de la proteína UPF1. Materiales y Métodos: Fibroblastos de pacientes con ALD-X* (p.Trp137*, p.Ser290*, p.Arg464* y p.Glu471fs) se trataron con distintas dosis de gentamicina en un rango de 100-800 ug/ml y PTC124 10 ug/ml durante 72 hs. Además se inhibió el mecanismo NMD mediante el uso de siRNA específicos para UPF1. Se realizaron estudios para establecer los niveles de ARNm por RT-PCR real time a nivel basal y post-tratamiento y se analizó la expresión de la proteína PALD mediante western blot. Resultados: Se están desarrollando estudios para analizar si

el NMD afecta los niveles de transcritos ABCD1. No se detectó ningún incremento en la expresión de la proteína PALD en fibroblastos de pacientes con ALD-X luego del tratamiento con PTC124 y gentamicina a todas las dosis y tiempos probados. Conclusiones: Se demuestra que la terapia con aminoglicósidos y/o PTC124 no sería un tratamiento viable para pacientes con ALD-X para las mutaciones analizadas. Esto se podría explicar debido a alguna de las variables que regulan el NMD.

510. (803) FRECUENCIA DIFERENCIAL DE POLIMORFISMOS EN GENES DE CITOQUINAS EN PACIENTES CON SÍNDROMES DE FALLA MEDULAR HIPOPLÁSICA

Bestach, Y.¹; Bengió, R.²; Riccheri, C.³; Flores, M.⁴; Negri Aranguren, P.⁵; Aversa, L.⁶; Watman, N.⁷; Sieza, Y.⁸; Larripa, I.^{1,2}; Belli, C.¹
IMEX-CONICET/ANM¹ IHEMA/ ANM² Htal. "A. Posadas"³ Htal. "C. Durand"⁴ Inst. Privado de Hematología y Hemoterapia⁵ Htal. "R. Gutiérrez"⁶ Htal. "J. M. Ramos Mejía"⁷ Htal. "San Martín", La Plata⁸

La Anemia Aplásica (AA) y los Síndromes Mielodisplásicos hipoplásicos (SMDh) se caracterizan por presentar hipocelularidad medular y citopenias periféricas, resultando difícil el diagnóstico diferencial. Ambas enfermedades podrían compartir características patofisiológicas que involucran la participación de un mecanismo inmune mediado por células T. La mayor producción de las citoquinas pro-inflamatorias Tumor Necrosis Factor (TNF)α e Interferón (IFN)γ induciría respuestas apoptóticas en los precursores hematopoyéticos causando falla medular. Los polimorfismos -308A del gen TNFα y 1349(CA)₁₂ del IFNγ se asocian con su respectiva mayor producción. Se analizaron los polimorfismos -308G/A del gen TNFα (PCR-RFLP) y 1349(CA)_n del IFNγ (PCR-PAGE) en 57 pacientes (45 AA y 12 SMDh) y 99 controles. Las frecuencias genotípicas halladas para el TNFα fueron: 0,50 (A/A+G/A) y 0,50 (G/G) en SMDh vs 0,11 y 0,89 en AA ($p=0.0068$); y vs 0,14 y 0,86 en controles ($p=0.0076$), respectivamente. Mientras que, para el IFNγ fueron: 0,25 (CA₁₂⁻/CA₁₂⁺) y 0,75 (CA₁₂⁺/CA₁₂⁻ + CA₁₂⁻/CA₁₂⁻) en SMDh vs 0,13 y 0,87 en AA ($p=0.3247$); y vs 0,16 y 0,84 en controles ($p=0.3891$), respectivamente. Sin embargo, al comparar la presencia de al menos un genotipo asociado con alta expresión, los pacientes con SMDh mostraron mayor frecuencia (7/12, 58%) tanto al compararlos con la población de AA (10/45, 22%; $p=0.0295$) como con la población control (26/99, 26%; $p=0.0397$). Estos resultados indican que la población de SMDh presenta genotipos de alta producción de citoquinas con mayor frecuencia que las poblaciones de AA y de los controles. Además, sugieren que el TNFα podría promover un estado pro-inflamatorio basal diferencial en el desarrollo de los SMDh, en comparación con la AA. La determinación de los genotipos estudiados podría colaborar a definir mejor estas patologías de fallas medulares hipoplásicas de baja incidencia y contribuir al desarrollo de nuevas terapias inmunomoduladoras.

HEMATOLOGÍA

511. (76) EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC) A DISTINTOS TIEMPOS DE ADMINISTRACIÓN EN RATAS WISTAR CON DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO Y LA DEFORMABILIDAD EROITOCRITRIA
 Crespo, M.¹; Dominighini, A.¹; Beloscar, L.¹; González, J.¹; Crosetti, D.¹; Urli, L.¹; Luquita, A.¹; Ronco, M.²; Monti, J.²; Carnovale, C.²; Wagner, M.³
Cátedra de Biofísica Facultad de Ciencias Médicas UNR1 Cátedra de Fisiología Facultad de Ciencias Bioquímicas UNR2 Cátedra de Farmacobotánica Facultad de Farmacia y Bioquímica UNR3

Lc o "muérdago criollo", su infusión es utilizada en medicina popular para dar mayor fluidez a la sangre disminuyendo el exceso

de colesterol (Co) plasmático. Anteriormente demostramos que ratas tratadas con extracto crudo de Lc por vía intraperitoneal (i.p.), disminuye el Co plasmático y la deformabilidad eritrocitaria. Del extracto crudo se purificó Proantocianidinas (PLc). Objetivo: analizar el efecto del tratamiento a distintos tiempos de administración de PLc sobre la concentración de Co plasmático y la deformabilidad eritrocitaria. (DE). 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 Controles (C) (n=12) inyectadas i.p. con solución fisiológica y Tratadas (T) inyectadas i.p. con PLc 3 mg /100g peso corporal, cada 24 horas durante 3 (n=6) y 7 (n=6) días. Al cuarto día las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal, i.p.), obteniéndose sangre por punción cardíaca. Se determinaron en plasma: Co (por método enzimático de esterasa-oxidasa), CoHDL, y CoLDL. En sangre: Índice de rigidez (IR inversa de DE) por filtración a través de membrana nucleopore y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHbCM) por cálculo a partir de la concentración de Hb y conteo de eritrocitos. Resultados:(media ± ES). Co plasmático(mg%) : C : 121,80 ± 2,21, T₃: 71,56 ± 3,64* T₇: 67,66 ± 1,17*; Co HDL: C : 31,83 ± 0,94; T₃:22,10 ± 2,37* T₇: 28,04 ± 1,89**; CoLDL : C:26,38 ± 0,90;T₃:13,59 ± 1,08* T₇:18,00 ± 0,29* (*p<0,05). IR: C:5,79 ±0,19,T₃: 5,71±0,18^{NS} T₇: 5,68 ±0,14^{NS}. CHbCM : C:32,60± 0,47,T₃: 33,08 ± 1,13^{NS}, T₇: 31,53 ± 0,48^{NS} (ns:no significativo vs. C). Conclusión: El tratamiento con PLc (administrados durante 3 y 7 días) produce un descenso de Co plasmático, Co HDL y CoLDL, sin modificar la DE ni CHbCM en ratas con dieta hipercolesterolémica.

512. (145) EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS REGULADORAS DEL COMPLEMENTO EN ERITROCITOS DE DISTINTAS EDADES

Ensínck, M.; Fiorenza, G.; Rucci, A.; Racca, L.; Biondi, C.; Racca, A.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

Los glóbulos rojos (GR) son protegidos de la lisis mediada por complemento por acción de proteínas reguladoras. CD55 es el factor que inhibe la ruptura de C3 y C5 acelerando el decaimiento de la convertasa C3 y C5. La proteína CD59 inhibe la formación del complejo de ataque a la membrana mediante su unión a C8 y C9. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de estas proteínas en la membrana de GR senescentes (GRSe) y jóvenes (GRJ) por citometría de flujo. 100ul de muestras de sangre entera (n=20) se lavaron con PBS. 50 ul de GR al 0.2% en PBS se incubaron con 10 ul de anti-C59 FITC y 10 ul de anti-CD55 PE. Luego de la incubación se lavaron con PBS y se resuspendieron en el diluyente FACFlow. Se utilizó el citómetro FACSAria II. CD55 se midió en FL2 y CD59 en FL1. Se adquirieron 100.000 eventos. Los datos fueron analizados con el programa FACSDiva. Teniendo en cuenta que FSC representa el tamaño celular y SSC la complejidad celular interna; consideramos que la población de GRSe se encuentra en la zona de < FSC y > SSC, y los GRJ en la región de > FSC y < SSC. Los valores de media aritmética de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD55 para GRSe (1211.0 ± 274.34) son significativamente menores que para GRJ (1395.4 ± 342.18) (p<0.0001) y los valores de media aritmética de la IFM de CD59 para GRSe son significativamente menores (1561.6 ± 415.02) que para GRJ (1742.4 ± 469.98) (p<0.001). Los resultados muestran una disminución en la expresión de estas proteínas reguladoras del complemento, siendo los GRSe más susceptibles a la hemólisis. Estos hallazgos y resultados previos con otros marcadores (IgG, CD47, C3), indican que los mediadores fisiológicos que participan en la senescencia de los GR pueden analizarse por esta metodología sin realizar separación física de las células. La evaluación directa de los GRSe por citometría de flujo, utiliza pequeñas cantidades de muestras y evita las manipulaciones de las técnicas separativas.

513. (174) MODELIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE UNA PROTEÍNA RHD CON EXPRESIÓN ALTERADA DE LOS EPITOPES D

Trucco Boggione, C.; Luján Brajovich, M.; Larroque, A.; Racca, A.; Cotorruelo, C.

Laboratorio de Inmunoematología e Inmunogenética. Área Inmunología. Facultad de Cs Bioq y Farm. UNR.

El antígeno D está constituido por un mosaico de epitopes que se localizan en los dominios extracelulares de la proteína RhD. Los pacientes portadores de variantes cuantitativas no son susceptibles de desarrollar aloanticuerpos anti-D, en cambio los individuos que expresan variaciones cualitativas (ausencia de algunos epitopes) deben ser considerados RhD negativo para transfusiones o embarazos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar a nivel molecular 5 muestras con expresión débil del antígeno D y establecer la estructura 3-D de la proteína RhD mutada. Se determinó el fenotipo Rh completo por hemaglutinación. Se evaluó la expresión del antígeno D con 16 reactivos monoclonales anti-D IgM, IgM/IgG e IgG. Se aplicaron técnicas de PCR SSP para detectar variantes alélicas del gen RHD. Posteriormente se secuenciaron los 10 exones de este gen. Los glóbulos rojos de las 5 muestras presentaron un patrón de reacción con los anticuerpos anti-D que no permitió obtener un mapeo preciso de los epitopes D. El fenotipo Rh completo de todas las muestras fue C-c+E+e+. Los estudios moleculares revelaron un nuevo polimorfismo caracterizado por la mutación puntual 359 C>A en el exón 3 responsable del cambio aminoácido Ala120Asp. Posteriormente se desarrolló un modelo de la estructura 3-D de la proteína RhD utilizando un programa informático que permitió localizar la mutación en el 4° dominio transmembrana. Los resultados obtenidos indican que el alelo RHD(359C>A) origina una variante cuantitativa del antígeno D y muestran una asociación genética entre este nuevo polimorfismo RHD y el alelo RHcE. El cambio de un aminoácido apolar (Ala) por otro cargado (Asp) modificaría el ensamblaje del polipéptido en la membrana eritrocitaria disminuyendo, pero no suprimiendo, la expresión de los epitopes D. Los estudios realizados permiten identificar variantes cuantitativas del antígeno D y resultarían de utilidad para implementar una conducta transfusional u obstétrica adecuada.

514. (176) AUMENTO EN LOS NIVELES DE PRECURSORES DE OSTEÓCLASTOS EN CIRCULACIÓN DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE GAUCHER: POSIBLE IMPLICANCIA EN LA PATOLOGÍA ÓSEA

Mucci, J.1; De Francesco, P.1; Cuello, M.4; Kisinovsky, I.3; Delpino, M.2; Rozenfeld, P.1

Laboratorio de Investigación del Sistema Inmune, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP1 Instituto de Investigación de la Inmunidad Humoral, Fac de Medicina, UBA2 Sanatorio Urquiza, Quilmes3 Servicio de Hematología, Htal de Niños, La Plata4

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. La inflamación es un factor clave en la patogénesis de la EG y se ha descrito un aumento de marcadores de resorción ósea en pacientes. Resultados previos de nuestro grupo mostraron un aumento en la osteoclastogénesis en nuestro modelo *in vitro* de la EG. El objetivo del trabajo es evaluar la presencia de precursores de osteoclastos (PO) en sangre de pacientes con EG y su capacidad de diferenciación a osteoclastos. Se utilizó la citometría de flujo para analizar los PO presentes en PBMC de pacientes y controles en base a la expresión de CD16, CD14 y CD51. Por otro lado PBMC se cultivaron en presencia de M-CSF y se determinó la diferenciación a osteoclastos mediante el conteo de células multinucleadas TRAP positivas. En los sobrenadantes de cultivo de las células se determinaron los niveles de las citoquinas IL-1β, TNF-α e IL-6 mediante ELISA. Los pacientes presentaron un mayor porcentaje de células CD14+ CD16+ (15,7±4 vs 5,3±2,2 %) como también de células CD14+ CD16+ CD51+ (15,4±2,5 vs 11±5,9 %). La diferenciación

a osteoclastos también se vio aumentada aproximadamente 4 veces en pacientes ($p < 0,05$). Las citoquinas en sobrenadantes mostraron una tendencia hacia niveles superiores en pacientes. Como conclusiones demostramos una mayor presencia de PO en circulación en pacientes con EG y su capacidad aumentada de diferenciación a osteoclastos, lo que podría contribuir a los problemas óseos en pacientes. Los niveles aumentados de citoquinas generarían una retroalimentación positiva en el proceso de generación de osteoclastos.

515. (225) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO D EN ERITROCITOS JÓVENES Y SENESCENTES

Luján Brajovich, M.¹; Trucco Boggione, C.¹; Ensinck, M.¹; Racca, L.¹; Biondi, C.¹; Racca, A.¹; Cotorruelo, C.^{1,2}
Laboratorio de Inmunohematología. Area Inmunología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR¹ CONICET²

Diversos cambios biológicos, que en parte involucran polipéptidos de membrana, están implicados en el proceso de senescencia eritrocitaria. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de la proteína RhD en glóbulos rojos (GR) jóvenes (J) y senescentes (Se) por citometría de flujo (CMF) utilizando sangre entera. Se determinó la presencia del antígeno D en suspensiones eritrocitarias por técnicas serológicas de hemaglutinación utilizando anticuerpos monoclonales IgM. En muestras RhD positivo ($n=26$) se analizó la expresión del antígeno D por CMF en los dos grupos etáreos. Las muestras y los controles (GR RhD negativo) se incubaron con anti-D policlonal y luego con anti-IgG humana marcada con Alexa 488 y fueron analizadas con un citómetro FACSAria II. Se adquirieron 100.000 eventos y los datos fueron analizados con el programa FACSDiva. El estudio de las distintas poblaciones etáreas de GR se realizó en base a sus diferentes patrones de dispersión de luz (GRSe: $< FSC$ y $> SSC$; GRJ: $> FSC$ y $< SSC$). El análisis estadístico mostró que la mediana y el rango intercuartil (RI) para la variable media aritmética de la intensidad de fluorescencia media (IFM) asociada a la expresión del antígeno D fue: GRJ: 15130.0, RI: 6641.0; GRSe: 13511.5, RI: 5913.0. Los valores obtenidos son significativamente mayores en los GRJ respecto de los GRSe ($p < 0,0001$, test de Wilcoxon). La disminución de la IFM observada en la población de GRSe indicaría que la proteína RhD participa en la remodelación de la membrana que ocurre en el proceso de senescencia del GR. Las microvesículas formadas durante el envejecimiento eritrocitario podrían contener polipéptidos RhD, explicando en parte la disminución de la expresión del antígeno D observada en los GRSe.

516. (364) TEST DE HAM: PERFIL BLOQUEO Y SU UTILIZACIÓN EN EL MONITOREO TERAPEÚTICO CON ECULIZUMAB

Arcavi, M.^{1,2}; Ceballos, M.^{1,2}; Cantenys, N.^{1,2}; Lardo, M.^{1,2}; Brodsky, A.³; Halperin, N.³; Lazarowski, A.^{1,2}
Facultad de Farmacia y Bioquímica. Hospital de Clínicas. INFIBIOC¹ Departamento de Bioquímica Clínica. Laboratorio de Hematología² División de Hematología, Departamento de Medicina. Hospital de Clínicas³

Introducción: El test de HAM y/o la citometría de flujo (gold standard) permiten diagnosticar hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). Es una enfermedad poco frecuente caracterizada por presentar anemia hemolítica crónica. El tratamiento con eculizumab (anticuerpo monoclonal anti-C5), impide la formación del complejo de ataque a membrana. En el test de HAM los glóbulos rojos (GR) HPN son susceptibles a la lisis frente a suero humano acidificado tanto normal (tubo 2) como del paciente (tubo 6) y se considera positiva cuando hay lisis en ambos tubos. Objetivo: Evaluar con el test de HAM, si los sueros de los pacientes tratados con eculizumab presentan ausencia de lisis de los GR HPN in vitro (tubo 6 negativo), debiendo definir un nuevo resultado en estos casos, y si el seguimiento de los pacientes intratratamiento permite monitorear la respuesta a la droga. Materiales y métodos: En el Hospital de Clínicas (Centro de Referencia para HPN), fueron estudiados 18 pacientes con anemias hemolíticas crónicas, a todos se les realizó citometría de flujo y test de HAM. A los que fueron

tratados con eculizumab se les realizó seguimiento intratratamiento con el test de HAM para evaluar si se producía bloqueo del complemento. Resultados: De 18 pacientes estudiados por citometría de flujo y test de HAM, 10 fueron negativos y 8 positivos. Los pacientes con HPN (salvo uno) recibieron infusiones con eculizumab, 5 respondieron adecuadamente y presentaron lisis de GR HPN en medio ácido frente a suero normal y ausencia de lisis frente a suero del paciente tratado con eculizumab (tubo 2 positivo; tubo 6 negativo, a este resultado lo hemos denominado: "perfil bloqueo". Dos pacientes no respondieron a la administración de la droga y permanecieron con HAM positivo. Conclusiones: El test de HAM presentó perfil bloqueo en los pacientes respondedores al tratamiento con eculizumab y demostró ser una herramienta económica útil para monitorear la eficacia del tratamiento con eculizumab.

517. (383) ALTERACIONES DEL GEN DE ADAMTS13 EN PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA TROMBÓTICA (PTT)

Calderazzo, J.²; Powazniak, Y.³; Paiva, J.¹; Kempfer, A.²; Sanchez-Luceros, A.²; Woods, A.²; Lazzari, M.²
Academia Nacional de Medicina¹ Academia Nacional de Medicina. Inst. de Medicina Experimental (IMEX)²⁻³

Las mutaciones de los genes son responsables de los fenotipos, pero aún apareciendo una mutación, no debería descartarse la contribución que otras mutaciones y polimorfismos ejercen sobre la expresión y función de la ADAMTS13. Presentamos como ejemplo, el genotipo de una PTT sospechada a los 14 años por la presencia de perfil clínico y de 33% (valor normal $< 15\%$) de multímeros extragrandes (ULVWF) que permitió el diagnóstico preliminar. A los veintitrés años se le detectó actividad (act) de 3% (valor normal = 40-130%) de ADAMTS13 por ELISA cromogénico VWF-73; 7 U/ml de anticuerpos IgG anti-ADAMTS13 (positivo > 15 U/ml) y 44% de ULVWF. Todos los exones (29) y los límites exón-intrón del gen se amplificaron y secuenciaron automáticamente. Se identificaron los siguientes SNPs: C88T (-357C> T), C19T, C582T, 686+4 T> G, C1342G, C1852G, en estado de homocigosis y 3045-41 G> A, 3045-48 T C>, G3108A en estado de heterocigosis. Además, se identificaron un nuevo SNP/mutación T3718G en el exón 27 y una delección de un solo nucleótido guanina (4050delG) en el exón 28, en heterocigosis. La madre tenía 51% de act y ausencia de ULVWF. Además se identificaron todos los SNPs, pero en estado de heterocigosis, la misma delección en el exón 28, pero el SNP/mutación en el exón 27 no fue detectado. El hermano con 71% de act, presenta la delección y tampoco presenta el SNP/mutación del exón 27. Otros autores (Plaimauer, 2006) observaron que la expresión in vitro del SNP C1852G condujo a una reducción de la secreción (27%) y de la act (14%), y que la combinación de SNPs C19T, C1342G y C1852G causó una disminución moderada en su act (32%) lo que indicaría que no serían responsables de la deficiencia de ADAMTS13 del paciente. Un punto de partida en el análisis del gen de ADAMTS13 del paciente, es la evaluación del papel potencial en el desarrollo de la deficiencia de ADAMTS13 de los SNPs homocigotas solos (excluidos C19T, C1342G y C1852G) o en combinación con otros SNPs o mutaciones.

518. (632) LACTOBACILLUS RHAMNOSUS CRL1505 ACELARA LA RECUPERACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES EN UN MODELO DE INMUNOSUPRESIÓN POR CICLOFOSFAMIDA

Herrera, M.¹; Villena, J.¹; Salva, S.³; Barbieri, N.¹; Alvarez, S.^{1,2}
Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA-CONICET¹ Fac. Bioq. Qca. y Fcia. UNT² INQUINOA-CONICET³

En este trabajo se estudió, en un modelo experimental de inmunosupresión por ciclofosfamida (CF), el efecto de diferentes tratamientos preventivos con *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 (Lr) sobre la recuperación de la mielopoyesis y su manifestación en sangre periférica. Para ello se evaluó número y actividad de células mieloides en médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y fluido peritoneal (FP). Distintos grupos de ratones albino-suizos fueron tratados con Lr (10^8 cél/día/ratón) por vía nasal (LrN) u oral (LrO) durante 2 y 5d respectivamente. Después de cada tratamiento,

estos ratones y controles sin tratar (C), recibieron una inyección intraperitoneal de CF (150mg/Kg). Antes de la inyección de CF (d0) y a diferentes tiempos post-inyección se estudió: en MO y SP número total y diferencial de células y actividad peroxidasa (Px) y actividad fagocítica en macrófagos peritoneales. La CF redujo la celularidad en MO, afectando pool mitótico y post-mitótico de la serie mieloide y nro de células Px+. Los tratamientos con Lr recuperaron la celularidad en MO (d7: C=5,8±1,8; LrO=17,4±3,4; LrN=15,6±2 10⁶cél/fémur) con significativo incremento ($P<0,05$) del pool mitótico y células Px+ (d7: C=1,4±0,1; LrO=11,2±0,5; LrN=9,5±1 10⁶cél/fémur). La CF indujo además una marcada leucopenia y neutropenia. Los grupos tratados con Lr mostraron una recuperación más temprana del nro de neutrófilos y células Px+ que el C (d6 neutrófilos: C=0,6±0,01; LrO=2,8±0,05; LrN=1,1±0,02; Px+: C=0,3±0,03; LrO=2,2±0,05; LrN=0,8±0,04 10⁹ células/l) ($P<0,05$). Además, Lr mejoró significativamente con respecto al control la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales afectados por la CF (d7: C=59±2%; LrO=78±3%; LrN=76±4%) ($P<0,05$). El tratamiento preventivo con Lr indujo un incremento de células mieloideas inmaduras, lo que permitió una temprana recuperación de la población mieloide cuando se produjo la inmunosupresión con CF. La vía oral sería más efectiva que la nasal para lograr este propósito.

519. (713) FRECUENCIA DEL CROMOSOMA PHILADELPHIA (PH⁺) VARIANTE, ALTERACIONES CROMOSÓMICAS CLONALES ATÍPICAS Y SU IMPLICANCIA CLÍNICA EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC). Gutiérrez, L.¹; Mercado Guzmán, Z.¹; Noriega, M.²; Icardi, G.²; Larripa, I.¹

IMEX-Academia Nacional de Medicina¹ I.I.Hema, Academia Nacional Medicina, Bs As.²

La LMC se caracteriza por la presencia del cromosoma Ph⁺ producto de la t(9;22)(q34;q11), originando el gen de fusión *BCR/ABL1*. Dicha alteración citogenética se observa en la mayoría de los casos, mientras que las variantes se encuentran en un 3-10%. Durante la evolución de la enfermedad se pueden observar alteraciones cromosómicas adicionales siendo las más típicas: +8, +Ph⁺, i(17q). En el presente estudio se evaluaron muestras de 154 pacientes ingresadas a nuestro laboratorio durante los últimos 3 años (64 casos al diagnóstico y 90 en control de tratamiento). El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la frecuencia de translocaciones variantes así como la presencia de alteraciones cromosómicas atípicas durante la evolución clonal y su respuesta al tratamiento. En el 3,25% de los casos (5/154) se observó la presencia de un cromosoma Ph⁺ variante que involucró las regiones cromosómicas: 2p23, 7q22, 13q31, 15q11 y 21p21 (las dos últimas no reportadas hasta el momento). En 8/90 casos en seguimiento (8,9%) se observó evolución clonal; en 5/8 (62,5%) se detectaron alteraciones citogenéticas adicionales típicas y en 3/8 (37,5%) alteraciones citogenéticas atípicas tales como: t(1;7)(q10;p10), t(1;11)(q23;q23) y dup(19)(p13), no consensuadas en la literatura. La frecuencia de Ph⁺ variante y los puntos de ruptura 2p23, 7q22 y 13q31 en nuestra población concuerdan con los datos publicados en la literatura, indicando que estas regiones cromosómicas son más propensas a rupturas y/o reordenamientos genómicos. El pronóstico y respuesta al tratamiento en los pacientes con Ph⁺ variante fue similar a lo observado en los casos con la translocación clásica. En cuanto a los que presentaron aberraciones clonales, ya sean típicas o atípicas, se observó progresión de enfermedad con resistencia al tratamiento, indicando la importancia de los estudios citogenéticos en el correcto seguimiento del paciente.

INMUNOLOGÍA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS 4

520. (143) CAMBIOS EN LOS NIVELES DE LINFOCITOS TCD4+ NAIVE EN RELACIÓN CON LA ADHERENCIA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN NIÑOS INFECTADOS POR HIV

Barrionuevo Vago, M., Urteneche, M., Simonte, K., Barboni, G., Candi, M., Gaddi, E., Balbaryski, J.
Hospital Pedro de Elizalde

El curso clínico-inmunológico de la infección por HIV se ha modificado sustancialmente por acción de la terapia antirretroviral combinada (TARV), teniendo como premisa básica la correcta adherencia al tratamiento. **Material y métodos.** En 28 niños infectados con HIV por transmisión vertical se midieron los niveles de carga viral plasmática (CV) (Nuclisens NASBA, Biomerieux), y de los LTCD4 y las subpoblaciones naive (N) y memoria (M) mediante citometría de flujo (FACSscalibur BD) y anticuerpos monoclonales específicos CD45, CD45RA, CD14, CD62L y CD4. Las determinaciones fueron realizadas antes y luego de 9 meses, en promedio, del inicio del TARV. Los niños fueron evaluados clínicamente en ambos momentos del seguimiento, monitoreando además su adherencia al tratamiento. **Resultados.** En 18 de los 28 niños (64%) se comprobó una correcta adherencia $\geq 95\%$ (grupo A) mientras que en los 10 restantes (36%), la misma fue inferior a dicho valor (grupo B). En el grupo A se observó entre los momentos inicial(i) y final(f) del seguimiento un aumento significativo ($P<0,05$) en los porcentajes de LTCD4 (M±DS) (i: 12.1±7.7, f: 20.5± 8.3) y un descenso en los niveles de CV (log)(CVi: 4.26±1.29, CVf: 2.23± 0.60). Dentro de este grupo, 9 de 18 pacientes alcanzaron niveles no detectables de CV, observándose un aumento significativo ($P<0,05$) entre los porcentajes (i) y (f) de células T naive: Ni: 24.8±11.9, Nf: 52.5±17.2. Los 9 pacientes restantes, que disminuyeron la CV pero mantuvieron niveles detectables, no mostraron cambios significativos en las células naive. Ninguno de los parámetros ensayados mostró diferencias significativas entre los momentos (i) y (f) en los niños del grupo B. **Conclusión.** El aumento en el porcentaje de células naive luego de un período variable de aplicación correcta del TARV se relacionaría a la supresión de la replicación viral y al reestablecimiento de una dinámica celular T normal en el contexto de una timopoyesis más eficiente que en el adulto.

521. (168) RESPUESTA A LA VACUNACIÓN PARA EL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB) EN TRABAJADORES DE LA SALUD Y SU PERSISTENCIA

Salomone, A.^{1,2,3}, Cabello, C.⁴, Stanganelli, C.^{1,3}, Aloisi, N.^{1,2}, Bar, P.^{1,2,3}, Ferrario, C.⁴, Fink, S.³
Academia Nacional de Medicina¹ I.Hema² IMEX CONICET³
Hospital de Niños P. Elizalde⁴

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial. Para controlar su transmisión se cuenta con una vacuna basada en el antígeno de superficie del virus (HBs). El título de anticuerpos (Acs) anti-HBs, que correlaciona con la protección, se evalúa a los 30 días de la tercera dosis. La población general se considera protegida con títulos >10 mUI/mL. Como el riesgo de infección es mayor en trabajadores de la salud (TS), muchos sugieren que adquieran títulos >100 mUI/mL. El objetivo de este trabajo fue evaluar la protección contra el VHB en TS voluntarios con esquema de vacunación completo, pertenecientes a dos instituciones de la ciudad de Buenos Aires, midiendo el título de Acs anti-HBs. Los TS participantes firmaron un consentimiento informado. Este estudio fue aprobado por los comités de Ética de ambos centros. Los niveles séricos de Acs anti-HBs se evaluaron por ensayo inmuno-enzimático (ANTI-HBs, RADIM) en 97 individuos (72 mujeres y 25 hombres, de 25 a 69 años). Se clasificaron los resultados según los títulos obtenidos en tres grupos: G1: <10 mUI/mL, G2: 10-100 mUI/mL y G3: >100 mUI/mL. Del total de los casos analizados el 82,5% presenta título >10 mUI/mL, siendo 17,5% del G1, 22,7% del G2 y 59,8% del G3. El porcentaje de hombres en el G1 es mayor que en mujeres (16% vs 7%). En la literatura está descrita una tasa de no respondedores (NR) (<10 mUI/mL luego de 2 ciclos de vacunación) del 5-20%. En nuestro caso G1 es el 17,5%, y se reevaluará luego de un segundo ciclo de vacunación para definir los NR. Los títulos decrecen con el tiempo post-vacunación (<5 años vs >5 años, $p<0,05$). Estos resultados, que podrían hacerse extensivos a un mayor número de centros de salud, confirman que en nuestro ambiente de trabajo la mayoría de los TS están protegidos contra el VHB mediante la vacunación.

522. (224) SUBPOBLACIONES DE LTCD8 EN NIÑOS HIV (+) CON DIFERENTE GRADO DE INMUNODEPRESIÓN Y NIVEL DE REPLICACIÓN VIRAL

Simonte, K., Urteneche, M., Barboni, G., Candi, M., Barbaryski, J., Gaddi, E.
Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

El incremento de LTCD8 en el curso de la infección por HIV es mantenido por el balance entre diferentes subsets caracterizados por la expresión de distintos marcadores de superficie. CD28 actúa como señal coestimuladora, CD38 está asociada con la activación celular, mientras que CD57 se expresa en células efectoras, confiriéndoles además, una menor capacidad proliferativa frente a una estimulación antigénica repetida. **Material y métodos.** En 63 niños HIV (+) en tratamiento antirretroviral (TARV) y con distinto grado de inmunodepresión, 23 grupo A (CD4<15%), 40 grupo B (CD4>25%), se evaluaron los niveles de los subsets LTCD8 naïve (N), pre-efectores (E), senescentes (S) y activados (A). Se utilizó citometría de flujo y anticuerpos monoclonales específicos. Todos los pacientes fueron evaluados clínicamente y se les determinó la carga viral (CV). Las mismas determinaciones se realizaron en un grupo control (Co) de 15 niños sanos. **Resultados.** Los niveles porcentuales (M±DS) de LTCD8 (N) CD28+CD57- se encontraron significativamente disminuidos (P<0.05) entre los niños de los grupos A y B, y frente al Co (A: 28.2±12 vs B: 61.8±12.8 vs Co: 79.9±2.1). LTCD8 (E) CD28-CD57- y LTCD8 (S) CD28-CD57+, presentaron aumentos significativos: los LTCD8 (E) entre los tres grupos, (A: 50.8±14.0 vs B: 21.9±9.5 vs Co: 10.4±1), mientras que los LTCD8 (S) sólo frente al Co, (A: 17.9±9.3 vs Co: 8.2±1.4, B: 13.2±10.0 vs Co: 8.2±1.4). En 15 niños del grupo A con CV elevada, los LTCD8 (A) presentaron niveles porcentuales y de intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD38 significativamente aumentados ((CD8+CD38+: 94.3±3.9, IMF CD38: 320.6±108.5), frente a 29 niños del grupo B con CV no detectable, (CD8+CD38+: 79.8±4.6, IMF CD38: 112.3±34.7). **Conclusión.** La normalización cuali-cuantitativa de las distintas subpoblaciones de LTCD8 se relacionaría a la menor activación inmune asociada al control de la replicación viral por acción del TARV.

523. (362) LA ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA T PRODUCTORA DE INTERFERÓN-GAMMA EN BOVINOS VACUNADOS REQUIERE DE PARTÍCULAS ENTERAS (140S) DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Bucafusco, D.^{1,2}, Di Giacomio, S.¹, Pega, J.^{1,2}, Capozzo, A.^{1,2}, Pérez Filgueira, D.^{1,2}
Instituto de Virología INTA¹ CONICET²

Con el objetivo de establecer parámetros complementarios de protección homóloga y heteróloga contra el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) se ha estudiado la correlación entre niveles séricos de interferón-gamma (IFN-g) medidos por ELISA en sangre estimulada con VFA y protección a la infección experimental en 194 bovinos vacunados y 114 no vacunados. En este trabajo estudiamos la importancia de la integridad de la cápside viral tanto para inducir la respuesta celular como para estimularla *ex vivo*. En un primer experimento se estimuló sangre proveniente de 8 bovinos multivacunados con partículas completas (140S) de VFA de los serotipos A24 y O1Campos inactivado y purificado mediante gradiente de sacarosa; o bien con partículas 12S obtenidas por tratamiento térmico. La estimulación con partículas 12S disminuyó significativamente la capacidad de ambos virus de estimular la producción de IFN-g (p<0.05 respecto de O1 Campos 140S, p<0.01 para A24). Esta disminución no se debió a degradación proteica ya que las subunidades 12S conservaron intactas las proteínas capsidales (evaluadas por ELISA y SDS-PAGE). La cinética de desestabilización fue diferente para ambas cepas. Luego de 24 hs a 37°C se mantuvieron el 54 % de las partículas 140S de A24 y solo el 20% de las de O1Campos. Estas características intrínsecas de cada cepa de VFA se verificaron en pruebas con bovinos inmunizados con vacunas monovalentes para O1campos (n=16) y A24 (n=10) en las cuales los niveles de IFN-g detectados pos estimulación con A24 fueron significativamente mayores a los de O1Campos para ambas vacunas (p<0.05), incluso cuando la masa antigénica de las vacunas de O1 Campos duplicaban la de A24. Demostramos que la integridad de la cápside de VFA es necesaria para el montado de la respuesta celular contra el

VFA, lo que influye además en la inducción de inmunidad celular cruzada. Es necesaria la utilización de viriones completos en las estimulaciones *in vitro* previo al dosaje de IFN-g por ELISA.

524. (588) INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA A SUBUNIDADES CONTRA LA NEOSPOROSIS BOVINA FORMULADA CON UN ADYUVANTE VEGETAL

Mansilla, F.¹, Czepluch, W.¹, Valle, F.³, Mazzola, L.², Hecker, Y.², Moore, P.², Capozzo, A.¹
Instituto de Virología - INTA Castelar¹ Estación Experimental Agropecuaria - INTA - Balcarce, Buenos Aires, Argentina² Tecnovax S.A. Luis Viale 2835, 1416. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.³

Las inmunidad protectora contra la neosporosis está mediada por células T-CD4+ activadas productoras de IFN-g, además de anticuerpos (Ab) específicos. Este perfil de respuesta y protección (100%) lo observamos en ratones inmunizados con 0,4µg de extracto soluble de taquizoitos (sNcAg) formulado en adyuvante nanoparticulado de lecitina de soja (Providean-AVEC®). En este trabajo se realizó un estudio dosis-respuesta en 4 grupos de 3 bovinos inmunizados con dos dosis (cada 30 días) de 0,10, 50 ó 100µg de sNcAg /Providean-AVEC®. La cinética de producción de Ab fue dosis-dependiente. Los bovinos primovacunados con 50 y 100µg de sNcAg desarrollaron Ab específicos a los 21 dpv (superiores al punto de corte del ELISA, p<0,05). Los Ab alcanzaron niveles máximos a los 30 dpv para todas las formulaciones (p<0.01) y no aumentaron con la segunda dosis. El principal isotipo inducido fue IgG1. La producción sistémica de IFN-g fue máxima luego de la segunda dosis (43-50 dpv) en los grupos vacunados con 50 y 100µg, alcanzando valores promedio de 34±7.8 ng/ml. En todos los grupos (10, 50, 100µg) las células T sanguíneas proliferaron frente a sNcAg a los 50 dpv, y en el grupo de 50µg el 10,5% de las células T activadas producían IFN-g siendo el 65.5% CD4+. Estos valores fueron similares al placebo en el grupo de 10µg (p>0.05). Los niveles de linfoproliferación se mantuvieron pero el porcentaje de células T-CD4+ activadas por sNcAg en bovinos vacunados con dosis altas disminuyó levemente hacia los 140 dpv (siendo superior al control sin tratar, p<0.05). Los resultados muestran que la utilización de una vacuna conteniendo 50µg de sNcAg formulada con Providean-AVEC® induce la respuesta inmune relacionada con protección contra el parásito. La posibilidad de modificar el perfil y magnitud de la respuesta celular con la dosis de antígeno y aplicaciones de la vacuna, permitirán establecer el esquema de inmunización más adecuado para la prevención del aborto bovino.

525. (693) DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA EL DIRECCIONAMIENTO DE ANTIGENOS DERIVADOS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA A CÉLULAS DENDRÍTICAS EN TEJIDOS DE MUCOSAS DE BOVINO

Stafforini, G.^{1,2}, Bucafusco, D.^{1,2}, Pega, J.^{1,2}, Di Giacomo, S.¹, Pérez Filgueira, M.^{1,2}
Instituto de Virología, CICVyA, INTA¹ CONICET²

El objetivo de este trabajo es generar estrategias que permitan aumentar la capacidad inmunogénica de antígenos recombinantes mediante su direccionamiento a células dendríticas (DC) bovinas, usando como modelo al virus de la Fiebre Aftosa (VFA). Para ello, se generaron construcciones fusionando la secuencia de un anticuerpo de cadena única (scFv) con especificidad por el receptor CD205 de la superficie de DC (cc98) a la de un antígeno quimérico derivado del VFA O1 Campos que reúne varios epitopes B y T descriptos (cc98-agVFA) y 2 controles: el antígeno sin direccionar (agVFA) o fusionado a un scFv no relacionado (3G4-agVFA). Para permitir la expresión de estas construcciones en la mucosa respiratoria de bovinos, portal natural de entrada del VFA, se produjeron adenovirus no replicativos que, tras ser inhalados, puedan expresar localmente las proteínas quiméricas y así promover respuestas específicas locales. Primeramente, se produjo y purificó la proteína quimérica agVFA en células de mamífero. Se verificó: 1) el reconocimiento de la proteína agVFA por sueros policlonales contra VFA y 2) la funcionalidad de los epitopes T incluidos mediante un ensayo de ELISPOT IFN-γ con PBMC provenientes de animales

vacunados. Además se expresó el antígeno direccionado (cc98-agVFA) y se comprobó la funcionalidad del scFv cc98 a través de su pegada a células transfectadas con el CD205 de bovino. Además, se verificó la expresión de todas las construcciones por ensayo de inmunoperoxidasa en células 293A transfectadas con plásmidos de expresión eucariota portando los genes quiméricos, empleando un AcM contra una secuencia FLAG C-terminal y sueros policlonales de conejo contra el VFA O1Campos. Por último, se generaron los adenovirus correspondientes y se verificó su capacidad de estimular la producción de estas proteínas en células infectadas. Actualmente se está trabajando en el escalado de los adenovirus recombinantes previo a las pruebas de infección en bovinos naïve.

526. (202) PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DE RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES (RRP) EN LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS TH17-INDUCIDAS POR M. TUBERCULOSIS EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE A DROGAS

Basile, J.¹, Romero, M.¹, Sabio Y García, C.¹, Ritacco, V.², García, A.³, Vescovo, M.³, Palmero, D.³, De Casado, G.³, Sasiain, M.¹, De La Barrera, S.¹
 IMEX-CONICET¹ Micobacterias ANLIS Malbrán² Neumología Hospital Muñiz, Buenos Aires, Argentina³

Previamente demostramos que las cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes a drogas más prevalentes en Argentina, denominadas M y Ra, son capaces de inducir un fuerte respuesta Th17 en pacientes con MDR-TB mediante la expansión principal de la subpoblación T IL17⁺IFN- γ . Sin embargo, se observó una baja respuesta Th17 en individuos sanos PPD+ (N) siendo la subpoblación T IL17⁺IFN- γ la más relevante. En este trabajo se evaluó la participación de RRP pertenecientes a las familias TLR, RLC y CD14 en la expansión diferencial de ambas subpoblaciones de células T productoras de IL17. CMSP de 5 N y 5 MDR-TB se cultivaron con Ra, M, o H37Rv por 48 hr en presencia/ausencia de Ac neutralizantes contra TLR-2, TLR-4, MR, Dectin-1 (Dec1) y CD14. Seguidamente, se determinó la expresión de IL17 e IFN- γ mediante citometría de flujo y los resultados se expresaron como % de células IL-17⁺IFN- γ para la población T CD4⁺. **Resultados:** 1) N: el % de células IL-17⁺IFN- γ y de IL-17⁺IFN- γ se redujo solamente por efecto de anti-Dec1 ($p < 0.05$) independiente de la cepa de *Mtb* ensayada. 2) MDR-TB: anti-Dec1 disminuyó marcadamente el % de células T IL-17⁺IFN- γ e IL-17⁺IFN- γ sin tener en cuenta la cepa ($p < 0.05$). Además, los bloqueos de TLR-2 y TLR-4 redujeron el % de células T IL-17⁺IFN- γ inducido por H37Rv y M ($p < 0.05$). **Conclusión:** Estos resultados preliminares sugieren que, independientemente de la cepa, Dec1 es el RRP mayormente involucrado en la respuesta total Th17 inducida por *Mtb*. Además, en paciente MDR-TB, TLR2 y TLR4 podrían amplificar y dirigir esta respuesta hacia un fenotipo IL-17⁺IFN- γ .

527. (216) ESTIMULACIÓN IN VITRO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (MN) Y POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS (PMN) DE PACIENTES TUBERCULOSOS (TB) CON BACTERIAS ACTINOMYCETALES INACTIVADAS

Siffredi, V.¹, Carradoni, J.¹, Orieta, D.¹, Vogué, C.², Enzinck, A.³, Fiorenza, G.³, Dlugovitzky, D.¹
 Sección inmunología. Cat. Microbiología. Fac. Ciencias Médicas. U.N.R¹ Servicio de Neumología. Hospital I. Carrasco. Rosario² Laboratorio Turner³

Se estudió el efecto de la estimulación in vitro de células MN y PMN de pacientes TB con bacterias Actinomycetales inactivadas (*M. obuense*, *M. vaccae*, *Dietzia maris*, *Rhodococcus coprophilus*, *Tsukamurella inchonensis*) a fin de lograr una activación celular in vitro y trasladar a posteriori estos efectos in vivo para obtener una respuesta más efectiva en pacientes con TB activa y TB-HIV. Estallido respiratorio (ER) de MN y PMN de sangre periférica de pacientes TB no tratados y niveles de IL17 en sobrenadante de cultivo (s.c) celular. Se estudiaron 25 PTB (HIV-), ambos sexos, 38±13.5 años. Se tomó una muestra de 25ml de sangre heparinizada para exámenes inmunológicos. Se separaron a través de

un gradiente de Ficol-Triyosom MN de la interfase y PMN previa incubación con NH4Cl (reactivo lisis). Se colocaron en los tubos Basal 250 μ l de MN y PMN (5x106 células/ml) sin estímulo y en los tubos estimulados se agregó 5 μ l Mtb inactivado (9x108 Bacterias/ml) y 5 μ l de las diferentes suspensiones de las bacterias inactivadas (40 μ g/ml). Los tubos se incubaron 18 horas a 37°C en 5% CO₂ y se separaron los s.c. en tubos Eppendorf y se conservaron a -30° C. En las suspensiones de MN y PMN en RPMI 1640 se determinó ER y % de células estimuladas con Phorbol Myristate Acetate por Citometría de Flujo (FACs Calibur). Índice Oxidativo R (expresión de ER: IFM Células estimuladas/ IFM basal (IFM:intensidad de fluorescencia media). Se evaluaron los niveles de IL17 en s.c utilizando el método de ELISA (R&D Systems). El Índice Oxidativo R fue superior en las células PMN y MN estimulas con *Tsukamurella inchonensis* y *M. vaccae*. RPMN+ *M. obuense*: 3.37±0.46; R PMN+*Rhodococcus*. 3.15±0.31; PMN+ *Tzucarella*: 5.25±3.61; RPMN + *M. vaccae* :±5.0 ±2.2; PMN+ Mtb: 2.62± 0.37; Basal: 2 ±0.50. *Tsukarella* vs Basal $P < 0.05$; *M. vaccae* vs Basal $p < 0.05$. *Tsukamurella inchonensis* y *M. vaccae* son capaces de estimular in Vitro el ER en PMN y MN de pacientes tuberculosos y la producción de IL17 en s.c celular.

528. (481) MODELADO DE LA SEÑALIZACIÓN DE CD137 DURANTE LA RESPUESTA INMUNE HUMANA A M. TUBERCULOSIS UTILIZANDO UN ENFOQUE BAYESIANO

Fernández Do Porto, D.¹, Auzmendi, J.¹, Peña, D.³, García, V.³, Moffatt, L.¹
 INQUIMAE Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA¹ IQUIBICEN, UBA-CONICET³

La estadística bayesiana puede ser utilizada para sintetizar el conocimiento actual sobre un proceso biológico en modelos matemáticos. La distribución a priori de los parámetros que gobiernan dichos modelos se obtiene a partir de datos experimentales y consideraciones teóricas presentes en la literatura. Usualmente los modelos matemáticos se desarrollan con el objetivo de responder problemas biológicos que no se pueden abordar experimentalmente, pero no para obtener mayor información sobre los experimentos. En este sentido, estos modelos han sido utilizados para explorar diversos aspectos de la respuesta inmunológica frente a *Mycobacterium tuberculosis*, pero en ninguno de dichos trabajos se hace foco en las moléculas de coestimulación. Varias proteínas de señalización modulan el nivel y patrón de citoquinas producidas por las células inmunes luego de la estimulación antigénica con *M. tuberculosis*. En particular nosotros demostramos el rol clave de CD137 en la tuberculosis humana. En el presente trabajo hemos construido un modelo bayesiano computacional con el objetivo de reproducir una serie de resultados previos acerca del rol de CD137 durante la respuesta inmune humana frente a *M. tuberculosis*. Este modelo nos permitió predecir distintas variables no observadas experimentalmente y obtener la estimación máxima a posteriori de los parámetros. Utilizando dicha estimación, se pudieron predecir los perfiles cinéticos de la expresión del receptor en distintas células inmunes estimuladas in vitro con lisados de *M. tuberculosis*. Las simulaciones predicen un escenario complejo donde los efectos de la señalización de CD137 sobre los niveles de TNF- α e IFN- γ dependen del patrón temporal de la respuesta. El factor de Bayes provee evidencia substancial ($K=6.19$, 7.92dB) en favor de un modelo que predice la señalización directa las células T por CD137 sobre un modelo que depende de la apoptosis mediada por TNF- α .

529. (593) MECANISMOS QUE REGULAN LA ABUNDANCIA DE MONOCITOS CD16+ EN EL LÍQUIDO PLEURAL TUBERCULOSO

Balboa, L.¹, Musella, R.², Castagnino, J.², Palmero, D.², Moraña, E.², Casado, G.², Alemán, M.¹, Sasiain, M.¹
 IMEX-CONICET¹ Servicio de Neumología, Hospital Muñiz²

Durante infecciones crónicas como la Tuberculosis (TB), el pool de células dendríticas y macrófagos tisulares es renovado

mediante el reclutamiento de progenitores mieloides y monocitos (Mo). Previamente determinamos que el porcentaje de Mo CD16⁺ es mayor en el líquido pleural (LP) que en sangre periférica (SP) en pacientes con TB, por lo tanto el objetivo de este trabajo es determinar los mecanismos que regulan la composición de las poblaciones de Mo en el sitio de infección, empleando LP como reflejo del proceso infeccioso en curso. Para ello, aislamos las poblaciones de Mo de SP mediante separación magnética y las cultivamos con *M. tuberculosis* irradiado (*Mtb*) evaluando la inducción de muerte celular según la unión de Anexina-V-FITC. Para evaluar la capacidad diferencial de migración, incubamos Mo en cámaras *Transwell* empleando el medio libre de células del LP como agente quimioattractante. Además, determinamos la expresión de receptores de quemoquinas mediante marcación con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos y citometría de flujo. Encontramos que *Mtb* indujo niveles similares de apoptosis en ambas poblaciones de Mo. Por otro lado, los Mo CD16⁺ mostraron una menor actividad migratoria inducida por los factores presentes en el LP ($p < 0.05$) a pesar de contar con una alta expresión de los receptores de quemoquinas que regulan el tráfico al foco inflamatorio (CCR2, CCR1 y CCR5). Finalmente, factores solubles del LP indujeron la expresión de CD16 en Mo CD16⁺ ($p < 0.05$). Por lo tanto, la muerte inducida tras el encuentro con la bacteria no es determinante de la abundancia relativa de las poblaciones de Mo, mientras que la migración de los Mo CD16⁺ y posterior adquisición *in situ* del marcador CD16 contribuyen a aumentar el pool de Mo CD16⁺ en el sitio de infección de pacientes con TB. La adquisición de CD16 en el sitio de infección estaría asociada a un proceso de diferenciación y no sería útil para discriminar entre las poblaciones de Mo originarias.

530. (621) FUNCIONALIDAD DISMINUIDA DE LT CITOTÓXICOS MTB-ESPECÍFICOS E INCREMENTO DE LA MISMA POR EL TRATAMIENTO IN VITRO CON DHEA EN INDIVIDUOS COINFECTADOS CON TUBERCULOSIS Y HIV

Suárez, G.¹, Angerami, M.¹, Ameri, D.³, Kahn, P.³, Sued, O.², Bottasso, O.⁴, Quiroga, M.¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, Fac. de Medicina, UBA¹ Fundación Huésped, Buenos Aires, Argentina² División Infectología, Hospital General de Agudos "Dr. J. A. Fernández", Buenos Aires, Argentina³ Instituto de Inmunología, Fac. de Ciencias Médicas, UNR, Rosario, Argentina⁴

La tuberculosis (TB) es la primera causa de muerte en pacientes HIV+. La hormona adrenal DHEA puede modular ciertas alteraciones inmunológicas presentes en estos pacientes. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos (LTC) contribuyen a la inmunidad contra *M. tuberculosis* (*Mtb*) a través de la secreción de IFN γ y de la lisis de macrófagos infectados y bacterias. En el presente trabajo estudiamos la funcionalidad de los LTC en individuos coinfectados con HIV y TB (HIV-TB) y su modulación por DHEA utilizando muestras de sangre de pacientes HIV-TB ($n=17$, CD4: 5-895cel/ul) y de dadores sanos (DS, $n=9$). Evaluamos la degranulación citotóxica por detección de CD107 y la producción de IFN γ en LT CD8+ por citometría de flujo y su modulación por re-exposición *in vitro* a *Mtb* (10 $\mu\text{g/ml}$) con o sin DHEA (10⁻⁷ y 10⁻⁸ M). En pacientes HIV-TB también determinamos el recuento de CD4 y la carga viral. La exposición a *Mtb* tuvo efectos marcadamente diferentes en los dos grupos tanto en el % de LT CD8+/CD107+ como en el de CD8+/IFN γ + (interacción $p < 0,01$ two way ANOVA). Más aún, *Mtb* incrementó ambos parámetros en DS ($p < 0,05$ Student test) pero no en pacientes HIV-TB, aunque la respuesta a otros estímulos se mantuvo en estos últimos (CD3+CD28: $p < 0,005$ two way ANOVA; CEF: $p < 0,01$ Friedman test seguido de Dunn's MC test). La incubación con DHEA (10⁻⁷ M) y *Mtb* incrementó el % de LT CD8+/CD107+ y CD8+/IFN γ + comparados con *Mtb*, respecto de los niveles basales, en individuos HIV-TB con recuento de CD4 mayor a 100cel/ul ($p < 0,01$ Wilcoxon test). Notablemente, el incremento en el % de células CD8+/CD107+ inducido por la hormona correlacionó positivamente con el recuento de CD4 en estos pacientes, aún teniendo en cuenta a aquellos con bajo

CD4 ($p < 0,05$; r de Pearson: 0,53). Los resultados muestran una capacidad citotóxica disminuida de los LT CD8+ *Mtb*-específicos en pacientes HIV-TB y que la exposición a DHEA puede revertir ello al menos parcialmente, posiblemente a través de su acción sobre los LT CD4+.

531. (647) PARTICIPACIÓN DEL INHIBIDOR DE SERINO PROTEASAS LEUCOCITARIO (SLPI) EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS HUMANA

Pellegrini, J.¹, Tateosian, N.², Hernandez Del Pino, R.¹³, Alvarez, I.¹⁴, Musella, R.⁵, Saab, M.⁵, Palmero, D.⁵, García, V.¹⁴, Chuluyan, H.²
Departamento de Química Biológica. FCEN. UBA¹ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), UBA-CONICET, Buenos Aires. Argentina² Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales. UNNOBA. Buenos Aires, Argentina.³ Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales IQUIBICEN. UBA-CONICET⁴ División Tisioneumonología, Hospital de Infecciosas Dr. Francisco J. Muñiz. Buenos Aires, Argentina⁵

El Inhibidor de Serino Proteasas Leucocitario (SLPI) posee actividad antimicrobiana e inhibe la producción de IFN- γ , una citoquina crucial en la protección contra *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con tuberculosis (TB) presentan mayores niveles de SLPI frente a la estimulación con un sonicado de *Mtb* H37Rv que los dadores sanos (DS). El objetivo del presente trabajo fue profundizar acerca del rol del SLPI en la fisiopatología de la TB humana investigando la relación entre este inhibidor de serino-proteasas, el IFN- γ y receptores que modulan la secreción de citoquinas. Para ello, CMSP de pacientes con TB y DS fueron estimuladas con *Mtb* en presencia o ausencia de SLPI recombinante durante diferentes tiempos y se analizó la proliferación celular (incorporación de timidina tritiada) y la expresión de moléculas coestimuladoras y del receptor de IFN- γ (IFN- γ R) mediante citometría de flujo o qRT-PCR. Asimismo, en diferentes experimentos, CMSP de TB y DS fueron estimuladas con *Mtb* \pm anticuerpo bloqueante para PD-1 (receptor de muerte programada-1) y se analizaron los niveles de SLPI (ELISA). Observamos que frente a *Mtb*, el SLPI disminuyó significativamente la proliferación celular, la producción de IFN- γ , la expresión de los co-estimuladores PD-1 y SLAM (molécula linfocitaria activadora de señales) en DS pero no en TB. Además, la estimulación a través de PD-1 en células estimuladas con *Mtb* redujo significativamente los niveles de SLPI sólo en DS. También detectamos que frente a *Mtb*, el SLPI incrementó significativamente la expresión del IFN- γ R en DS pero no en TB. En conjunto, estos resultados sugieren que los pacientes con TB serían refractarios a la acción del SLPI. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p < .05$. Los protocolos mencionados fueron aprobados por el comité de bioética del Hospital Muñiz.

532. (704) ESTUDIO DE ANTÍGENOS DE M. TUBERCULOSIS COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN LATENTE

Peña, D.¹², Alvarez, I.¹², Rovetta, A.¹², Hernández Del Pino, R.¹⁴, Musella, R.³, Frías, A.³, Visca, M.³, Saab, M.³, Palmero, D.³, Chuluyán, H.⁵, García, V.¹²
Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA¹ Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales IQUIBICEN UBA-CONICET² División Tisioneumonología. Hospital de infecciosas F.J. Muñiz. Buenos Aires, Argentina³ Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales. UNNOBA. Buenos Aires, Argentina⁴ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), Universidad de Buenos Aires, CONICET⁵

Aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), y estos individuos con tuberculosis latente (TBL) constituyen el principal reservorio

bacteriano. El diagnóstico de TBL por liberación de IFN- γ frente a antígenos específicos de *Mtb* no distingue entre TBL y enfermedad activa (TB). Es así importante identificar antígenos de *Mtb* inductores de respuestas inmunes diferenciales en TBL para mejorar el diagnóstico. A fin de identificar antígenos de *Mtb* que diferencien entre TB, TBL y dadores sanos (DS), estudiamos la expresión de IFN- γ e IL-17 y moléculas coestimuladoras (ICOS, SLAM y PD-1) frente a los antígenos Rv2626c, HspX, ESAT-6 y CFP-10, por ELISA y citometría de flujo. Ante el antígeno Rv2626c, los individuos TBL aumentaron significativamente la producción de IFN- γ comparando con los TB y DS. Asimismo, en TBL la estimulación con Rv2626c, HspX o CFP10 produjo un aumento significativo en el número de linfocitos CD3⁺IFN- γ ⁺. Más aún, el porcentaje de células productoras de IFN- γ inducido por Rv2626c fue significativamente mayor en TBL que en TB y que en DS. Rv2626c también incrementó significativamente la expresión de ICOS, SLAM y PD-1 en TBL, pero sólo los niveles de ICOS en TB, no aumentando los porcentajes de las moléculas coestimuladoras mencionadas en DS. Además, el estudio preliminar de las células simple o doble positivas para IFN- γ e IL-17 en respuesta a Rv2626c mostró marcadas diferencias entre los tres grupos de individuos en estudios. Estos resultados sugieren que el análisis combinado de la producción de citoquinas y la expresión de moléculas coestimuladoras frente a antígenos específicos de *Mtb* podría utilizarse para identificar TBL y diferenciar de enfermedad activa. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p < 0.05$. Los protocolos mencionados fueron aprobados por el comité de bioética del Hospital Muñiz.

533. (769) EFECTO DE AISLADOS CLÍNICOS LOCALES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN CÉLULAS DE EPITELIO PULMONAR

Laborde, E.¹, Landoni, V.¹, Balboa, L.¹, Schierloh, P.¹, López, B.², Barrera, L.², Ritacco, V.², Sasiain, M.¹
 IMEX - CONICET, Academia Nacional de Medicina¹ ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"²

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) ingresa por vía respiratoria y es la interacción del patógeno con las células del epitelio pulmonar lo que desencadena el inicio de la respuesta inflamatoria local, el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección y la liberación de mediadores solubles que determinarán el curso de la respuesta inmune adaptativa. Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de distintas cepas de *Mtb* sobre células del epitelio pulmonar, así como la contribución de éstas células en el desarrollo de la respuesta inflamatoria local. Para ello, células A549 fueron estimuladas durante 24h con cepas provenientes de distintos aislados clínicos (familia LAM y Haarlem) y con la cepa de referencia H37Rv. Luego se agregaron neutrófilos (PMN) al cultivo y se evaluó por microscopía, la adhesión de PMN al epitelio y la inducción de citotoxicidad mediada por PMN a 3h y 18h respectivamente. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con *Mtb* induce una mayor sensibilidad a la toxicidad mediada por PMN respecto al control sin tratar, observándose máxima toxicidad con las cepas H37Rv y Ra (familia LAM) ($p < 0.05$). En línea con éstos resultados, observamos que las cepas H37RV y Ra, inducen mayor porcentaje de adhesión de PMN ($p < 0.05$). Sin embargo, sólo la cepa Ra induce un mayor número de PMN adheridos por célula epitelial ($p < 0.05$). Evaluamos además la secreción de quimioquinas y citoquinas por A549 tratadas. Resultados preliminares indican que los aislados clínicos de *Mtb*, modulan de manera diferencial la producción de mediadores inflamatorios en éstas células. Asimismo, observamos un aumento en la secreción de IL-8 e IL-1b en los cocultivos con PMN ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren un rol central del epitelio pulmonar en el inicio de la respuesta inflamatoria local y refuerzan la idea de que las variaciones genéticas del patógeno son capaces de modular el perfil de la misma.

534. (804) NIVELES PLASMÁTICOS DE HORMONAS DEL EJE HIPOTALAMO -PITUITARIO-ADRENAL (HPA) Y DE PARÁMETROS DE LA RESPUESTA INMUNE

DURANTE EL TRATAMIENTO ESPECÍFICO EN TUBERCULOSIS PULMONAR (TB)

Díaz, A.¹, D'Attilio, L.¹, Santucci, N.¹, Bongiovanni, B.¹, Dídoli, G.¹, Lioi, S.², Massoni, C.², Danille, S.², Radcliffe, S.², Baravalle, V.³, Brandan, N.⁴, Nannini, L.⁴, Bottasso, O.¹, Bay, M.¹

Instituto de Inmunología. Universidad Nacional de Rosario¹ Laboratorio Central Hospital del Centenario, Rosario.² Centro de Salud Tío Rolo, Municipalidad de Rosario.³ Servicio de Neumonología Hospital Escuela Eva Perón, Granadero Baigorria.⁴

Previamente demostramos que al momento del diagnóstico de TB (T0), tanto los pacientes como sus convivientes (HHC) mostraban menores niveles plasmáticos de DHEA respecto a controles sanos (HCo), mientras que los de cortisol sólo se encontraban aumentados en TB. Dada la interacción bidireccional del eje HPA y la respuesta inmune desencadenada, se analizaron las modificaciones producidas en la respuesta inmunoendocrina desde T0, durante el tratamiento específico [meses 2 (T2), 4 (T4) y 6 (T6)] y tres meses luego de finalizado (T9). Los niveles de DHEA, DHEAS y Cortisol plasmáticos se cuantificaron por EIA competitivo y los séricos por Electroquimioluminiscencia (EQ). Los valores séricos de DHEAS, disminuidos en T0, respecto de HCo, aumentaron durante el tratamiento (T0 vs. T9, $p < 0.05$); mientras que los de Cortisol, elevados al T0, disminuyeron al T9 ($p < 0.05$). En T0 se vio un incremento en la Relación Cortisol/DHEAS respecto de HCo y HHC ($p < 0.05$), valores que descendieron a partir del T6. La cuantificación de las hormonas por EIA y EQ mostró correlación significativa ($p < 0.001$). En cuanto a los parámetros inmunológicos, al T0, los niveles plasmáticos de IFN- γ aumentados con respecto a HCo y a HHC ($p < 0.001$), no difirieron de estos a partir de T4. IL-6 y Proteína C Reactiva, mostraron un comportamiento similar. Al diagnóstico, los % de LTCD4 y LTCD8 estaban disminuidos, mientras que a T9 sólo los LTCD4 alcanzaron valores similares a aquellos de HCo. En cambio los % de LTreg, elevados a T2, disminuyeron a partir del 4 mes de tratamiento. En cuanto al índice de masa corporal (BMI) al T0 los pacientes presentaron valores disminuidos y si bien estos aumentaron con el tratamiento específico (T0 vs. T9 $p < 0.001$) no alcanzaron los valores de los HCo y HHC. La mejoría clínica del paciente observada durante el tratamiento se ve acompañada por modificaciones en los parámetros inmunoendocrinos que podrían contribuir al monitoreo de la misma.

535. (809) NIVELES PLASMÁTICOS DE ADRENALINA, NORADRENALINA Y DOPAMINA EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y CONVIVIENTES INTIMOS

Dattilio, L.¹, Bongiovanni, B.¹, Díaz, A.¹, Santucci, N.¹, Dídoli, G.¹, Besedovsky, H.², Del Rey, A.², Bottasso, O.¹, Bay, M.¹

Instituto de Inmunología. Facultad de Cs. Médicas. UNR¹ Department of Immunophysiology, Institute of Physiology and Pathophysiology, Marburg, Germany²

La tuberculosis pulmonar (TB) se muestra como una infección crónica y progresiva representando uno de los principales problemas de salud pública. En trabajos previos observamos que los pacientes con TB severa presentaban una marcada disregulación del eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA), con elevados niveles plasmáticos de Cortisol y marcada disminución en los de DHEA, con el consecuente aumento de la relación cortisol/DHEA que se correlacionó con el deterioro de la respuesta inmune específica. Llamativamente, los convivientes de pacientes bacilíferos (HHC) también presentaron una importante disminución en los niveles de DHEA. La interacción bidireccional entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis y los principales sistemas de comunicación involucrados son el HPA y el sistema nervioso simpático (SNS). A fin de visualizar la participación del SNS durante la respuesta inmune anti-TB se cuantificaron los niveles plasmáticos de Adrenalina (A), Noradrenalina (NA) y Dopamina (DA) por HPLC en voluntarios sanos (HCo), HHC y pacientes con TB desde el momento del diagnóstico

(T0), durante el tratamiento específico (T2, T4, T6) y a los 3 meses de finalizado el mismo (T9). Los niveles plasmáticos de A y NA no difirieron entre los diferentes grupos de estudio, mientras que los de DA aumentaron tanto en los pacientes con TB al T0 ($p < 0,0005$) como en HHC ($p < 0,003$) respecto de HCo. Los pacientes con TB pulmonar avanzada fueron los que presentaron los niveles más elevados de DA. Si bien, durante el tratamiento anti-TB (T2, T4, T6) y en T9 los parámetros inmunoendócrinos (niveles de citocinas proinflamatorias y esteroides adrenales) alcanzaron valores similares a los de los HCo, los niveles de DA se mantuvieron elevados. Las modificaciones observadas en los niveles de catecolaminas ponen de manifiesto un rol activo del SNS, que debe profundizarse a fin de elucidar su contribución en la fisiopatogenia de la TB.

536. (707) EFECTOS DE HONGOS DERMATOFITOS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DE LANGERHANS MURINAS XS106

Burstein, V., Masih, D., Chiapello, L.

Dpto de Bioquímica Clínica, Fac. de Cs Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. CIBICI-CONICET

Trichophyton rubrum y *Microsporum canis* son los principales hongos dermatofitos causantes de micosis cutáneas que afectan entre un 20% y 25% de la población mundial. Las células de Langerhans (LC) son las células dendríticas de la epidermis que captan antígenos y pueden inducir la respuesta adaptativa. Se desconoce los efectos de los dermatofitos sobre la activación de las LC y su impacto en la inmunidad específica antifúngica. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de hifas de *T. rubrum* y *M. canis* sobre la expresión de moléculas de superficie y la producción de citoquinas en la línea celular XS106. Se expandió la línea celular XS106 derivada de LC de epidermis de ratones A/J neonatos (donadas por A. Takashima, Ohio, USA) en RPMI suplementado con GM-CSF y CSF-1. Se obtuvieron hifas de *T. rubrum* y *M. canis* luego de 5 días de cultivo a 28° C en agitación en RPMI con polimixina B. Las hifas fueron lavadas, liofilizadas, pesadas y resuspendidas a 1 mg/ml. Análisis de las LC por citometría de flujo demostró que luego de 24 hs de cultivo con hifas de *T. rubrum* (50 µg), las LC (5×10^5) incrementaron la intensidad de fluorescencia media de CD80 ($p < 0,002$) y el porcentaje de expresión de CD40 y CD207, respecto a las LC en medio solo ($p < 0,01$ y $p < 0,05$). Efectos similares se observaron con *M. canis*. Por otra parte, la detección de citoquinas por ELISA de captura en sobrenadantes demostró que luego de 48 hs de cultivo, *T. rubrum* (10, 50 y 100 µg) indujo un incremento significativo, dosis dependiente, en la producción de IL-6 por LC respecto a los controles ($p < 0,01$; $p < 0,02$ y $p < 0,0007$). Además, *M. canis* estimuló la producción de IL-6 con 100 µg ($p < 0,006$) y la síntesis de IL-10 en forma dosis dependiente (10, 50 y 100 µg), respecto a las LC en medio solo ($p < 0,03$; $p < 0,002$ y $p < 0,01$). Ambas especies indujeron un incremento en los niveles de IL-12 sin modificar la producción de TGF-β. Estos resultados sugieren que los dermatofitos modulan la activación de las células de Langerhans.

537. (730) CANDIDIASIS VULVOVAGINAL: RESPUESTA INMUNE LOCAL Y CONTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR INNATO TLR2

Miró, M., Icely, P., Cejas, H., Sotomayor, C.

CIBICI - CONICET, Universidad Nacional de Córdoba

Candida albicans es un comensal habitual de las superficies mucosas y el mayor agente causal de la candidiasis vulvovaginal (CVV). La incidencia de la patología es alta y afecta aproximadamente al 75% de las mujeres al menos una vez en su vida. El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un modelo de CVV que permita la evaluación de interacciones tempranas entre *C. albicans* y los mecanismos inmunes locales. Hembras C57Bl/6 (WT) y deficientes en el receptor innato TLR2 (KO) se trataron con estradiol los días (D) -6, -3, 2, 4, y se infectaron intravaginalmente con $5 \cdot 10^6$ *C. albicans* ATCC 36801 (D0) o sólo se trataron con estradiol (controles). En los D2, 4 y 8 se obtuvo lavado vaginal (LV) a fin de evaluar presencia y tipo de células en el exudado, carga fúngica (recuento de UFC), niveles de IL-6, IL-1β, TNFα y TGFβ (ELISA), y de las vaginas se hicieron cortes de

tejido para estudios histológicos (PAS). La infección perduró hasta el D8. Se observó crecimiento fúngico sobre células epiteliales y presencia de neutrófilos en LV. Los cortes histológicos mostraron engrosamiento y cornificación del epitelio vaginal, gran cantidad de hifas y levaduras en lumen y células epiteliales superficiales, y microabscesos intraepiteliales (D2, D4, D8). Las hembras WT exhibieron UFC máximas el D4, niveles aumentados de IL-6 (D8) y disminución de IL-1β (D4, D8) comparado con sus controles ($p < 0,05$). En hembras TLR2 KO las UFC máximas se observaron el D2 y la IL-6 (D2, D4, D8) y la IL-1β (D4, D8) aumentaron respecto a sus controles ($p < 0,05$). La infección presentó diferentes perfiles entre ratones WT y TLR2 KO (D2 y D4) ($p < 0,05$). El modelo de CVV desarrollado reproduce la patología humana y permite su aplicación al estudio de mecanismos inmunes locales y de susceptibilidad del huésped. Mientras que a nivel sistémico el rol de TLR2 está asociado a mecanismos protectores, a nivel intravaginal la activación del mismo no sería relevante en el control del proceso infeccioso.

538. (821) NEUROCARDIASIS: DIMORFISMO SEXUAL EN LA RESPUESTA INMUNE LOCAL Y PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN

Mayol, G., Figueredo, C., Peralta Ramos, J., Mir, M., Cejas, H., Icely, P., Sotomayor, C.

CIBICI - CONICET, Universidad Nacional de Córdoba

La infección cerebral por *Candida albicans* es una patología frecuente en neonatos e inmunocomprometidos. El objetivo de este trabajo fue evaluar a nivel cerebral los mediadores inmunes que contribuyen a la homeostasis local en animales machos y hembras, la pérdida de este equilibrio debido a la presencia del hongo y la evolución de la infección. Ratones C57BL/6 machos y hembras se infectaron por vía iv con $2,5 \times 10^6$ *C. albicans* ATCC 36801 y a 12, 24, 48 y 72h se pesaron (evaluando Índice de Peso Corporal) y sus cerebros, hígados y riñones se removieron para evaluar: peso del órgano, carga fúngica (UFC), cambios histológicos y la producción intracerebral de citoquinas (ELISA). A las 24, 48 y 72h se observó reducción del IPC en las hembras ($p < 0,05$); la colonización renal fue máxima a 24h en ambos grupos, mientras que en hígado los perfiles fueron diferentes. Interesantemente los niveles constitutivos de mediadores antiinflamatorios (TGFβ e IL-10) e inflamatorios (IL-6, IL-1β y TNFα) presentaron diferencias entre sexos. Los niveles basales de TGFβ, IL-6 y TNFα fueron mayores en hembras ($p < 0,05$). A las 12h de la inoculación el hongo fue recuperado del cerebro y en los cortes histológicos se observó presencia de hifas de *C. albicans* y ausencia de infiltrado inflamatorio; los niveles intracerebrales de IL-6, IL-1β y TNFα aumentaron respecto a los valores basales ($p < 0,05$) y la producción local de TNFα mostró la mayor diferencia entre grupos (machos=245pg/g vs hembras=192pg/g). El estudio cinético del balance pro vs antiinflamatorio para las distintas citoquina reveló un perfil claramente distinto. A las 72h este balance estuvo exacerbado en las hembras y correlacionó con la presencia de micro y macroabscesos. Este trabajo demuestra la existencia en cerebro de un balance de mediadores inmunes diferentes en machos y hembras y la capacidad de este órgano de generar una respuesta diferenciada en el tiempo dependiente del sexo del huésped en respuesta a la infección.

INMUNOLOGÍA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS 5

539. (719) LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS CRL1505 MODULA BENEFICIOSAMENTE LA RESPUESTA INMUNE RESPIRATORIA MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE TLR3

Villena, J.^{1,2}, Chiba, E.², Tomosada, Y.², Salva, S.³, Marranzino, G.¹, Kitazawa, H.², Alvarez, S.¹

Centro de Referencia para lactobacilos¹ Food Immunology Group, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Japan² INQUINOVA-CONICET³

La administración oral de *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 (Lr) aumenta la resistencia contra patógenos respiratorios bacte-

rianos. En este trabajo, evaluamos si Lr puede modular beneficiosamente la inmunidad antiviral en el tracto respiratorio de ratones BALB/c desafiados intranasalmente con poly(I:C); teniendo en cuenta que este análogo sintético de ARN doble catenarío induce alteraciones pulmonares similares a las provocadas por el Virus Sincicial Respiratorio. Los ratones fueron tratados por vía oral con Lr (10^8 céls/ratón/día) durante 5d. El d6 los ratones recibieron por vía intranasal tres dosis diarias de poly(I:C) (250 µg/ratón). Ratones sin tratamiento con Lr y desafiados con poly(I:C) se usaron como controles. Poly(I:C) indujo incremento de neutrófilos y macrófagos en pulmón y de TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-8, y MCP-1 en suero y fluido bronco-alveolar (BAL). Además, poly(I:C) incrementó la albúmina (Alb) y la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en BAL, indicando aumento de la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar y daño pulmonar. La administración preventiva de Lr indujo un aumento significativo en la producción de IFN- γ , IFN- β e IL-6 con reducción de Alb, LDH, TNF- α e IL-8 en BAL comparado con los controles. Además, los niveles de IL-10 en BAL fueron mayores en los ratones tratados con Lr ($P < 0,01$). También se observó que Lr indujo un aumento del número de células T CD4+IFN- γ + y de células dendríticas CD103+ y CD11b+ en pulmón ($P < 0,05$), así como de los niveles de expresión de MHC-II e IL-12 en dichas células. Lr, administrado por vía oral, es capaz de modular beneficiosamente la respuesta inflamatoria desencadenada por la activación de TLR3 en el tracto respiratorio. Esta cepa podría regular el equilibrio entre mediadores pro-inflamatorios e IL-10, permitiendo una respuesta inflamatoria eficaz contra infecciones virales y evitando el daño pulmonar.

540. (200) RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN Y APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS HUMANOS EN RESPUESTA A AISLADOS CLÍNICOS DE MTB PREVALENTES EN ARGENTINA

Romero, M.¹, Basile, J.¹, Lopez, B.², Ritacco, V.², De La Barrera, S.¹, Barrera, L.², Sasiain, M.¹, Alemán, M.¹
 IMEX-CONICET Academia Nacional de Medicina¹ Mico-
 bacterias ANLIS Malbran²

El influxo de neutrófilos (PMN) al pulmón es uno de los primeros eventos en la patogénesis de la tuberculosis (TB). La activación seguida de apoptosis de los PMN involucra intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) y p38. Anteriormente mostramos una mayor inducción de ROS por el aislado clínico de *Mtb* Ra (linaje LAM) con respecto al aislado M (linaje Haarlem) ambos resistentes a drogas y prevalentes en Argentina. Dado que existiría un efecto cooperativo entre TLR2 y el receptor de β -glucanos (presentes en hongos) dectin-1 sobre la activación de p38 y Syk y la generación de ROS, nuestro objetivo fue evaluar los receptores involucrados y la participación de los α -glucanos en la generación de ROS/apoptosis, ya que representan el 80% de los polisacáridos de la pared del *Mtb* y unirían sitios de lectina como los β -glucanos. Resultados: ROS, medido como oxidación de ¹²³dihidrorodamina (DHR), correlacionó con la apoptosis ($p < 0,02$) medido por unión a Anexina V. Tanto el estallido respiratorio como la apoptosis inducidos por Ra, se anularon bloqueando TLR2, dectin-1 o empleando laminarina, como así también al inhibir Syk o p38. La activación de p38 y Syk fue inducida por Ra ($p < 0,02$) y no por M. Determinamos que Ra indujo la formación de *lipid rafts* (evaluada por citometría de flujo y microscopía) ($p < 0,0001$) mecanismo que estaría mediado por TLR2 ($p < 0,0001$). Al eliminar los α -glucanos enzimáticamente de Ra (^{Enz}Ra), no indujo ROS ni apoptosis ($p < 0,001$) pero no perdió la capacidad de inducir *lipid rafts* ni de producir IL-8 (medido por ELISA). El estímulo previo con ^{Enz}Ra no mejoró el ROS generado por M, sugiriendo fallas en la interacción con dectin-1. Además, M indujo poca IL8 ($p < 0,001$) con respecto a Ra, lo que sugiere fallas en la interacción con TLR2. La generación de ROS/apoptosis por *Mtb* dependería de TLR2 y dectin-1/Syk, por lo que diferencias en la composición de la pared representaría un mecanismo de evasión al afectar la interacción con dichos receptores.

541. (560) DISTINTOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE MICROARN EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR Y PLEURAL

Spinelli, S.¹, Diaz, A.¹, D'Attilio, L.¹, Marchesini, M.², Bogue, C.², Bay, M.¹, Bottasso, O.¹
 Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas,
 UNR¹ Hospital Intendente Carrasco, Rosario.²

Diversas líneas de evidencia demuestran que los microRNAs (miRNAs) juegan un papel importante en las interacciones huésped-patógeno. En este estudio se investigaron los perfiles de expresión de varios miRNAs, la mayoría de ellos involucrados en la regulación de respuestas inflamatorias, en pacientes con tuberculosis. A fin de vislumbrar los acontecimientos que ocurren en el sitio de la infección y a nivel sistémico, se emplearon células mononucleares obtenidas de fluidos pleurales (CMF, n=7) y de sangre periférica (CMP, n=23), estas últimas provenientes tanto de pacientes con tuberculosis pleural como pulmonar. Llamativamente, encontramos que el perfil de expresión de dichos miARNs es diferente en cada compartimiento, con una fuerte represión de miR-223, miR-144 * y miR-421 en células provenientes de fluidos pleurales ($p < 0,05$). Además, se observó que la expresión del miR-146a también está reprimida en los pacientes con tuberculosis, tanto en CMPs como CMFs ($p < 0,05$); mientras que los niveles de miR-424 sólo se vieron elevados en los compartimientos periféricos. Asimismo se constató que la expresión sistémica de estos miRNAs vuelve a valores normales durante el tratamiento específico y dichos cambios se asocian con los niveles de IL-6, una citoquina que desempeña un papel relevante en la inmunopatología de la tuberculosis. Los presentes resultados aportan nuevos elementos a la intrincada red de interacciones que subyace en la inmunopatogénesis de la tuberculosis.

542. (642) COLABORACIÓN DE LINFOCITOS TH9 EN LA PROTECCIÓN CONTRA LA INFECCIÓN POR M. TUBERCULOSIS

Alvarez, I.¹², Rovetta, A.¹², Peña, D.¹², Pasquinelli, V.¹³, Musella, R.⁴, Castagnino, J.⁴, Palmero, D.⁴, Barnes, P.⁵, Samten, B.⁵, García, V.¹²
 Departamento de Química Biológica. FCEN. UBA¹ Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)² Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales. UNNOBA. Buenos Aires, Argentina.³ División Tisiopneumología. Hospital de infecciones F.J. Muñiz. Buenos Aires, Argentina.⁴ Center for Pulmonary and Infectious Diseases Control. University of Texas at Tyler. United States.⁵

La respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) requiere la generación de respuestas de linfocitos Th1, pero la producción de IFN- γ no es suficiente para erradicar la infección, sugiriendo que otras citoquinas participarían en los mecanismos de defensa contra el patógeno. Poco se conoce del rol de la IL-9 en la tuberculosis (TB), citoquina producida por la población de células efectoras Th9. Así, en este trabajo estudiamos la potencial participación de la IL-9 en la respuesta inmune frente *Mtb*. Para ello, células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB y de dadores sanos fueron estimuladas con un sonocado de *Mtb* H37Rv, en presencia o ausencia de IL-9 recombinante y se analizó la producción de citoquinas, la expresión de factores de transcripción y de moléculas de superficie, por ELISA, qRTPCR o citometría de flujo. Nuestros resultados demostraron que *Mtb* induce células Th9 y que la IL-9 promueve la producción de IFN- γ por linfocitos T CD4 previniendo la apoptosis ocasionada por el antígeno. Observamos que *Mtb* induce en la mayoría de las células productoras de IFN- γ , un fenotipo IFN- γ /IL-9R⁺, sugiriendo un mecanismo de acción directo de la IL-9 sobre las células productoras de esta citoquina. Asimismo, detectamos que la IL-9 previene el efecto inhibitorio ejercido por el antígeno ESAT-6 (proteína de secreción temprana de *Mtb*) sobre la producción de IFN- γ contra *Mtb*. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la IL-9 tendría un rol benéfico durante la TB, previniendo la apoptosis, revertiendo el efecto inhibitorio de ESAT-6 y promoviendo la producción de IFN- γ . Todas las diferencias mencionadas son significativas, $p < 0,05$. Los protocolos mencionados fueron aprobados por el comité de bioética del Hospital Muñiz, de donde provienen las muestras de sangre.

543. (676) EL TRATAMIENTO ANTI-TUBERCULOSO INCREMENTA LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA SIN MODIFICAR EL PERFIL ADRENAL EN PACIENTES COINFECTADOS CON TUBERCULOSIS Y HIV

Angerami, M.¹, Suárez, G.¹, Laufer, N.^{1,2}, Ben, G.², Pérez, H.², Sued, O.³, Bottasso, O.⁴, Quiroga, M.¹
Instituto de investigaciones biomedicas en retrovirus y SIDA¹ División infectología, Hospital Gral de agudos "Dr. J.A.Fernández", Bs As, Argentina² Fundación Huesped, Bs As, Argentina³ Instituto de inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Rosario, Argentina⁴

La Tuberculosis (TB) es la principal causa de muerte por un agente infeccioso a nivel global y su interacción con el HIV causa efectos devastadores. Las hormonas adrenales y su correcto balance poseen un rol inmuno-modulador en individuos con TB y HIV, el cual resulta esencial para contener y/o resolver las infecciones. Evaluamos el status endócrino e inmune durante el tratamiento antituberculoso (TaT) en pacientes HIV+ con TB recientemente diagnosticada (CO). Se realizó el seguimiento de 13 CO durante el TaT (inicio del TaT, dos y seis meses; V1, V2 y V3 respectivamente) y se evaluaron parámetros endócrinos (DHEA, DHEA-s y Cortisol plasmáticos) e inmunológicos (células productoras de IFN- γ *Mtb*-específicas mediante ELISPOT y % LTreg por citometría de flujo). Los datos obtenidos se contrastaron con los observados en dadores sanos (DS, n=10) y pacientes HIV+ (n=8). Luego del inicio del TaT se observó un aumento en el número de células productoras de IFN- γ (V1 vs. V2, p<0,05) y un incremento en el % de LT FoxP3+CD25- (V1 vs. V3, p<0,05), sin observar cambios en el % de LTreg FoxP3+CD25+. Llamativamente el TaT no modificó significativamente la concentración plasmática de las hormonas adrenales evaluadas. Se observaron niveles mayores de LTreg FoxP3+CD25- en CO al compararlos con aquellos obtenidos en DS (V1 vs. DS, p<0.001; V2 vs. DS, p<0.05) e individuos HIV+ (V1 vs. HIV, p<0.05), alcanzando, al finalizar el TaT, los niveles de DS y HIV+. Asimismo, el TaT indujo un marcado aumento de la respuesta Th1 *Mtb* específica al compararla con la presentada por pacientes HIV+ (V1 vs. HIV: n.s.; V2 y V3 vs. HIV: p<0,05). No se observaron diferencias al realizar comparaciones similares frente a DS. Estos datos indican una recomposición de parámetros inmunológicos pero no del perfil adrenal durante el TaT, sugiriendo que la infección por HIV resulta en un factor adicional de estrés que no se corrige solo por el TaT, remarcando el complejo panorama durante la coinfección HIV-TB.

544. (724) ROL DE NTB-A EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR REACTIVACIÓN EN RESPUESTA A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Hernández Del Pino, R.^{1,2}, Rovetta, A.^{2,3}, Alvarez, G.^{1,2}, Alvarez, I.^{2,3}, Peña, D.^{2,3}, Castagnino, J.⁴, Musella, R.⁴, Palmero, D.⁴, Malbrán, A.⁵, Pasquinelli, V.^{1,2}, García, V.^{2,3}
Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales. UNNOBA. Buenos Aires, Argentina.¹ Departamento de Química Biológica. FCEN. UBA. Buenos Aires, Argentina.² Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). UBA-CONIC³ División Tisiopneumología. Hospital de infecciosas F.J. Muñiz. Buenos Aires, Argentina.⁴ Unidad de Alergia, Asma e Inmunología Clínica, Hospital Británico de Buenos Aires, Argentina.⁵

La señalización a través de NTB-A (receptor de la familia de SLAM) induce la apoptosis inducida por re-estimulación (RICD), en una vía en la cual participa la proteína de unión a SLAM (SAP). Asimismo, las células T de individuos XLP (síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X) muestran una producción exacerbada de IFN-g y son resistentes a la RICD, proceso que controla la expansión T. Estos pacientes XLP presentan mutaciones en el gen de SAP, lo cual causa una inmunodeficiencia primaria grave. Previamente reportamos que SAP inhibe la producción de IFN-g inducida por la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM) en la tuberculosis (TB) humana. Por lo mencionado, en este trabajo investigamos el rol de la vía de NTB-A-SAP en la regulación de la homeostasis

de la respuesta de linfocitos T durante la TB. Al determinar la expresión de NTB-A por citometría de flujo, observamos que el 90% de las células T de los individuos XLP, pacientes con TB y dadores sanos (DS) expresan NTB-A y que esta molécula no es modulada por estimulación con *Mtb*. Por otro lado, cuando células mononucleares de sangre periférica de DS y pacientes con TB fueron estimuladas con *Mtb* y se midió el ARNm de SAP por PCR en tiempo real, se encontraron incrementos significativos luego de estimulación antigénica por 5d (p<0.05), evidenciando que *Mtb* regula la expresión de SAP a nivel transcripcional. Más aun, seguidamente estudiamos la pérdida celular por RICD en células estimuladas con *Mtb*. Observamos que las células T de pacientes XLP estimuladas con *Mtb* sufren una apoptosis entre 35-50% luego de re-estimulación, mientras que en los DS y TB se evidenció un 70-90% (p<0.05). Además, luego de bloquear NTB-A con un anticuerpo específico, la pérdida celular en DS disminuyó a un 30% pero los niveles de apoptosis no variaron en pacientes XLP. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la RICD en respuesta a *Mtb* es regulada al menos parcialmente por una vía que involucra a NTB-A y a SAP.

545. (800) ANÁLISIS DE PARÁMETROS INMUNOENDÓCRINOS EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS (TB) PLEURAL (TBPL) Y TUBERCULOSIS PULMONAR (TBP)

Dattilio, L.¹, Díaz, A.¹, Didoli, G.¹, Santucci, N.¹, Bongiovanni, B.¹, Pavón, N.², Radcliffe, S.², Gardeñe, W.³, Bottasso, O.¹, Bay, M.¹
Instituto de Inmunología. Facultad de Cs. Médicas. UNR¹ Laboratorio Central, Hospital del Centenario, Rosario.² Servicio de Neumología Hospital del Centenario, Rosario.³

La TBPL constituye un modelo natural para estudiar la respuesta inmune protectora en el sitio de la infección, así como su relación con la respuesta endócrina. Aunque no se conoce si la respuesta inmunoendócrina a nivel sistémico (plasma, P) para ambos tipos de TB es similar. Para ello, se compararon los niveles plasmáticos de mediadores proinflamatorios (IFN γ , IL-6, IL-1b, PCR) y hormonas del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Cortisol, DHEA y DHEAS) en pacientes con TBP (n=28) y voluntarios sanos (HCo, n=19), respecto del grupo con TBPL (n=8) y se relacionaron con los de su sitio lesional (Fluido Pleural-F). Además, analizamos los niveles de los ARNm (RT-qPCR) de las isoformas del receptor para glucocorticoides (GR α y GR β) y de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I (11 β HSD1), involucrados en la regulación de la acción del Cortisol en células mononucleares de sangre periféricas (CMP) y líquido pleural (CML). Las concentraciones en P de IL-6, IFN γ y PCR fueron significativamente superiores en el grupo con TBPL respecto de HCo y de TBP. Las hormonas presentaron un comportamiento similar para ambos tipos de TB, difiriendo de HCo, con marcado incremento de los niveles de Cortisol (p<0,05) y disminución tanto de DHEA (p<0,02) como DHEAS (p<0,05). En F todas las hormonas se vieron disminuidas en relación al P (ej. Cortisol; p<0,01) de los mismos pacientes, a diferencia de los mediadores cuyos niveles estaban aumentados en F al compararlos con los de P (ej. IL-6; p<0,01). La TBPL cursa con una importante producción de citocinas proinflamatorias con manifestación sistémica. Sin embargo esto no se traduce en modificaciones en los niveles de hormonas esteroideas, respecto de las observadas en los procesos de TB pulmonar. Además, en TBPL las CML presentaron un incremento en los ARNm de GR α y 11 β HSD1 respecto de los de las CMP compatible con un ambiente intracelular que permitiría optimizar los efectos inmunomoduladores de las bajas concentraciones de Cortisol.

INMUNOLOGÍA ADAPTATIVA Y REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE 1

546. (7) LA QUIMERA BLSOMP31 PROTEGE CONTRA BRUCELLA CANIS EN EL MODELO RATÓN

Clausse, M.^{1,4}, Diaz, A.^{1,4}, Guersi, G.², Zylberman, V.², Goldbaum, F.^{3,4}, Estein, S.^{1,4}

Lab. de Inmunología, CIVETAN, CONICET, Fac. Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Bs As, Argentina¹ INMU-NOVA S.A.² Fundación Instituto Leloir e IIBBA-CONICET³ CONICET⁴

La brucelosis canina es una enfermedad zoonótica que ocasiona importantes problemas reproductivos en los caninos. Hasta el momento no hay una vacuna disponible. Recientemente hemos ensayado diferentes antígenos de *Brucella* como vacunas, entre ellas la quimera BLSOmp31, constituida por la *Brucella* Lumazine Sintetasa portando un péptido de la proteína de membrana Omp31 la cual protegió en el modelo ratón y en ovinos contra *B. ovis* empleando diferentes estrategias vacunales. **Objetivo:** Evaluar la inmunogenicidad y protección conferida por BLSOmp31 contra *B. canis* en el modelo ratón. **Materiales y Métodos:** Se inmunizaron 8 lotes de ratones BALB/c (n=10) con diferentes estrategias: A) vacuna a ADN (pCIBLSOmp31), B) proteína recombinante (rBLSOmp31) emulsionada en diferentes adyuvantes (Hidróxido de aluminio (AH), Marcol 52, Quil A y Montanide IMS3012) y C) primeboost (PB). Se incluyeron dos grupos control: no vacunado y vacunado con la bacteria *B. canis* (M-). Treinta días post-último refuerzo el 50% de los animales fueron desafiados con *B. canis* vía intraperitoneal y se sacrificaron 30 días después. Se evaluó la protección conferida mediante recuento de UFC en bazo. **Resultados:** Se detectaron altos niveles de Ac específicos (IgG) en todos los grupos inmunizados con un perfil de respuesta IgG1:IgG2a mixto. rBLSOmp31 en Marcol y la bacteria confirieron protección significativa con una reducción de 3,99 y 4,36 log UFC/bazo. En las estrategias PB, rBLSOmp31 en Quil A y en AH los valores fueron de 2,26, 1,52 y 1,35 log UFC, respectivamente. La vacuna de ADN y rBLSOmp31 en Montanide no confirieron niveles significativos de protección. **Conclusión:** Los resultados obtenidos nos alientan a evaluar la inmunogenicidad de rBLSOmp31 como vacuna subcelular contra la brucelosis canina en la especie susceptible.

547. (19) LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA-L EN LOS PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS Y EN LAS CÉLULAS ESTROMALES DE LA MEDULA ÓSEA REGULA LA PRODUCCIÓN DE LINFOCITOS B

Badano, M., Maglioco, A., Machuca, D., Costa, H., Caramano, G., Piazzon, I., Nepomnaschy, I.
IMEX-Academia Nacional de Medicina

Utilizando ratones CTSL^{nkt/nkt} (nkt) portadores de una delección inactivante en el gen de la catepsina-L (CTSL), estudiamos la influencia de la CTSL sobre la homeostasis de las poblaciones linfoides B. Nuestros resultados indicaron que el número de células B en los ganglios linfáticos y bazo de los ratones nkt está aumentado y que dicho incremento no está asociado a alteraciones en la proliferación/apoptosis sino con una mayor producción de células B por la medula ósea (MO). Además, el número de células B transicionales (BT) del bazo (B220^{hi}HSA^{hi}) -células B que han emigrado recientemente de MO- está aumentado, correlacionando con una mayor exportación de células B de la MO nkt al bazo. Para estudiar la contribución de las células hematopoyéticas (CH) y de las células estromales (CE) de la MO en la mayor producción de células B, realizamos ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC) luego de un co-cultivo entre las mismas. En presencia de CEwt, las CHnkt produjeron un mayor número de colonias con respecto a las CHwt (media UFC±DS: 146±11 CHnkt vs 67±8 CHwt; n=3; p<0,01). Además, el número de colonias derivadas de CHwt fue mayor luego del co-cultivo con CEnkt (media UFC±DS: 115±11 CEnkt vs 67±8 CEwt; n=3; p<0,01). El mayor número de colonias se obtuvo luego del co-cultivo entre CHnkt y CEnkt (media UFC±DS:191±17). Para confirmar la influencia de las CHnkt en el aumento de linfopoyesis B *in vivo*, trasplantamos células de MO nkt y wt en huéspedes wt irradiados letalmente. A los 12 días observamos mediante FACS, que los ratones trasplantados con CHnkt mostraron mayores niveles de precursoras de células B en la MO (media n°cél B220^{hi}×10⁶±DS: 4.2±0.8 CHnkt vs 0.9±0.2 CHwt; n=9; p<0.005) y mayores niveles de células BT del bazo (media n°cél B220^{hi}HSA^{hi}×10⁶±DS: 35.5±6.5 CHnkt vs 4±1

CHwt; n=9; p<0.001). Estos resultados indican que la ausencia de actividad de CTSL tanto en las CH como en las CE de la MO contribuye al incremento de la linfopoyesis B en los ratones nkt.

548. (155) EFECTO DEL VIRUS ELEVADOR DE LA LACTATO DESHIDROGENASA (LDV) SOBRE LA ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS Y SECRECIÓN DE CITOQUINAS

Aparicio, J.¹, Saxena, A.², Coutelier, J.², Van Snick, J.², Retegui, L.¹
IQUIFIB (UBA-CONICET)-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. Argentina¹ de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium²

El LDV es un virus no patógeno y persistente, que infecta ratones y activa macrófagos, células NK, provoca secreción de citoquinas proinflamatorias y activación policlonal de linfocitos B. Previamente demostramos que, dependiendo del bagaje genético de la cepa infectada, se modificaba la especificidad de anticuerpos (Ab) anti-hormona de crecimiento humana (hGH) y se producían autoAb contra diversos órganos. El propósito de este trabajo fue ampliar los estudios a otra cepa y otro antígeno (Ag), ovoalbúmina (OVA), y explorar la producción de citoquinas relacionadas. Ratones BALB/c, CBA/Ht y C57BL/6 (n=8) fueron inoculados vía sc con 25 µg de OVA o hGH en adyuvante completo e incompleto de Freund. La mitad de los animales fueron infectados vía ip con el LDV (2x10⁷ ID 50), otros fueron sólo infectados y el resto no recibieron tratamiento. Los ratones fueron sangrados a los 30 y 60 días y se estudió la proliferación de células del bazo (Ba) y nódulos linfáticos (NL) incubadas con 100 µg/ml de OVA o hGH. El INF-γ, IL13 e IL17 producidas y los niveles plasmáticos se midieron por ELISA sandwich. Los Ab anti-hGH y anti-OVA se midieron por ELISA directo y la especificidad de los Ab (antiepítopes crípticos o nativos) mediante ELISA de competición. Los resultados indicaron que el tratamiento LDV+hGH, en CBA/Ht, disminuyó 20% los anti-hGH nativos y la concentración plasmática de IL13 (220±80 pg/ml); control (390±65 pg/ml p<0,01) e IL17 (60±2 pg/ml); control (90±10 pg/ml p<0,005). El LDV aumentó 25 % los anti-OVA nativos y la concentración plasmática de IL17 (200±30 pg/ml); control (90±10 pg/ml p<0,01) y se observó una producción significativa de INF-γ, IL13 e IL17 en células de NL de ratones LDV+OVA. El LDV no cambió la especificidad anti-hGH u OVA en las cepas BALB/c o C57BL/6. Los resultados indican que la infección e inmunización con un determinado Ag en un hospedador genéticamente susceptible induce cambios en la especificidad de Ab y producción de citoquinas específicas.

549. (228) INTEGRINA α4β7 EN POBLACIONES DE NÓDULOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS: ROL DE CITOQUINAS SISTÉMICAS EN LA INDUCCIÓN, LA REGULACIÓN Y EL POTENCIAL INFLAMATORIO

Pedrotti, L., Melián, M., Correa, S.
Departamento de Bioquímica Clínica - CIBICI-CONICET - Facultad de Ciencias Químicas-UNC

En el microambiente intestinal, citoquinas Th2/Th3 condicionan la actividad de las células y las respuestas que se inducen. La perturbación del balance de citoquinas estaría asociada a patologías inflamatorias, permeabilidad intestinal alterada y al reclutamiento de células activadas. En trabajos previos observamos que la producción sistémica de IL12 exacerba los parámetros clínicos (DAI) de la colitis experimental inducida por Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) incrementando las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ que expresan la integrina α4β7 luego de 7 días de tratamiento. Para estudiar estas poblaciones, ratones C57BL/6 se inyectaron con un plásmido con la región codificante para IL12 (pIL12) y se evaluaron en días 1, 3, 5 y 7 mediante citometría de flujo, observándose un incremento significativo (p<0,05) en linfocitos CD8⁺ α4β7⁺ en ganglios mesentéricos (NLM) a los días 5 y 7. Para evaluar la influencia de citoquinas en la expresión de la integrina estudiamos las poblaciones α4β7⁺ en animales IL4ko, IL10ko, TNFαko e INFγko. El marcado aumento de la integrina en todos los ratones ko tratados con pIL12 sugirió un efecto directo de la

IL12, siendo máximo dicho efecto en los animales IL10ko. Estos resultados se confirmaron con cultivos primarios de células de NLM y Bazo de animales IL10ko, IL12ko y C57BL/6 estimuladas con IL12 recombinante por 48hs. Para estudiar la participación de células $\alpha 4\beta 7+$ en la exacerbación de la colitis experimental, se transfirieron células de NLM de animales tratados con pIL12 a ratones C57BL/6 y se inició inmediatamente la administración de DSS. A los 7 días se observó la exacerbación del DAI en los animales transferidos ($p < 0,05$). Estos resultados muestran que el aumento de la IL12 a nivel sistémico modifica la expresión del receptor de homing $\alpha 4\beta 7$ en poblaciones linfocitarias de NLM, efecto regulado por IL10. Los linfocitos $\alpha 4\beta 7+$ activados por citoquinas Th1 sistémicas contribuirían a la exacerbación de enfermedades inflamatorias intestinales.

550. (320) GALECTINA-1 MODULA LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS B Y SUS PROPIEDADES REGULATORIAS

Martínez Allo, V.¹, D'Alotto, T.¹, Dergan Dylon, S.¹, Stupirski, J.¹, Cerliani, J.¹, Méndez Huergo, S.¹, Croci, D.¹, Sundblad, V.¹, Salatino, M.¹, Gruppi, A.², Rabinovich, G.¹, Toscano, M.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET.¹ Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología. CONICET. Córdoba, Argentina.²

Galectina-1 (Gal1) es una lectina endógena capaz de suprimir las manifestaciones clínicas de diferentes modelos de inflamación crónica y autoinmunidad. En este trabajo, nos propusimos estudiar la función de Gal1 en el desarrollo de respuestas B efectoras y regulatorias. A tal fin, analizamos la frecuencia y funcionalidad de las células B de ratones deficientes en Gal1 (*Lgals1*^{-/-}) respecto a ratones wild type (WT). Utilizando citometría de flujo, observamos que la proporción de las distintas subpoblaciones B en el bazo de ratones *Lgals1*^{-/-} es similar a los ratones WT. Sin embargo, el número de células B220⁺ en bazo es mayor en ratones *Lgals1*^{-/-} ($P = 0,0089$). Al estudiar la proliferación de células B (³H]Tidina) en respuesta a la estimulación con LPS, anti-CD40 y anti-CD40+anti-IgM, observamos que las células B de ratones *Lgals1*^{-/-} presentan una menor proliferación frente a dichos estímulos que ratones WT (LPS: $P = 0,003$; anti-CD40: $P = 0,0021$; anti-CD40+anti-IgM: $P = 0,0004$). Luego analizamos la secreción de IL-10 (ELISA) frente a dichos estímulos y observamos que en presencia de LPS los linfocitos B de ratones WT producen mayores niveles de esta citoquina que ratones *Lgals1*^{-/-} ($P = 0,0169$). A su vez, observamos que LPS induce la secreción de Gal1 (ELISA) por parte de las células B ($P < 0,05$). Finalmente, evaluamos el potencial inmunoregulador de la subpoblación de células B transicionales 2 y de la zona marginal del bazo (T2-MZ). Observamos que células T2-MZ WT son capaces de suprimir la proliferación de células T CD4⁺ naïve mientras que células T2-MZ deficientes en Gal1 son menos efectivas para inducir este efecto ($P = 0,0236$). Esto sugiere que la subpoblación T2-MZ posee propiedades inmunoregulatorias mediadas por Gal1. Estos resultados indican que esta lectina jugaría un papel clave en la funcionalidad de células B y que podría exhibir una función crítica durante el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

551. (332) MODULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ANTICUERPOS IGG ASIMÉTRICOS POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS CON MICROPARTÍCULAS DE PLGA-OVA

Rey-Roldán, E.^{1,2}, Apicella, C.¹, Parrado, A.¹, Abraham, F.¹, Canellada, A.^{1,2}, Gentile, T.^{1,2}

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr Ricardo A Margni (IDEHU)²

Las micropartículas de ácido poliláctico co-glicólico (PLGA) se utilizan como sistemas de liberación de antígenos en forma controlada y pulsátil mimetizando las inyecciones repetidas empleadas en los planes convencionales de vacunación, teniendo la ventaja adicional de carecer de toxicidad. Teniendo en cuenta que los macrófagos modulan la respuesta inmune adaptativa según la

naturaleza del antígeno, analizamos el efecto del antígeno particulado PLGA-ovoalbúmina (PLGA-OVA) sobre los macrófagos y su influencia sobre la producción de anticuerpos IgG asimétricos (AAb) producidos por células de hibridoma. Macrófagos peritoneales de ratones Balb/c se cultivaron por 2 hs, las células adherentes se caracterizaron por inmunohistoquímica (anti-F4/80) y luego estimularon 20 h con PLGA-OVA u OVA soluble (1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$). Se evaluó la viabilidad celular (WST-1) y en los sobrenadantes se determinó IL-6 y TNF α (ELISA). Células de hibridoma 112D5 se incubaron durante 48h con los sobrenadantes de cultivo de macrófagos y se determinó el porcentaje de AAb secretados (cromatografía de afinidad con Concanavalina-A-Sepharosa y posterior ELISA) y la proliferación celular. Más del 95% de las células peritoneales adherentes eran macrófagos. PLGA-OVA 10 $\mu\text{g/ml}$ incrementó significativamente los niveles de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de macrófagos ($2,4 \pm 0,38$ vs control $1,4 \pm 0,2$ ng/ml, $p < 0,05$) sin modificar los niveles de TNF α . Además, aumentó la proporción de moléculas IgG asimétricas sintetizadas por las células de hibridoma (18% vs control 2%, $p < 0,05$). Los sobrenadantes de macrófagos estimulados con PLGA-OVA y OVA soluble no modificaron la proliferación celular del hibridoma. En conclusión, las partículas de PLGA-OVA inducen la síntesis de una mayor proporción de moléculas IgG asimétricas y este efecto podría estar mediado por la IL-6 secretada por macrófagos estimulados por un antígeno particulado.

552. (498) LA ACTIVACIÓN POR SU RECEPTOR PROTEGE A LOS LINFOCITOS T CD4+ FOXP3+ DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DEXAMETASONA

Pandolfi, J., Podhorzer, A., Baz, P., Billordo, L., Fainboim, L., Arruivito, L

INIGEM. Laboratorio Inmunogenética. Hospital de Clínicas. CONICET. UBA

Antecedentes: Las células T CD4+FOXP3+ participan en el control de la respuesta inmune y constituyen una población heterogénea compuesta por las células T reguladoras (Tregs) con capacidad supresora, y células que si bien expresan FOXP3, secretan citocinas pro-inflamatorias y no tienen capacidad supresora. Los glucocorticoides (GC) son ampliamente usados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes con diversas consecuencias sobre el sistema inmune. **Objetivo:** Estudiar el efecto de Dexametasona (Dex) sobre las células T CD4+FOXP3+, ex vivo o luego de su activación a través del TCR. **Metodología y Resultados:** Estudios de citometría de flujo de cultivos de PBMCs en presencia de Dex por 72 h mostraron una disminución en el % de las células T CD4+FOXP3+ y un efecto pro-apoptótico dosis y tiempo dependiente. Este efecto de Dex pudo ser revertido tanto por el agregado del antagonista de su receptor [mifepristona (RU)] o de IL-2. Cuando las células fueron activadas a través de su TCR, el efecto apoptótico de Dex solo se evidencia si se agrega al inicio del cultivo. Se realizaron ensayos de supresión donde células T efectoras y CPA, activadas con anti-CD3 se co-cultivaron con Tregs tratadas o no con Dex. Las Tregs mantuvieron una similar capacidad supresora, al menos en relaciones 1:1 o 2:1 (efectora:Treg). **Conclusión:** La Dex ejerce un efecto pro-apoptótico sobre las células T CD4+ FOXP3+ que aún no han sido activadas a través de su TCR. Este efecto es revertido por la activación o por la presencia de IL-2, condiciones que podrían correlacionar con patologías inflamatorias. Tiempos cortos de exposición a la droga parecen no afectar su función supresora. Estos hallazgos muestran que el tratamiento con GC podría prevenir la inducción de una respuesta de tipo tolerogénica al inducir apoptosis de las Treg. En cambio podría no inhibir una respuesta de tipo tolerogénica en curso, al no inducir la apoptosis en Treg activadas.

553. (519) GALECTINA-3 REGULA NEGATIVAMENTE LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS B A CÉLULAS DE CENTRO GERMINAL Y SECRETANTES DE ANTICUERPOS

Amezcuea Vesely, M.¹, Fiocca Vernengo, F.¹, Gehrau, R.², Gorosito Serrán, M.¹, Bermejo, D.¹, Ramello, M.¹, Tosello

Boari, J.¹, Montes, C.¹, Acosta Rodríguez, E.¹, Campetella, O.³, Gruppi, A.¹
 Depto de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. CIBICI-CONICET¹ University of Virginia, Department of Surgery, Transplant Division. Charlottesville, Virginia, USA.² Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM³

Las células secretantes de anticuerpos (CSA) son claves en la defensa contra patógenos extracelulares, aunque pueden asociarse a enfermedad al producir autoanticuerpos. Galectina3 (Gal3), lectina que une b-galactósidos, ha sido involucrada en procesos de diferenciación y apoptosis celular. Observamos que ratones infectados con *T. cruzi* tratados con iRNA anti-Gal3 mostraron niveles elevados de inmunoglobulinas (Igs) séricas, sugiriendo que Gal3 podría estar involucrada en el desarrollo de CSA. El objetivo del presente trabajo fue dilucidar esta hipótesis. Por western blot observamos que la expresión de Gal3 en Linfocitos (Li) B cultivados con antígenos T-Dependiente (AgTD) como anti-CD40+IL4 disminuye la expresión de ésta lectina y que Antígenos T-Independiente (AgTI) como LPS anuló la expresión de la misma. La ausencia de expresión de Gal3 se relacionó con disminución en los niveles de rRNA de Gal3 y con aumento en la producción de IgM e IgG en sobrenadantes de cultivo, determinados por RTPCR y por ELISA, respectivamente ($p < 0.001$ - $p < 0.05$). Observamos que ratones Gal3KO presentaron niveles elevados de Igs en suero ($p < 0.05$) y una alta frecuencia de células productoras de Igs, determinadas por ELISPOT, en bazo y médula ósea ($p < 0.05$). A pesar que ratones Gal3 KO no presentan mayor porcentaje de células de centro germinal (CCG), observamos que ratones Gal3KO inmunizados con un AgTD presentaron un mayor porcentaje de CCG comparados con animales salvajes inmunizados. Aunque la inmunización con un AgTI no genera CCG, la ausencia de Gal3 favoreció la inducción de las mismas frente a éste estímulo ($p < 0.05$). Usando ratones quimeras observamos que la deficiencia de Gal3 en células hematopoyéticas fue responsable del aumento en los niveles séricos de Igs. Los resultados sugieren que Gal3 intracelular controla el desarrollo de la respuesta inmune humoral regulando la generación de CCG y ASC, señalando a esta lectina como blanco de control en respuestas humorales desreguladas.

554. (562) ESTUDIO DEL EFECTO PREVENTIVO Y TERAPÉUTICO DE ENTEROCOCCUS FAECALIS CECT7121 EN UN MODELO DE ALERGIA SISTÉMICO

Castro, M., Daz, A., Molina, M., Núñez, G., Mourelle, A., Manghi, M.
 IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Enterococcus faecalis CECT7121 es una cepa con actividad inmunomoduladora que ejerce efectos beneficiosos sobre diversos modelos biológicos. Recientemente nuestro grupo ha demostrado que el pretratamiento (P-TTO) de ratones BALB/c con esta cepa bacteriana disminuye el establecimiento de la alergia. En este trabajo estudiamos el posible efecto terapéutico de *E. faecalis* CECT7121 sobre el proceso alérgico ya establecido (TTO). Para esto, dos grupos de animales fueron sensibilizados por vía subcutánea con Ovalbúmina (Ova) e Al(OH)₃ los días 0, 7 y 21. Uno de ellos recibió por vía intragástrica *E. faecalis* CECT7121 (0.2 ml; 3.10⁸ UFC/ml) los días 1 al 3; 14 al 16 y 28 al 30 del plan; el otro grupo recibió SF como control. Doce días después de la última inmunización los animales fueron sacrificados y se estudiaron los principales parámetros inmunológicos que están implicados en la alergia (niveles específicos de IgE, IgG1, IgG2a en suero, e IL-5 e IL-13 en sobrenadantes de cultivo de células de bazo estimuladas con Ova). También se realizó el estudio de anafilaxia cutánea activa (ACA). Mientras el P-TTO con *E. faecalis* CECT7121 disminuyó los niveles séricos de IgE específica ($p < 0.01$), y de IL-4, IL-5 e IL-13 en los sobrenadantes de las células esplénicas ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.001$; respectivamente), el TTO terapéutico no produjo cambios en los parámetros mencionados. En ambos casos, la administración de *E. faecalis* CECT7121 ocasionó un incremento de los niveles de IgG2a anti-Ova ($p < 0.05$) lo cual es concordante con la actividad pro-Th1 ya reportada para esta

cepa. El TTO terapéutico no generó *in vivo* una disminución de la ACA lo cual sí fue observado cuando la bacteria fue administrada previamente a la sensibilización. Estos resultados indican que *E. faecalis* CECT7121, si bien es útil para prevenir la alergia actuando positivamente en la etapa de sensibilización, no es una cepa adecuada para el manejo del proceso alérgico ya establecido.

555. (617) IMMUNOESTIMULACION DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS: EFECTO ADYUVANTE DE UN LACTOBACILO MUERTO POR CALOR ASOCIADO A UN ANTÍGENO NEUMOCOCCICO

Vintiñi, E.¹², González, L.³, Medina, M.¹⁴
 Centro de Referencia para Lactobacilos¹ Fac. de Agronomía y Zootecnia. UNT² Fac. de Medicina. UNT³ Fac. de Bioqca, Qca y Fcia. UNT⁴

La selección de adyuvantes es fundamental en el desarrollo de vacunas humanas (V). Algunas proteínas de *S. pneumoniae* (Sp) son inmunogénicas y serotipo independientes, por lo que son importantes candidatos para el diseño de nuevas V. Las Bacterias Lácticas (BL), con propiedades inmunoestimulantes, serían adyuvantes apropiados. Obj.: Evaluar la estimulación inmune inducida por *Lactobacillus casei* no-viable (LcM) asociada a la proteína protectora A (PppA) de Sp, en un modelo "in vitro" de células mononucleares de sangre periférica humana (CMNSP). Mat. y Mét.: Las CMNSP se aislaron de sangre de voluntarios sanos por ficoll-hypaque y se cultivaron a 37° C, 5% de CO2 en placas de 24 wells con RPMI, Suero Fetal Bovino y ATB. Las CMNSP fueron estimuladas por 24 h con PppA, LcM, PppA+LcM, LPS y RPMI (Control:C). En sobrenadantes de cultivo se evaluó: INF- γ , IL-4, IL-2, IL-10 e IL-17 por ELISA. Por Citometría de Flujo se evaluaron células T (LT): CD3+, CD4+, CD8+, CD25+ (activación) y B (LB): CD19+. Res.: La producción de INF- γ e IL-2 fue incrementada por todos los estímulos y PppA+LcM indujo los niveles más elevados de estas citoquinas (INF- γ pg/ml= C:13 \pm 1; PppA+LcM:81 \pm 3, $p < 0.01$). Todos los grupos estimularon sig. la prod. de IL4, IL-10 e IL-17 en comparación al C, excepto PppA. El % de LTCD3+ no fue modificado por ninguno de los estímulos, pero todos indujeron un incremento sig. del % de LB CD19+ en comparación al C. Conclusiones: En nuestro modelo, la estimulación de CMSPs con PppA+LcM fue capaz de inducir la activación de las poblaciones Th1, Th2 y Th17, incrementando la producción de citoquinas. Todos los estímulos incrementaron sig. la población de LB CD19+, indicando estimulación de la respuesta inmune humoral. La capacidad inmunoestimuladora de la combinación de un lactobacilo muerto asociado a un Ag neumocócico, representa una potencial alternativa para el desarrollo de una vacuna independiente de serotipo, empleando un adyuvante seguro para su aplicación en salud humana.

556. (631) REGULACIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y MARCADORES DE MADURACIÓN POR ACTIVACIÓN COLINÉRGICA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

Lombardi, M.¹, Salamone, G.², Gori, M.², Yuseff, M.¹, Graziano, E.¹, Geffner, J.², Sales, M.¹
 Lab. de Inmunofarmacología tumoral. CEFYBO-CONICET¹ Laboratorio de oncoimmunología. Academia Nacional de Medicina²

El sistema colinérgico no neuronal está constituido por la acetilcolina, las enzimas colina-acetil transferasa (CoAct) y acetilcolinesterasa (ACE) y por los receptores: nicotínicos y muscarínicos (M). Demostramos la presencia de receptores M₃, M₄ y M₅ y de las enzimas ACE y CoAct en células dendríticas (CD) humanas. Aquí se investigó el efecto de la estimulación colinérgica sobre la expresión de los marcadores de maduración: HLA-DR y CD86 y la producción de citoquinas proinflamatorias: IL-12 y TNF- α . Las CD se diferenciaron de monocitos de sangre periférica, se trataron con el agonista carbaol (Carb)(10⁻⁷M), nicotina (Nic)(10⁻⁷M) o muscarina (Musc) (10⁻⁷M) con o sin: el antagonista muscarínico atropina (AT)(10⁻⁸M) o el antagonista nicotínico mecamilamina (MM) (10⁻⁷M). Luego se cultivaron 24h en ausencia (inmaduras, CDi)

o en presencia (maduras,CDm) de LPS. El Carb incrementó la expresión de HLA-DR y CD86 en las CDm y la producción (pg/ml) de IL-12(Carb:575±10;basal:374±15) y TNF- α (Carb:6733±1167; basal: 3667±629) (n=3; p \leq 0,01 Carb vs.basal). Ambos efectos se redujeron en presencia de AT. Resultados similares se observaron con Nic y Musc. La NOS participa de la vía de señalización de los receptores M₃ y M₅ y su producto el NO es un mediador inflamatorio y regulador de la respuesta inmune. Demostramos que tanto la CDi como las CDm expresan las isoformas NOS1 y NOS3 y liberan concentraciones similares de NO₂ (uM) (CDi: 2,99±0,96; CDm: 1,98±0,51). Tanto la Nic como la Musc fueron capaces de aumentar significativamente los niveles de NO₂ en las CDm (14,14±2,18 y 8,51±0,84 respectivamente; p<0,001) y el efecto se redujo con MM y AT respectivamente. Observamos 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 CD responden diferencialmente a los agonistas colinérgicos aumentando la producción de NO, el cual podría ser un factor clave en el proceso de maduración.

557. (667) PROGESTERONA INDUCE VIP EN CÉLULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES MODULANDO LA EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS ASOCIADAS AL RECLUTAMIENTO DE LINFOCITOS T REGULADORES

Grasso, E.¹, Fraccaroli, L.¹, Papparini, D.¹, Hauk, V.¹, Mor, G.², Pérez Leiros, C.¹, Ramhorst, R.¹

Laboratorio de Inmunofarmacología, Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA¹, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, School of Medicine, Yale University²

La formación de la interfase materno-placentaria involucra la modulación de quimioquinas, receptores y el reclutamiento de distintas poblaciones leucocitarias entre ellas los linfocitos T reguladores. La progesterona es una hormona fundamental en dichos procesos. Por otra parte, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) es producido por células trofoblásticas e inmunes y modula la respuesta inmune materna hacia un perfil tolerogénico. Anteriormente reportamos la modulación de la expresión de RANTES por parte de VIP, así como el efecto modulador de la progesterona sobre el sistema VIP/VPAC. La modulación de RANTES a su vez se asocia con la migración selectiva de linfocitos T reguladores. En este trabajo caracterizamos la relación entre la producción endógena de VIP por células endometriales estromales humanas (línea HESC) modulada por progesterona y su efecto en la expresión de RANTES. Se evaluó por PCR la expresión de RANTES y del factor de transcripción KLF13 -el cual se reportó como inductor de RANTES y respondió a progesterona en otros modelos- bajo distintas combinaciones de LPS (0,1ug/ml), progesterona (10-6M), VIP (10-7M) y un péptido antagonista de VIP (10-5M). Observamos que el estímulo con LPS indujo la expresión de RANTES mientras que en combinación con VIP o progesterona ésta se potenció significativamente (P<0.05). El efecto de progesterona fue revertido parcialmente por el antagonista de VIP (P<0.05). Al estudiar KLF13, se observó que tanto la progesterona como el VIP inducen su expresión y que la combinación con LPS aumenta dicha inducción. El tratamiento con antagonista de VIP disminuyó la expresión de KLF13 inducida por progesterona. Concluimos que el efecto de progesterona sobre la expresión de RANTES es mediado parcialmente por VIP y que el factor de transcripción KLF13 estaría probablemente involucrado en este mecanismo, aunque su sola expresión no es suficiente para inducir RANTES.

558. (696) ESTUDIO DE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN HEMBRAS PREÑADAS DE LA ESPECIE LAMA GLAM

De Simone, E.¹, Saccodossi, N.², Caggiano, N.¹, Juliá, E.², Rey, E.², Chiappe Barbará, M.¹, Canellada, A.², Gentile, T.²
Cátedra de Fisiología Animal FCV-UBA¹ Cátedra de Inmunología-IDEHU, FFYB,UBA²

Actualmente, varios grupos estudian la fisiología reproductiva en la especie *Lama glama*, la cual se caracteriza por una eficiencia

reproductiva relativamente baja y un alto porcentaje de pérdidas embrionarias. Sin embargo, hasta el momento, no hay trabajos publicados donde se estudien los aspectos inmunológicos relacionados con la reproducción en esta especie. Este trabajo se basa en el estudio de la inmunorreactividad que presentan llamas preñadas y vacías frente a distintos mitógenos y Ags: Ovoalbúmina (OVA) y una fracción de Ags solubles de *T. cruzi* (F105). Para ello, inmunizamos llamas preñadas (n=7) y vacías (n=6) con OVA y F105. Por un lado, se analizó en el suero de las llamas los niveles de progesterona y la presencia de IgM y de distintos subtipos de IgG reactivos a los Ags (OVA y F105) utilizados en los planes de inmunización; y por otro lado, se analizó en sobrenadantes de cultivo de las células mononucleares de sangre periférica de estos mismos animales, la presencia de citoquinas: TNF- α e IL-6 frente a LPS y a Con A. Con respecto a los valores de progesterona en suero, se detectó el siguiente rango de valores para las llamas no preñadas (0.2 a 0.6) ng/ml, mientras que los sueros de llamas preñadas presentaron concentraciones más altas de esta hormona (1.4 ng/ml a 4.8 ng/ml). En cuanto a los niveles de IL-6 y TNF- α , no se observaron diferencias significativas entre los grupos de llamas preñadas y no preñadas. En relación a los títulos (expresados como logaritmo) de los distintos isotipos de Igs, sólo se obtuvo una diferencia significativa para los valores séricos de IgM de llamas preñadas vs vacías, obtenidos frente a OVA= 2.301 \pm 0.1229 vs 1.534 \pm 0.7670 p<0,05. En el resto de los isotipos analizados no se observaron diferencias significativas. El aumento de la respuesta en función de la IgM en llamas preñadas podría estar relacionado con los mayores niveles de IgM que observamos con anterioridad en el calostro de estos animales. UBACYT B938.

559. (727) LA LUMAZINA SINTETASA DE BRUCELLA SPP. (BLS) COMO ANTÍGENO MODELO PARA ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE PERSISTENCIA Y PROCESAMIENTO ANTIGÉNICOS

Rossi, A., Alzogaray, V., Goldbaum, F., Berguer, P.

Laboratorio de inmunología y microbiología molecular - IIBBA - Fundación Instituto Leloir

Previamente mostramos que BLS activa APC a través de TLR4 e induce la presentación cruzada de antígenos. El objetivo de este trabajo fue estudiar con qué células se encuentra asociada BLS luego de una inmunización y su localización intracelular *in vitro*. Se inmunizaron ratones BALB/c con BLS-fluoresceína por vía sc. A distintos tiempos se extrajeron los ganglios poplíteos (GP) e inguinales (GI). A las 2hs BLS se encontró asociada al 45±8% de las células dendríticas (CD) del GP drenante. A las 4hs BLS se encontró en 30±4% de las CD y en el 10±2% de los linfocitos B (LB) del GP; se encontró BLS en el 14±3% de CD de GI. A las 48hs BLS se encontró asociada al 12±5% de las CD de GI, no observándose en el GP. En ratones deficientes en TLR4 se observaron resultados similares hasta las 4hs; a tiempos mayores no se observó BLS. Estos resultados muestran que BLS reside más tiempo en CD que en LB y sugieren que las CD transportarían a BLS a los GI. Se estudió la localización subcelular de BLS por microscopía confocal. Se cultivaron macrófagos de peritoneo y CD derivadas de médula ósea y se incubaron con BLS-fluoresceína. Se marcó con anticuerpos específicos para diferentes compartimentos subcelulares y para TLR4. No se observó colocalización de BLS con endosomas tempranos, lisosomas/endosomas tardíos, Golgi, ni con retículo endoplásmico. A los 5 min pudimos observar la colocalización de BLS con TLR4 en la membrana citoplasmática tanto en macrófagos como en CD. A las 6hs dicha colocalización se observó en el citoplasma celular. En macrófagos y en CD de ratones BALB/c BLS se puede observar al menos hasta las 6hs; en ratones deficientes en TLR4 sólo se observa durante 1h. Estos resultados sugieren que BLS se uniría a TLR4 en la membrana plasmática y posteriormente ingresaría al interior celular. BLS escaparía de la vía endocítica de procesamiento antigénico. La persistencia de BLS *in vitro* e *in vivo* es dependiente de la señalización a través de TLR4.

560. (823) BLS INDUCE LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE PÉPTIDOS DE MANERA TLR4-INDEPENDIENTE Y UNA

RESPUESTA CITOTÓXICA ESPECÍFICA DEPENDIENTE DE TLR4

Berguer, P.¹, Rossi, A.¹, Alzogaray, V.¹, Piazzon, I.², Golbaum, F.¹

Laboratorio de inmunología y microbiología molecular - IIBBA - Fundación Instituto Leloir¹ Laboratorio de medicina experimental - IIHEMA - Academia Nacional de Medicina²

La lumazina sintética de *Brucella* spp. (BLS) es una proteína decamérica muy inmunogénica. Su estructura permite la inserción de péptidos en sus 10 extremos N-terminales y estas quimeras generan inmunidad oral y sistémica sin adyuvantes. BLS activa células dendríticas (CD) e induce su reclutamiento vía TLR4. A diferencia de otras vacunas basadas en subunidades, BLS induce la presentación de péptidos acoplados a su estructura activando a los linfocitos CD8+ e induciendo una importante actividad citotóxica específica aún sin adyuvantes. En este trabajo evaluamos el rol de TLR4 en ambos eventos. Se incubaron CD purificadas de bazo de ratones que no expresan un TLR4 funcional (C57Bl/10ScNJ) con la quimera BLS-OVA₂₅₇₋₂₆₄ y se cocultivaron con linfocitos CD8+ de ratones OT-I –que reconocen a OVA₂₅₇₋₂₆₄ en MHC-I- marcados con CFSE. Luego de 18hs se analizó mediante citometría de flujo la disminución de marca de CFSE como medida de proliferación y la expresión de CD69 como medida de activación temprana. Las CD de ratones C57Bl/10ScNJ indujeron niveles de proliferación de CD8+ similares a las CD de ratones normales (%CD8+ que proliferaron: ScN 34.2±5 vs wt 34±2.3). En ambas cepas el % de CD8+ OT-I que expresan CD69 aumentó de manera similar (ScN 87.9±3 vs wt 87±1). Es decir que la presentación cruzada inducida por BLS no depende de TLR4. Por otro lado, se inmunizaron ratones C57Bl/10ScNJ y normales con BLS-OVA₂₅₇₋₂₆₄ y se inocularon con esplenocitos preincubados con OVA₂₅₇₋₂₆₄. El porcentaje de citotoxicidad específica en los ratones normales a las 18hs resultó de 38±1; BLS-OVA₂₅₇₋₂₆₄ no indujo citotoxicidad en los ratones C57Bl/10ScNJ. Nuestros resultados muestran que TLR4 es necesario para la citotoxicidad específica inducida por BLS-OVA₂₅₇₋₂₆₄. La capacidad de BLS para inducir la presentación cruzada de OVA₂₅₇₋₂₆₄ no se basa en su capacidad de señalar a través de TLR4; la inducción de presentación cruzada no determina la generación de una respuesta citotóxica.

562. (119) NIVELES DE LINFOCITOS T REGULADORES CD4+CD25++FOXP3+ EN PACIENTES CON HEMOFILIA A SEVERA

Irigoyen, M.¹, Primiani, L.², Felippo, M.¹, Candela, M.³, Pérez Bianco, R.³, De E De Bracco, M.¹, Galassi, N.¹
IMEX-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹. Fundación Argentina de Hemofilia² IIHEMA-Academia Nacional de Medicina³

El desarrollo de inhibidores contra el FVIII en pacientes con Hemofilia es una de las mayores complicaciones del tratamiento. Estudios realizados en modelos animales han demostrado que este proceso depende de la ayuda de células T y es suprimido por células T reguladoras (Treg), las cuales participan en el resultado de la Inducción de Intolerancia (TIT), única estrategia terapéutica para erradicar los inhibidores. Existen escasas evidencias del papel modulador de las Treg en los pacientes. **Objetivos:** Evaluar las células Treg en pacientes con Hemofilia A Severa con y sin inhibidor y durante el TIT. Medir el nivel de IL-10, citoquina importante para la función de las Treg. Se estudiaron 14 pacientes con inhibidores (PI), 10 sin inhibidores (P) y 11 dadores sanos (DS). Se incluyeron 8 pacientes en TIT (TIT-PI). Las Treg fueron fenotipificadas por citometría de flujo. Se midió por ELISA el nivel de IL-10 en plasma. El título de inhibidor (UB/ml) se obtuvo por el método Bethesda. Este estudio fue avalado por el comité de ética institucional. Los PI mostraron menores porcentajes de células CD4+FOXP3+ comparados con los DS (p=0.01). Sin embargo, la proporción de CD4+CD25++FOXP3+ fue mayor en PI que en P (p=0.005) y DS (p=0.03). Todos los TIT-PI (4/4) con buena respuesta al tratamiento bajaron sus Treg a nivel de los DS en comparación con 1/3 TIT-PI con respuesta parcial o 0/1 con fracaso en el TIT. En este paciente, a pesar de que los porcentajes de Treg fueron

disminuyendo (1.45, 0.88, 0.79%) paralelamente a la disminución de los inhibidores (22, 13, 10 UB/ml) no logró descender a valores normales. PI mostraron niveles incrementados de IL-10 pero sin significación estadística. Estos resultados sugieren que, en pacientes con inhibidores, las Treg están incrementadas probablemente para ayudar a suprimir la producción de los anticuerpos. A medida que el TIT progresa, y los inhibidores decrecen, estas células tienden a normalizar sus valores.

563. (372) IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES PRODUCTORES DE IL-10 COMO MEDIADORES DE LA TOLERANCIA ORAL INDUCIDA EN UN MODELO MURINO DE ALERGIA A LECHE DE VACA

Orsini Delgado, M., Smaldini, P., Fossati, C., Docena, G.
LISIN, Dpto. de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP

La alergia a leche de vaca es una patología producto de la pérdida de tolerancia hacia las proteínas de la leche de vaca (PLV) y es de gran importancia en la población pediátrica. La falta de un tratamiento efectivo, lleva a que la inmunoterapia (IT) alérgico-específica sea una opción válida para su estudio. El objetivo de este trabajo es estudiar las poblaciones celulares involucradas en la inducción de tolerancia oral a las PLV en un modelo murino de alergia a PLV. Ratones Balb/c fueron tratados durante una semana con PLV (ToIPLV) previo a la sensibilización oral con PLV y toxina colérica. Luego fueron desafiados por vía oral con PLV y se evaluaron diferentes parámetros *in vivo* e *in vitro*. En particular se estudiaron las diferentes poblaciones celulares en bazo y en la mucosa intestinal, y su capacidad de secreción de citoquinas. Se observó una disminución de las manifestaciones clínicas inducidas por la exposición a PLV, una disminución de los niveles de IgE e IgG1 específicas a PLV con una disminución en la expresión y secreción de IL-13 e IL-5 en el grupo ToIPLV, respecto al lote sensibilizado (sens). Además se observó un aumento en la expresión de IL-10 (FI= 4,24±0,39 vs 1,2±0,63, P<0,01, ToIPLV vs Sens) e IFN-γ (FI= 5,79±0,12 vs 0,92±0,56, P<0,01, ToIPLV vs Sens) en intestino. En cuanto a las poblaciones celulares mucosales, se observó un aumento de LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ productores de IL-10 en MLN (6±0,23% vs 3±0,12%, ToIPLV vs Sens) y en placas de Peyer (7±0,48% vs 4±0,17%, ToIPLV vs Sens). En conclusión, encontramos que la administración previa del alérgeno por vía oral indujo LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ productores de IL-10 en GALT (Treg inducibles), los cuales estarían involucrados en la inhibición de los mecanismos involucrados en las reacciones alérgicas. Estos resultados nos permiten explorar la posibilidad de diseñar protocolos de tolerancia para aplicar sobre animales sensibilizados por administración del alérgeno en bajas dosis por diferentes vías mucosales.

564. (563) PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORIAS EN LA INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR HIPOTIROIDISMO EXPERIMENTAL

Valli, E.¹, Sterle, H.¹, Méndez Huergo, S.², Klecha, A.¹³, Barreiro Arcos, M.¹, Rabinovich, G.², Cremaschi, G.¹³
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UCA¹ IBYME-CONICET² Fac. Farmacia y Bioquímica-UBA³

El estado tiroideo modula la respuesta inmune, siendo los niveles de hormonas tiroideas (HTs) circulantes las que regulan la actividad linfocitaria. Así, demostramos en ratones hipotiroideos (r-hipo, por administración de propiltiouracilo) una disminución de la reactividad linfocitaria y de la producción de citoquinas Th1, pero no Th2, efectos que fueron revertidos por administración de T3 y contrarios a los observados en ratones transgénicos para el gen de TRH. Nuestro objetivo fue profundizar en los mecanismos intervinientes en la inmuno depleción inducida por el hipotiroidismo. Evaluamos las subpoblaciones linfocitarias en r-hipo y controles (C) sin encontrar diferencias en la relación de los marcadores CD3/CD19 ni CD4/CD8 en células mononucleares de sangre periférica, ni en suspensiones de ganglios linfáticos o bazos de r-hipo vs C. Sin embargo hayamos un aumento significativo del % de células T_{reg} (CD4+, CD25+, FoxP3+) (% T_{reg}: r-hipo:2.5±0.2; C:1.6±0.2, p<0.05). La inducción in

vitro de células T_{reg} también arrojó resultados similares ($p < 0.001$, $n=3$). Es conocido que las células T_{regs} sobreexpresan Gal-1 y que ratones knockout de dicha lectina (KO) muestran actividad reducida de células T_{reg} señalando a Gal-1 como un efector crucial de estas células. Evaluamos su posible participación en la regulación de T_{reg} en r-hipo estudiando la reactividad linfocitaria y el % de linfocitos T_{reg} en ratones KO eu- e hipotiroides (KO-hipo). Encontramos un incremento de las respuestas T proliferativas y una reducción de T_{regs} en KO-hipo respecto de los r-hipo ($p < 0.001$, $n=5$). Podemos concluir que la modulación de la inmunidad en el hipotiroidismo experimental, inducida por los bajos niveles circulantes de HTs, estaría relacionada con el aumento significativo del % de células T_{reg} espontáneas e inducibles. Dicho incremento dependería de la expresión de Gal-1 y podría estar asociado con el déficit funcional de células T presente en dichos ratones.

565. (634) EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS CRISP EN EL COMPARTIMIENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Weigel Muñoz, M., Dergan Dylon, L., Battistone, M., Croci, D., Rabinovich, G., Cuasnicu, P.
Instituto de Biología y Medicina Experimental

Las proteínas CRISP1 y CRISP3, se encuentran altamente enriquecidas en el tracto reproductor masculino y han sido detectadas en órganos inmunológicos (timo y bazo), exhibiendo, además, una alta homología con las proteínas de las familias PR-1 y Ag 5 que poseen funciones centrales en el sistema de defensa de plantas e insectos, respectivamente. Por otra parte, CRISP3 se encuentra regulada diferencialmente en varias patologías, habiéndose sugerido que tendría un rol inmunoprotector sobre los espermatozoides en el tracto femenino. Con el objeto de investigar si CRISP1 y CRISP3 cumplen una función en el sistema inmune, comenzamos estudiando la presencia y función de ambas proteínas en células dendríticas, cuyo rol es clave en la interfase entre inmunidad innata y adaptativa. Los resultados de RT-PCR indicaron la expresión del ARN mensajero de ambas proteínas en células dendríticas de ratón tanto inmaduras (obtenidas de médula ósea) (DCi) como maduras (estimuladas con lipopolisacáridos) (DCm). Estudios de Western Bot e inmunofluorescencia indirecta confirmaron la expresión de las correspondientes proteínas y su localización predominante en citoplasma celular. La disponibilidad de ratones carentes de CRISP1 (CRISP1^{-/-}) generados en nuestro laboratorio nos permitió evaluar si la ausencia de esta proteína era capaz de producir cambios fenotípicos y funcionales sobre las células dendríticas. Si bien no se detectaron por citometría de flujo diferencias respecto a los controles en los marcadores fenotípicos característicos (CD11c y CD86), ensayos de ELISA revelaron una disminución ($p < 0,05$) en la secreción de la citoquina inmunosupresora IL-10 sin mostrar diferencias en la producción de IL-27, IL-12, e IL-23 en las DCm provenientes de los animales CRISP1^{-/-}. En conjunto, estos resultados sugieren la participación de las proteínas CRISP1 y CRISP3 en la fisiología de células dendríticas y sugieren que las mismas podrían cumplir un rol inmunosupresor.

566. (670) UTILIZACIÓN DEL INHIBIDOR DE SERIN PROTEASAS TGPI-1 DE TOXOPLASMA GONDII PARA EL TRATAMIENTO DE INFLAMACIONES ALÉRGICAS PULMONARES

Soto, A., Fenoy, I., Sánchez, V., Picchio, M., Martín, V., Goldman, A.
CESyMA

Demostremos previamente que *T. gondii* protege frente al desarrollo de alergias pulmonares. La proteína TgPI-1 de *T. gondii* (PI) es un inhibidor de serin proteasas como la elastasa de neutrófilo. Es sabido que inhibidores de elastasa se comportan como inmunomoduladores. Utilizando ratones transgénicos y KO para el inhibidor de proteasas secretorias de leucocitos se demostró que su expresión reduce el desarrollo de un fenotipo alérgico. Además, el tratamiento de ratones con AEBSF (inhibidor

de serin proteasas) atenúa la inflamación alérgica pulmonar. Resultados preliminares mostraron que la presencia de rTgPI-1 durante la estimulación *in vitro* de esplenocitos de ratones alérgicos con OVA como alérgeno (O) indujo una disminución en la producción de IL-5: O: 307±46^a; O+PI: 191±31^b; medio: ND, pg/ml±ES, $p < 0,05$ a vs b. Evaluamos entonces la acción de la PI en el tratamiento de alergias pulmonares. Ratones BALB/c se sensibilizaron con 2 ip de O/Al(OH)₃ y se desafiaron por vía aérea con O 3%. Luego de 48 hs se los trató durante 3 días por vía intranasal con O (20µg) + PI (20mg o 50mg) (O/PI). El grupo control se trató con PBS/O. A la semana se los desafió con el alérgeno y se evaluó el fenotipo asmático. Los ratones tratados con PI mostraron una disminución de la eosinofilia en lavado broncoalveolar (O/PBS: 62,4±6,7^a; O/PI20: 33,4±6,8^b; O/PI50: 41,5±2,6^c; %±ES $p < 0,05$ a vs b y c). Los pulmones se instilaron y fijaron con formalina. La histopatología pulmonar mostró una disminución de la inflamación alérgica: infiltrado peribronquial (hematoxilina/PAS): O/PBS: 8±0,6^a; O/PI20: 7,6±0,5; O/PI50: 5,8±0,3^c, índice±ES $p < 0,05$ a vs c; células productoras de mucus (hematoxilina/PAS): O/PBS: 3±0,2^a; O/PI20: 2,2±0,2^b; O/PI50: 2,1±0,2^c; índice±ES, $p < 0,01$ a vs b y c. Los datos obtenidos muestran que con ambas dosis de TgPI-1 se observa un efecto modulador. Estos resultados abren la posibilidad del estudio de la TgPI-1 como candidato potencial para el tratamiento de alergias respiratorias.

567. (797) PAPEL DE LA INTERACCIÓN GALECTINA1-GLICANOS EN LA MODULACIÓN DEL COMPARTIMIENTO DE LINFOCITOS T REGULATORIOS

Méndez Huergo, S.¹, Dalotto, T.¹, Toscano, M.¹, Croci, D.¹, Cerliani, J.¹, Salatino, M.¹, Rabinovich, G.^{1,2}
Instituto de Medicina y Biología Experimental¹ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA²

Los linfocitos T regulatorios (Treg) son esenciales para mantener la tolerancia periférica, prevenir enfermedades autoinmunes, y limitar procesos inflamatorios crónicos. Previamente, demostramos que la glicosilación diferencial de linfocitos Th1, Th2 y Th17 regula su susceptibilidad a la apoptosis inducida por galectina-1 (Gal-1). En el presente trabajo examinamos el impacto funcional de Gal-1 sobre células Treg y su diferenciación a partir de linfocitos T CD4+ vírgenes (Tn). El análisis de glicanos de Treg naturales reveló un glicofenotipo no permisivo a la unión de Gal-1 (HPA^{lo}, PNA^{int}, SNA^{hi}, PHA^{hi}, LEL^{lo}, MALI^{hi}). Esto fue observado también en Treg inducibles (iTreg) por espectrometría de masa de N-glicanos de iTreg vs T activadas (Tact). Observamos que iTreg presentan menor capacidad de unir Gal-1 ($p < 0,01$) y mayor expresión de la glicosiltransferasa ST6Gal1 (2,25 veces más que Tact). Efectivamente, cuando células Tn se diferencian hacia iTreg disminuyen su capacidad de unir Gal-1, y aumentan progresivamente el contenido de ácido siálico en posición alfa2,6 (ASa2,6). In vivo, observamos que en ratones que cursan un proceso inflamatorio, células CD4⁺CD25⁺FR4⁺ (Foxp3⁺) presentan mayor capacidad de unir Gal-1 que células Treg ($n=3$; $p < 0,01$). Células iTreg presentaron menor susceptibilidad a la apoptosis inducida por Gal-1 vs Th17 (6,6 veces). Sin embargo, al diferenciar linfocitos Tn a iTreg durante 4 días en presencia de TGF-β (concentración subóptima) y Gal-1 se observó un porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ significativamente mayor que en ausencia de Gal-1 ($p < 0,05$ vs TGF-β). Concluimos que: a) El ASa2,6 en iTreg impide la acción pro-apoptótica de Gal-1; b) Gal-1 amplifica la diferenciación de células iTreg en presencia de TGF-β. Estos resultados indican que Gal-1 favorece la polarización hacia una respuesta de linfocitos Treg tanto indirectamente, al eliminar selectivamente linfocitos Th1 y Th17 como directamente, al promover su diferenciación.

NEUROCIENCIAS 6

568. (577) NORMALIZACIÓN DEL PESO CORPORAL EN UN MODELO DE OBESIDAD EXTREMA MEDIANTE RESCATE GENÉTICO PRECOZ

Bumaschny, V.^{1,2,3}; Casas-Cordero, R.¹; Yamashita, M.⁴; De Souza, F.^{1,2,3}; Otero-Corchon, V.⁴; Low, M.⁴; Rubinstein, M.^{1,2,3}
 INGEBI¹ CONICET² UBA³ Universidad de Michigan⁴

La obesidad es un trastorno crónico que afecta a ~500 millones de adultos en el mundo y se asocia a deterioro crónico de la salud. Como la pérdida de peso alcanzada por los tratamientos es modesta y existe una alta tasa de recidiva nos preguntamos si en los pacientes obesos se producen cambios irreversibles en el balance energético como producto de su sobrepeso. Para contestar esta pregunta generamos un ratón portador de una mutación *reversible* que impide la expresión del gen de la proopiomelanocortina en el hipotálamo (*arcPomcKO*). Estos ratones son obesos por la hiperfagia que provoca la falta de las melanocortinas anorexígenas derivadas de *Pomc*. Estos ratones fueron cruzados con otros que expresan una recombinasa Cre inducible por tamoxifeno (Cre-ERT) cuya actividad revierte la mutación de *Pomc*. Para estudiar la influencia del sobrepeso al inicio del tratamiento recuperamos la expresión de *Pomc* inyectando tamoxifeno a ratones *arcPomcKO:Cre-ERT* con peso normal (a los 25 días postnatales, P25), y con obesidad moderada (P60) o severa (P180). El rescate de *Pomc* en P25 previno el desarrollo de obesidad indicando un balance energético normal en ratones que nunca fueron obesos. La recuperación de *Pomc* en P60 y P180 disminuyó la ingesta y el sobrepeso: las hembras tratadas en P60 redujeron su sobrepeso del 61 al 17% y los machos del 54 al 24%, siendo mayor el sobrepeso residual en los tratados en P180. En otro experimento demostramos que si se restringe la ingesta de ratones *arcPomcKO:Cre-ERT* y se recupera *Pomc* en P60 (mientras tienen un peso normal) una vez restituida la ingesta *ad libitum* los ratones no desarrollan obesidad. Estos experimentos demuestran que el sobrepeso induce una desregulación del balance energético que sólo es parcialmente reversible. Nuestro trabajo muestra por primera vez que la recuperación de la expresión de *Pomc* puede restablecer el control saciador y evidencia la importancia del tratamiento precoz para la recuperación total de un peso normal.

569. (643) ALTERACIONES SINÁPTICAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO

Codagnone, M.^{1,2}; Podestá, M.^{1,2}; Uccelli, N.¹; Reinés, A.^{1,2}
 Instituto de Biología Celular y Neurociencia de Robertis IBCN UBA-CONICET¹ Cátedra de Farmacología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA²

El autismo es un trastorno del desarrollo actualmente categorizado como una sinaptopatía. En éste trabajo nos propusimos caracterizar las alteraciones neuronales y sinápticas hipocampales en un modelo experimental de autismo generado por la administración prenatal de Ácido Valproico (VPA). Para ello realizamos una evaluación de la citoarquitectura y de marcadores estructurales (sinaptofisina, SYN) y de adhesividad sináptica (molécula de adhesión celular 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. Sin embargo, el comportamiento maternal de las hembras VPA, evaluado en el *pup retrieval test* como la latencia al *retrieval* de sus crías, no presentó diferencias respecto del control. Al evaluar la conducta de los animales VPA en la adolescencia temprana se observó una reducción en la actividad exploratoria y una tendencia a la menor interacción entre pares durante 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 una disminución de SYN y un incremento de NCAM en el CA3 del hipocampo, concomitantemente con una disminución de PSA-NCAM que también se observó 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, de un déficit de marcadores sinápticos y de una disminución del marcador de remodelado PSA-NCAM,

sugiriendo una alteración en la conectividad sináptica. La desorganización neuronal acompañada de alteraciones en la sinapsis podrían en suma representar las bases neurales del autismo.

570. (649) SOBRECARGA AGUDA DE FE: EFECTO SOBRE EL METABOLISMO OXIDATIVO EN CEREBRO

Piloni, N.; Puntarulo, S.
 IBIMOL UBA CONICET; Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

El Fe es imprescindible y tóxico para las células y su concentración en el cerebro está regulada para prevenir el daño dependiente del Fe como catalizador de la generación de radicales libres. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el metabolismo oxidativo dependiente de Fe luego de la exposición a una sobrecarga aguda. Ratas Sprague-Dawley fueron inyectadas intraperitonealmente (ip) con solución salina (grupo control) o con una dosis única de Fe-dextrán 500 mg/kg. Los animales fueron sacrificados 6 h después de la administración de Fe. El contenido total de Fe (evaluado espectrofotométricamente) resultó de 0.6 ± 0.2 y 5 ± 1 pmol/microg PF en el cerebro proveniente de animales controles y tratados, respectivamente. El contenido de Fe lábil (LIP) ($Fe^{2+} + Fe^{3+}$), evaluado mediante una técnica fluorescente empleando el sensor de Fe calceína, mostró un aumento de 2.5 veces en las ratas tratadas en comparación con las controles (3.8 ± 0.5 pmol/mg PF). La oxidación de diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), como índice de generación de especies reactivas, disminuyó un 36% con respecto a los controles al cabo de 6 h de tratamiento. Sin embargo, el contenido de radical ascorbilo (A*), evaluado por Espectrometría de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), resultó de 0.14 ± 0.01 nmol/mg PF en los cerebros controles y aumentó un 57% en los cerebros sobrecargados con Fe. La actividad de catalasa, medida espectrofotométricamente, no se modificó al cabo de 6 h de la administración de Fe. Estos resultados sugieren una activa protección, probablemente por relocalización celular del Fe, ya que el contenido de Fe catalíticamente activo pasó de ser 6% en los controles a ser 0.18% en los sobrecargados, evitándose un incremento significativo de la oxidación de DCFH-DA. Sin embargo, el aumento en el valor absoluto del LIP permitió que ciertos radicales estables (e.g. A*) aumentarían significativamente indicando que se han disparado los mecanismos oxidativos.

Financiado por UBA y CONICET

571. (736) EL 17 β -ESTRADIOL MEJORA LA SOBREVIDA DE CÉLULAS NEURONALES EN CULTIVO SOMETIDAS A HIPOXIA POR CLORURO DE COBALTO

Castilla, R.¹; Escoll-Guerrero, M.²; Logica, T.¹; Saraceno G, E.¹; Capani, F.¹; Wandosell-Jurado, F.²
 Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Pr. Dr. Alberto C. Taquini, ININCA UBA-CONICET¹ Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Univ. Autónoma de Madrid, España²

Un insulto hipóxico, producido como consecuencia de una isquemia o por una deficiencia en el suministro de oxígeno, es uno de los principales factores que induce lesiones neuronales. Se ha demostrado en diversos modelos animales de neurodegeneración que el estradiol ejerce efectos neuroprotectores. Estudios recientes sugieren al estradiol como una posible herramienta terapéutica frente a un daño hipóxico, al disminuir la gliosis reactiva y favorecer la supervivencia neuronal. Sin embargo, no se ha estudiado la acción directa del estradiol agregado luego de un evento hipóxico sobre células neuronales. Nos propusimos estudiar si el 17 β -estradiol actúa como neuroprotector ante un proceso hipóxico desencadenado por el $CoCl_2$ sobre neuronas hipocampales y corticales de ratón en cultivo y sobre células de la línea SH-SY5Y de neuroblastoma humano y además analizar a través de cuál de sus receptores (ERs) ejerce esta acción. En todos los casos la supervivencia celular fue evaluada utilizando el ensayo de MTT. Tanto las células neuronales hipocampales, corticales como las SH-SY5Y sometidas a 16 hs de hipoxia con $CoCl_2$ y que fueron posteriormente tratadas con 17 β -estradiol (250 μ M) durante 24 hs mostraron una mayor supervivencia comparadas con

las células tratadas sólo con CoCl_2 . El efecto neuroprotector del 17β -estradiol fue bloqueado en presencia del inhibidor de los $\text{ER}\alpha$ y $\text{ER}\beta$ (ICI182780, 10 nM). Cuando en lugar de estradiol se utilizó el agonista del $\text{ER}\alpha$ (PPT, 10nM) o el agonista del $\text{ER}\beta$ (DPN, 10 nM), sólo la activación del $\text{ER}\alpha$ favoreció un incremento en la sobrevida celular en presencia de CoCl_2 . La neuroprotección por estradiol analizada en células a las que se les disminuyó la expresión de los $\text{ER}\alpha$ o $\text{ER}\beta$ por iRNA sólo se evidenció en células que expresaban el $\text{ER}\alpha$. Estos resultados indican que la administración tardía del 17β -estradiol actúa directamente sobre las células neuronales revirtiendo la muerte desencadenada por hipoxia y que utiliza la vía de transducción que involucra al $\text{ER}\alpha$.

572. (765) HIPPOCAMPAL NMDA RECEPTOR SUBUNITS GLUN1 AND GLUN2A INCREASE AFTER PLASTICITY INDUCTION

Baez, M.; Cercato, M.; Snitcowsky, M.; Aguirre, A.; Oberholzer, M.; Jerusalinsky, D.

IBCN Facultad de Medicina, UBA

NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors (NMDAR) are heterotetrameric transmembrane proteins composed by two GluN1 obligatory subunits and two regulatory subunits: GluN2 (A-D) or GluN3 (A-B) (Paoletti 2011). Most of them contain GluN2 (Monyer et al. 1994), being GluN2A and GluN2B the major regulatory subunits in the forebrain, particularly in the hippocampus, where NMDAR are believed to play a determinant role in synaptic plasticity, learning and memory acquisition. In this work, we analyzed putative changes in the NMDAR subunits expression after synaptic plasticity induction or memory acquisition, particularly in adults. GluN1, GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits were assessed by westernblot in 1) adult rats left to explore an open field (OF) for 5 minutes, which leads to habituation, 2) mature primary cultures of rat hippocampal neurons stimulated by KCl and 3) hippocampal slices from adult rats, where LTP was induced by theta-burst stimulation. We observed similar changes in the three models: GluN1 and GluN2A expression increases after 30 minutes, peaks at 60-70 minutes and then declines. The increase in GluN2A could also be interpreted as a protective change to avoid excitotoxicity, since it was reported that activation of GluN2B-containing receptors (but not of GluN2A) leads to excitotoxicity and cell death (Taghibiglou et al. 2009). Further investigation is necessary to find out if these changes are related to neuroprotection, memory consolidation and L-LTP establishment.

573. (786) ROL DEL SISTEMA OPIOIDE (SO) EN LA SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL) DURANTE LA LACTANCIA EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY Y OFA (HR/HR)

Pennacchio, G.¹; Ayala, C.²; Jahn, G.¹; Valdez, S.^{1,3}; Soaje, M.^{1,2}
IMBECU- CCT-CONICET MENDOZA¹ Facultad de Ciencias Médicas UNCuyo² Instituto de Ciencias Básicas UNCuyo³

Las ratas de la cepa OFA *hr/hr* derivan por mutación espontánea de la cepa Sprague Dawley (SD). Se caracterizan por tener lactancia deficiente y un elevado tono dopaminérgico. El SO regula la secreción de PRL en la lactancia normal modulando la actividad dopaminérgica hipotalámica. **Objetivo:** realizar un estudio comparativo del rol del SO en la secreción de PRL inducida por succión en ratas de las cepas SD y OFA y establecer su correlación con la actividad dopaminérgica y con los niveles séricos de PRL. **Metodología:** se usaron ratas SD y OFA en el día 10-12 de lactancia, con lactancia continua (LC), separadas de sus crías durante 12 h (S/ss) y otro grupo separada de sus crías por 12 h con posterior reposición de crías y sometidas a succión durante 2 h y 4 h. Se estableció por real time PCR la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), encefalinas (ENK) y de los receptores μ y κ opioides ($\text{RO}\mu$ y $\text{RO}\kappa$) en HMB. Los niveles séricos de PRL fueron 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: 6-8). **Resultados:** en correlación inversa con los niveles de PRL, se observó una disminución significativa de la expresión de TH en ambas cepas en los grupos LC y S/cs 4 h comparados con madres separadas de sus crías. La succión por

2 h disminuyó la expresión de TH solo en las ratas OFA ($p < 0.05$ vs S/ss). La expresión de ENK disminuyó significativamente en S/ss comparada con LC en ambas cepas de ratas y 2 ó 4 h de succión no fueron suficientes para restablecer los niveles de ENK equivalentes a la LC en las ratas OFA. La succión disminuyó la expresión de los $\text{RO}\mu$ y $\text{RO}\kappa$ solo en las ratas OFA ($p < 0.05$ vs S/ss). **Conclusiones:** en respuesta al estímulo de la succión y/o niveles elevados de PRL, las ratas OFA responden temporalmente más rápido que las SD en términos de TH, $\text{RO}\mu$ y $\text{RO}\kappa$ sugiriendo un patrón de respuesta durante la lactancia diferente entre ambas cepas de ratas.

574. (817) GALECTINA-1 DESACTIVA LA MICROGLIA A TRAVÉS DE LA UNIÓN A CORE 2- O-GLICANOS EN CD45 Y SU RETENCIÓN EN LA SUPERFICIE CELULAR

Mascanfroni, I.; Coci, D.; Cerliani, J.; Hernandez, S.; Starossom, S.; Delacour, D.; Leishman, C.; Khoury, S.; Rabbinovich, G.

Instituto de Biología y Medicina Experimental IBYME-CONICET

La microglía activada clásicamente (M1) juega un papel clave en procesos de neurodegeneración inducidos por inflamación. En trabajos previos demostramos que Gal1 desactiva la microglía suprimiendo la inflamación durante la encefalomyelitis autoinmune experimental. En función de la glicosilación abundante de CD45, glicoproteína con actividad de fosfatasa expresada en estas células, hipotetizamos que Gal1 interactuaría con glicanos presentes en CD45 promoviendo la desactivación de la microglía. Experimentos de co-inmunoprecipitación y microscopía confocal de células microgliales tratadas con Gal1, revelaron interacciones específicas entre Gal1 y CD45. El análisis por citometría de flujo de células no permeabilizadas demostró retención de CD45 en la superficie de células M1 estimuladas con LPS y expuestas a Gal1, llevando a la desactivación de la microglía ($p < 0.01$). Se observó una disminución en la colocalización de CD45 y EEA1 (marcador endosomal temprano) en microglía estimulada con LPS y Gal1 comparado con células estimuladas sólo con LPS. La unión de Gal1 a CD45 aumentó la actividad fosfatasa de dicha glicoproteína ($p < 0.001$), efecto que fue revertido en presencia de un inhibidor específico de CD45. A los fines de evaluar la contribución de N- y O-glicanos a este efecto, células de microglía fueron transfectadas con ARN de interferencia para C2GnT1 y GnT5, dos glicosiltransferasas críticas para la biosíntesis de ligandos de Gal1. La inhibición de la elongación de core2-O-glicanos por silenciamiento de C2GnT1 eliminó casi por completo la interacción entre CD45 y Gal1 como así también la actividad fosfatasa de CD45 inducida por Gal1, mientras que la interrupción N-glicanos complejos no tuvo efecto. En conclusión Gal1 interactúa con O-glicanos presentes en CD45, promoviendo retención de CD45 en la superficie celular, aumentando su actividad fosfatasa y prolongando la transmisión de señales inhibitorias que llevan a la desactivación de la microglía.

ENDOCRINOLOGÍA 5

576. (59) CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CUATRO NUEVAS MUTACIONES HETEROCIGOTAS EN EL GEN IGF1R EN PACIENTES NO RELACIONADOS CON RETARDO DE CRECIMIENTO PRE Y POSTNATAL Y MICROCEFALIA

Juanes, M., Marino, R., Berensztein, E., Guercio, G., Warman, D., Ciaccio, M., Gil, S., Rivarola, M., Belgorosky, A.
Hospital de Pediatría Dr. J.P. Garrahan

Componentes del sistema de los IGFs son expresados a lo largo de la vida pre y postnatal, regulando el desarrollo de la mayoría de los tejidos y órganos. Se han descrito 19 mutaciones en el gen del receptor de IGFs tipo 1 (IGF1R) en pacientes con fenotipo clínico y hormonal de insensibilidad a IGF-1. Con el objetivo de analizar alteraciones en el gen que codifica para el IGF1R se estudiaron

cuatro pacientes con diagnóstico compatible de insensibilidad a IGF-1 (recién nacidos pequeños para la edad gestacional, microcefalia, fenotipo dismórfico y retardo de crecimiento postnatal). En el ADN genómico se detectaron, por secuenciación automática, cuatro nuevas variantes heterocigotas: Ex4:N359Y (P1), Ex12:Y865C (P2) y Ex21:R1256S (P3) y R1337C (P4). La ausencia de estas variantes en 120 alelos analizados de controles normales sugiere que no se trataría de polimorfismos comunes en la población. Por medio de ensayos in silico (Polyphen, SIFT y Mutation Taster) se predice que estas mutaciones afectarían la funcionalidad del receptor. Para confirmar el efecto deletéreo de las variantes halladas se evaluó la síntesis de ADN, mediante incorporación de ^3H timidina en cultivo primario de fibroblastos de P1, P2, P3, P4 y en dos sujetos controles (C1 y C2). Se evaluó la respuesta al estímulo con IGF-1 (50ng/ml) a las 16, 20 y 24 hs. Se observó un aumento significativo en la síntesis de ADN (con respecto a la condición basal) a las 20 hs de estimulación en C1 y C2 (5.15 ± 0.67 y 6.37 ± 1.00 veces de incremento, respectivamente). Análisis de ANOVA y Student Test con un $p < 0.05$ mientras que en P1, P2, P3 y P4 no se observó cambios significativos en respuesta al estímulo. Reportamos y caracterizamos funcionalmente cuatro nuevas mutaciones heterocigotas en el gen IGF1R que afectan in vitro la proliferación celular inducida por IGF-1. Estos hallazgos sugieren que las variantes encontradas son la causa del fenotipo clínico de los pacientes estudiados con severo retardo de crecimiento pre y postnatal.

576. (262) CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE TRES NUEVAS MUTACIONES DEL GEN CYP11B1 EN LA DEFICIENCIA DE 11BETA-HIDROXILASA

Ramírez, P.¹, Marino, R.¹, Parajes, S.², Pérez Garrido, N.¹, Maceiras, M.¹, Rose, I.², Warman, D.¹, Rivarola, M.¹, Krone, N.², Belgorosky, A.

Hospital de Pediatría Garrahan¹ Centre for Endocrinology, Diabetes and Metabolism, University of Birmingham, United Kingdom²

Introducción: La deficiencia de 11 β -hidroxilasa (11 β -OHD) es la segunda causa más frecuente (5-8%) de hiperplasia suprarrenal congénita y resulta de mutaciones homocigotas o heterocigotas compuesto del gen CYP11B1. **Objetivo:** Detectar mutaciones del gen CYP11B1 en tres pacientes con 11 β -OHD. Describir características clínicas y endocrinológicas. Analizar las consecuencias funcionales de tres nuevas mutaciones del gen CYP11B1. **Diseño del estudio:** Secuenciación de las regiones codificantes e intrónicas flanqueantes del gen CYP11B1 en todos los pacientes y sus padres. Los estudios funcionales se realizaron utilizando un sistema de expresión in vitro en células COS7 comparando la actividad de las variantes CYP11B1 normal y mutada. **Casos clínicos:** Se estudiaron dos varones y una mujer. La niña presentó ambigüedad genital al nacer. Ambos niños presentaron signos de virilización (vello pubiano, estimulación del pene y edad ósea avanzada) a los 3 y los 7,7 años de edad. El mayor presentó también ginecomastia bilateral. Los estudios hormonales fueron compatibles con diagnóstico de deficiencia de 11 β -OHD. El tratamiento con hidrocortisona se inició con buena respuesta en todos ellos. **Resultados:** Todos los pacientes presentaron mutaciones en el gen CYP11B1 en ambos alelos. Tres nuevas mutaciones fueron identificadas: p.R453W y p.L407F tenían 0% de actividad 11 β -hidroxilasa relativa al normal, mientras que la mutación p.R138C presentó actividad funcional parcial (9,8% del normal) **Conclusión:** Se describen tres nuevas mutaciones del gen CYP11B1. El análisis funcional nos ha permitido la caracterización de la actividad residual de los tres mutantes. No fue posible diferenciar si la mutación p.R138C, que conserva el 9,8% de la actividad del normal, es una variante que afecta a la esteroidogénesis prenatal o postnatal temprana ya que se encontró en un varón afectado. Nuestro estudio proporciona información importante para el asesoramiento clínico y genético.

577. (778) IDENTIFICACIÓN DE TRES NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLOBULINA TRANSPORTADORA DE TIROXINA (TBG) RESPONSABLES DE DEFICIT COMPLETO DE TBG

TADORA DE TIROXINA (TBG) RESPONSABLES DE DEFICIT COMPLETO DE TBG

Olcese, M., Osorio Larroche, C., Belforte, F., Citterio, C., Targovnik, H., Rivolta, C.

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo, CO-NICET-UBA

Las principales proteínas transportadoras de tiroxina son: la globulina transportadora de tiroxina (TBG) y la transtiretina (TTR) responsables del 75% y 20% del transporte respectivamente. El gen de TBG, mapea en el cromosoma X. Mutaciones en el mismo son responsables de distintos fenotipos como Deficiencia Completa (TBG-CD) y deficiencia parcial de TBG (TBG-PD). El gen de TTR, mapea en el cromosoma 18 y cuando muta origina variantes con afinidad alterada por T4 con un patrón de herencia autosómico dominante. Cuatro pacientes argentinos no emparentados con diagnóstico bioquímico de déficit de TBG, fueron analizados (Pacientes 1, 2, 3 y 4). En el Paciente 1, como consecuencia de la discordancia entre los valores de hormonas tiroideas totales, libres y el valor de TSH se sospechó de una segunda alteración en otra proteína transportadora. Con el objeto de identificar las mutaciones responsables de la patología, se amplificaron por PCR y secuenciaron en todos los pacientes los exones del gen de TBG y los del gen de TTR en el Paciente 1. En aquellos casos en los que las alteraciones identificadas no se encontraban descritas, se determinó mediante un estudio poblacional si las mismas correspondían a polimorfismos o a mutaciones mediante las técnicas SSCP o RFLP. El Paciente 1 portó una nueva mutación en el gen de TBG, una transversión hemicigota c.251C>A; p.A64D y una mutación descrita en el gen de TTR, una transición heterocigota c.385G>A; p.A109T que aumenta la afinidad por T4. Una nueva mutación (g.IVS1+2delT) en el gen de TBG fue identificada tanto en la Paciente 2 como en el Paciente 3 con presencias alélicas heterocigota y hemicigota respectivamente. En la paciente 4 se identificó una transversión heterocigota c.1057G>T; A333S no descrita previamente. El análisis molecular incrementa nuestro conocimiento sobre las bases de la fisiopatología tiroidea y contribuye al diagnóstico preciso y tratamiento adecuado.

578. (98) GEN DE LA TIROGLOBULINA: GENOTIPOS COMPLEJOS ASOCIADOS A BOCIO E HIPOTIROIDISMO

Citterio, C., Machiavelli, G., Olcese, M., Belforte, F., Rivolta, C., Targovnik, H.

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo, CO-NICET-UBA

La tiroglobulina humana (TG) es un gen de copia única de 270 Kb localizado en el cromosoma 8q24 y organizado en 48 exones. Mutaciones en el mismo producen bocio e hipotiroidismo con herencia autosómica recesiva. El objetivo de este trabajo fue caracterizar nuevos mecanismos moleculares implicados en la dishormonogénesis tiroidea. Se realizaron análisis de secuenciación de ADN, genotipificación y bioinformáticos en 6 individuos de tres familias no relacionadas, con bocio, hipotiroidismo y TG sérica baja. Por secuenciación de los 48 exones de TG se identificaron: 3 variaciones de secuencia nuevas: c.2359C>T (p.R768X), c.6000C>G (p.C1981W) y c.6605C>G (p.P2183R); una mutación previamente identificada: c.886C>T (p.R277X); y una posible inserción o delección en el exon 48. Los genotipos asociados a los afectados resultaron ser homocigota para la inserción o delección del exón 48, compuesto heterocigota complejo p.R277X/p.C1981W-p.P2183R o heterocigota con 1 sola mutación detectada p.R768X. En la evaluación de la inserción o delección del exón 48 se utilizó PCR cuantitativa para determinar la dosis alélica y para localizar los puntos de ruptura se diseñaron una serie de primers para obtener fragmentos de PCR en la región del intrón 47, en la zona intergénica y en el gen WISP1, el cual se ubica hacia 3' de TG. Los resultados indican que la mutación estaría circunscripta al exón 48 y que se trataría de una amplia inserción que no lo detecta en forma directa la PCR convencional. Por bioinformática se observó que la mutación p.P2183R afecta la estructura secundaria de la proteína y que el doble mutante p.C1981W-p.P2183R incrementa la modificación, sin embargo no es suficiente para el

desarrollo de hipotiroidismo, el cual se manifiesta al asociarse p.C1981W-p.P2183R con otro alelo mutado. En conclusión, los resultados confirman la heterogeneidad de los defectos genéticos en TG y contribuyen al conocimiento molecular del desarrollo de la dishormonogénesis tiroidea.

579. (63) ¿LA OBESIDAD COMIENZA EN EL CEREBRO? MECANISMOS NEUROREGULATORIOS DE APETITO/SACIEDAD EN UN MODELO DE OBESIDAD EXPERIMENTAL

Andreoli, M.^{1,2}, Stoker, C.^{1,2}, Rossetti, M.^{1,2}, Luque, E.², Ramos, J.^{1,2}

Dpto Bioq. Clínica - Fac. de Bioquímica - Univ. del Litoral¹
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, FBCB, UNL.²

La obesidad suele relacionarse a altas ingestas de grasa, contribuyendo a la resistencia a leptina e insulina y alterando el metabolismo. El hipotálamo recibe y traduce señales relacionadas al status energético, produciendo los péptidos orexígenos NPY (neuropéptido Y) y AgRP (proteína relacionada al agouti) y los anorexígenos CART (transcripto relacionado a cocaína-anfetaminas) y POMC (pro-opiomelanocortina). El objetivo fue caracterizar alteraciones metabólicas y neuroendócrinas en un modelo de obesidad experimental. Ratas macho Wistar fueron alimentadas con dieta grasa (HF, 60 %kcal) o con dieta control (5 %kcal) por 6 semanas. Durante la experiencia se midió ingesta de alimento y peso corporal; al final se sacrificaron los animales, se recolectó sangre troncal, se disecó el hipotálamo y se pesaron parches de tejido adiposo. Posteriormente se evaluó expresión hipotalámica de NPY, AgRP, POMC, CART, receptores de leptina e insulina utilizando RT-PCR cuantitativa. Se midieron niveles circulantes de glucosa, triglicéridos y colesterol. Los animales del grupo HF incrementaron su peso corporal 36% más que los del grupo control (p<0,01). Esto se relacionó a un aumento de 32% en la ingesta energética (p<0,01) y de 70% del peso de los parches de tejido adiposo (p<0,001). Aunque los niveles circulantes de triglicéridos no se modificaron, los de colesterol incrementaron 13% (p<0,001) y los de glucosa 28% (p<0,01). La ingesta de HF incrementó 68% la expresión de POMC (p<0,05) y disminuyó 35% la de NPY (p<0,05). AgRP, CART y receptores de leptina e insulina no fueron modificados. Estos resultados muestran que el tratamiento generó un marcado cuadro de obesidad. El incremento de POMC y la disminución de NPY representarían una respuesta homeostática insuficiente al exceso energético ingerido. En próximos experimentos pretendemos conocer si cambios en las proteínas dietarias pueden completar esta respuesta homeostática, disminuyendo la ingesta energética en animales obesos.

580. (358) DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO SECUNDARIA AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO EN RATAS POR DIETA RICA EN FRUCTOSA: EFECTO PREVENTIVO DE LA APOCININA

Fariña, J.¹, García, M.¹, Alzamendi, A.², Giovambattista, A.², Marra, C.³, Spinedi, E.², Gagliardino, J.¹

CENEXA UNLP CONICET La Plata¹ Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CICPBA-CONICET), La Plata² INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata; UNLP-CONICET), La Plata³

Introducción: la administración de dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce estrés oxidativo (EO) y una disfunción del tejido adiposo abdominal (TAA).

Objetivo: analizar el efecto de un antioxidante (apocinina, A), sobre el aumento de marcadores de EO producido por DRF en plasma y tejido adiposo abdominal (TAA) y la función de adipocitaria. **Métodos:** alimentamos ratas Wistar macho adultas durante 21 días con dieta comercial estándar sin (C) o con 10% de fructosa en agua de bebida (DRF); en ambos casos se agregó un grupo tratado con A (5mM en agua de bebida; CA y DRFA). En plasma se midió glucemia (G), triglicéridos (TG), insulina (I), fructosamina (F) y leptina (LP); en TAA composición de ácidos grasos (CAG) y sistema antioxidante (SA). En TAA incubado, CAG liberados al medio. **Resultados:** las ratas DRF aumentaron signifi-

cativamente sus niveles plasmáticos de TG (DRF vs. C: 1.72±0.06 vs. 0.87±0.05 mmol/L, p<0.001), LP (DRF vs. C: 6.43±0.51 vs. 4.90±0.34 ng/mL, p<0.02), y HOMA-IR (DRF vs. C: 5.271±0.011 vs 2.981±0.001, p<0.001), mientras que G, I y F permanecieron sin cambios significativos. En el TAA de las ratas DRF aumentó la relación ácidos grasos saturados (AGSat) respecto a los no saturados (\sum Sat./ \sum PUFAs: DRF vs. C: 3.5±0.1 vs 2.2±0.1, p<0.001). El SA de DRF disminuyó significativamente con respecto a C (GSH/GSSG: DRF vs. C: 3.09±0.05 vs. 7.01±0.11 nmol/g, p<0.05). La relación de AGSat liberados al medio fue significativamente mayor en DRF vs. C (\sum Sat./ \sum PUFAs: 19.7±3.0 vs. 5.2±0.6, p<0.025). La co-administración de A previno el desarrollo de todos los cambios mencionados. **Conclusión:** los resultados obtenidos sugieren que la disfunción del TAA de las ratas con DRF es secundaria al desarrollo del estrés oxidativo inducido por el exceso del aporte de fructosa. En consecuencia la A sería potencialmente útil para la prevención y tratamiento de situaciones de estrés oxidativo.

ONCOLOGÍA 7

581. (338) EL INHIBIDOR DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDO HIALURÓNICO, 4-METILUMBELIFERONA, INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES LEUCÉMICAS HUMANAS MEDIANTE ARRESTO DEL CICLO CELULAR Y MODULACIÓN DE AKT

Lompartía, S.; Papademetrio, D.; Mascaró, M.; Simunovich, T.; Alvarez, E.; Hajos, S.

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, IDEHU-CONICET

El ácido hialurónico (AH), componente de la matriz extracelular, cumple numerosas funciones fisiológicas. En tumores sólidos se ha descrito un incremento de sus niveles que dispara señales proliferativas a través de CD44 y RHAMM activando las vías de PI3K/Akt y MAPK. Sin embargo poco se sabe de su acción en procesos oncohematológicos. Previamente hemos informado que las líneas celulares leucémicas humanas, K562 y Kv562 (sensibles y resistentes a vincristina (VCR) respectivamente) secretan AH y son capaces de interaccionar con AH. Además el tratamiento con AH estimula su proliferación (en K562 a través de CD44 y la activación de Akt y ERK mientras que en Kv562 a través de RHAMM y Akt). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de 4-metilumbeliferona (4MU) (reconocido inhibidor de la síntesis de AH) sobre la proliferación de dichas células. Mediante incorporación de ³HT se observó que 4MU 500µM inhibió 40±4% la proliferación de K562 y 51±6% la de Kv562 (p≤0.01). La dosis de 100µM de 4MU inhibió 20±6% y 15±4% la proliferación celular de K562 y Kv562 (p≤0.05). Dichos efectos se revirtieron al coincubar ambas dosis de 4MU con AH 300µg/ml (p≤0.01). Por citometría de flujo (CF) se evaluó la viabilidad celular (FDA-IP) y el ciclo celular (DAPI). No se observó muerte celular para los tratamientos previamente descritos (p>0.05). Sin embargo el tratamiento con 4MU 500µM arrestó el ciclo celular en G₂/M (p≤0.001), mientras que el cotratamiento con AH restituyó los valores basales (p≤0.001). Mediante WB se evaluó el efecto de 4MU sobre la modulación de Akt. Se observó una disminución significativa de la relación pAkt/Akt para los tratamientos con 4MU, dicha relación se encontró incrementada para el cotratamiento con 4MU-AH (p≤0.01). Se concluye que la inhibición de la síntesis de AH disminuiría la proliferación de ambas líneas celulares probablemente por la regulación negativa de Akt y el arresto del ciclo celular en G₂/M.

582. (585) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIADA POR MECANISMOS GENÓMICOS Y NO GENÓMICOS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOMAS T HUMANOS POR HORMONAS TIROIDEAS (HT)

Cayrol, F.¹; Díaz Flaqué, M.¹; Genaro, A.²; Fariás, R.³; Cerchietti, L.⁴; Cremaschi, G.⁵

Instituto de Investigaciones Biomédicas-UCA¹ CEFYBO-CONICET² INSIBIO-CONICET³ Weill Cornell Medical College of Cornell University, USA⁴ Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina⁵

Los linfomas T son un grupo heterogéneo de desórdenes linfoproliferativos de mal pronóstico por su curso clínico agresivo y por la falta de tratamientos específicos. Varias evidencias sugieren la participación de las HT en la tumorigénesis y diseminación tumoral. En estudios previos demostramos que las HT inducen la proliferación de linfomas T murinos. En este trabajo estudiamos el rol de las HT sobre 8 líneas celulares de distintos subtipos de linfomas T humanos (cutáneos y sistémicos). Para diferenciar los efectos genómicos mediados por TRs, de los no genómicos inducidos por un receptor de membrana, se usaron HT libres y acopladas a agarosa (HT-ag, incapaces de entrar a la célula). En las distintas líneas celulares se evaluó la proliferación, la fosforilación de ERK, la expresión de varios marcadores fenotípicos y los genes de integrinas con sitio de unión para RGD (péptido inhibidor de acciones no genómicas de HT), TRa, TRb, BCL6, TRAIL, PCNA y p53, a distintos tiempos de tratamiento. Los resultados mostraron en todas las líneas celulares, la inducción de la proliferación (entre 20-40% aumento HT o HT-ag vs control sin tratar, $p < 0.05$) y el aumento de la activación de ERK. Los efectos proliferativos fueron bloqueados por el péptido RGD ($p < 0.05$). Se comprobó por qRT-PCR que las HT libres y HT-ag aumentaron la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 11\text{B}$, αL , αV , $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$. Adicionalmente, las HT y HT-ag fueron capaces de regular positivamente la expresión de TR a y b ($p < 0.05$) y de los genes BCL6, p53 y TRAIL, asociado al aumento de PCNA. Estos resultados indican que las HT regularían el crecimiento de los linfomas T humanos a través de mecanismos genómicos y no genómicos y que estos últimos involucrarían una integrina con sitio de unión para RGD. Además dichos mecanismos llevarían a la regulación de la expresión de ciertas integrinas, de los TR y de varios oncogenes, puntualizando la importancia de las HT en la proliferación de los linfomas T humanos estudiados.

583. (651) LA MIFEPRISTONA INHIBE EL CRECIMIENTO DE TUMORES MAMARIOS CON ALTA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA A DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (PRA) FAVORECIENDO LA INTERACCIÓN DE DICHO RECEPTOR CON EL COREPESOR SMRT E INHIBIENDO LA EXPRESIÓN DE CICLINA D1 Y MYC

Riggio, M.; Giulianelli, S.; Wargon, V.; Novaro, V.; Lanari, C. *IByME*

En un modelo de carcinomas mamarios murinos hemos demostrado que la proporción entre la isoforma A y la isoforma B del receptor de progesterona (PRA y PRB, respectivamente) determina la respuesta de estos tumores al tratamiento con antiprogéstágenos. Sólo los tumores que expresan mayor nivel de PRA que PRB se inhiben al ser tratados con antiprogéstágenos como la Mifepristona (MFP). El objetivo de este trabajo fue validar estos resultados en líneas celulares humanas y determinar los mecanismos intracelulares que se activan generando esta respuesta diferencial dependiente de la relación PRA/PRB. Para ello utilizamos las líneas celulares de cáncer de mama humanas IBH-6 y T47D. Las células IBH-6 modificadas para sobreexpresar PRA o PRB fueron inoculadas en ratones nude y generaron tumores cuya respuesta a MFP (10 mg/kg/día) fue similar a la observada en el modelo murino. Es decir, en respuesta a MFP los tumores IBH-6 PRA se inhibieron ($p < 0.001$), mientras que los tumores IBH-6 RPB o IBH-6 controles (vector vacío) mostraron una pequeña estimulación en el crecimiento. El análisis por western blot de extractos proteicos provenientes de dichos tumores mostró que el tratamiento con MFP inhibió la expresión de Ciclina D1 y MYC sólo en tumores IBH-6 RPA ($p < 0.01$). Dado que la línea IBH-6 no responde *in vitro* al tratamiento hormonal, se utilizaron células T47D que sí se estimulan con acetato de medroxiprogesterona (MPA) y se inhiben con MFP para estudios moleculares. Demostramos *in vitro* que tratamientos cortos (30 minutos) con MFP (10 nM) aumentan la co-localización de PR con el corepcesor SMRT ($p < 0.01$) mientras que el MPA (10 nM) induce la co-localización de PR con el coactivador de la transcripción AIB1. Estos resultados sugieren que la MFP favorece la represión de genes dependientes de PR y sostiene la ventaja del uso de antiprogéstágenos en tumores de mama con un perfil de isoformas RPA mayor que PRB.

584. (487) COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE DOS ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA (QTM) EN EL TRATAMIENTO DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS MURINOS

Rico, M.; Mainetti, L.; Perroud, H.; Rozados, V.; Scharovsky, O.

Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, UNR

La QTM consiste en la administración crónica de fármacos a intervalos regulares y sin periodos de descanso. En nuestro laboratorio desarrollamos dos esquemas de QTM combinada para tumores mamarios; A) Ciclofosfamida (Cy) 30 mg/kg p.o. + Celecoxib (Cel) 30 mg/kg p.o. y B) Cy 20 mg/kg p.o. + Doxorubicina (Dox) 0.5 mg/kg i.p. Se utilizaron dos modelos de adenocarcinomas de mama espontáneos singéneos: I) M-406 y II) M-234p en ratones CBi y BALB/c, respectivamente. Nuestro objetivo fue comparar los resultados previamente obtenidos sobre eficacia y toxicidad de la QTM con los tratamientos A y B, en ambos modelos tumorales. Se analizó: efecto antitumoral y antimetastásico, supervivencia y toxicidad. El % de reducción del volumen tumoral respecto del grupo testigo sin tratamiento [mediana (rango): AI: 77.9 (50,9-89,9), AII: 84,4 (30-99,4), BI: 95,6 (57-99,6), BII: 75.5 (62,5-96,8)] no difirió entre tratamientos ni entre tumores ANOVA no paramétrica n.s. El % de reducción de la carga metastásica pulmonar [AI: 99,8 (97,1-99,2) AII: 99,7 (98,7-100), BI: 90,6 (35,9-96,6), BII: 90 (48,4-99,3)] fue significativo al incluir todos los grupos, ANOVA $P < 0,01$, dentro de los cuales sólo difirieron AII vs BII, Test de Dunn $P < 0,05$. Por otro parte, el % de aumento de la supervivencia [AI: 56,5 (4,3-56,5) AII: 77,6 (5,3-84,2), BI: 110,9 (60-308,2), BII: 36,1 (12,4-113)] fue marginalmente significativo ANOVA $P = 0,054$, difiriendo sólo AI vs BI, t no paramétrica $P < 0,01$. La toxicidad medida por el peso corporal y el recuento de glóbulos blancos fue similar para ambos modelos tumorales y tratamientos. La potencia terapéutica antitumoral de los dos esquemas de QTM fue similar, mientras que la combinación Cy + Cel fue superior a la de Cy + Dox en cuanto a poder antimetastásico y aumento de la supervivencia. El esquema Cy + Cel sería el de elección, tanto por los efectos descriptos como por la ventaja de su administración exclusiva por vía oral que redundaría en una mejor calidad de vida.

585. (479) MODULACIÓN DE TUMORIGÉNESIS POR SOBREENPRESIÓN DE CATALASA EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Bracalente, C.²; Salguero, N.¹; Notcovich, C.¹; Scodeller, P.²; Catalano, P.²; Ibañez, I.²; Duran, H.^{1,2,3}

Comisión Nacional de Energía Atómica¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas² Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín³

El melanoma surge de la transformación maligna de los melanocitos. La pérdida de pigmentación es común en melanomas avanzados debido a fallas en proteínas implicadas en melanogénesis y en la maduración del melanosoma. Por otro lado, se sabe que el H_2O_2 participa en señales asociadas a proliferación y a diferenciación. Así, los altos niveles de H_2O_2 descriptos en células de melanoma serían relevantes en la inducción del fenotipo maligno y amelanótico. A fin de evaluar la respuesta del melanoma amelanótico en la proliferación y diferenciación frente a la modulación de H_2O_2 , se generó un modelo de sobreexpresión de catalasa por transfección estable de células de melanoma humano A375 con el cDNA de la catalasa humana. Se obtuvieron tres clones A7, G10 y C10, caracterizados en cuanto a su mayor expresión y actividad de catalasa y menor proliferación respecto a los controles. En este sentido, se demostró una disminución en la activación de ERK ($p < 0.05$) evaluada por western blot. A fin de estudiar su capacidad tumorigénica, se inocularon ratones nude con estos clones, observándose respuestas diferenciales entre ellos. El clon C10 resultó no tumorigénico ($p < 0.01$), el clon G10 presentó muy baja tumorigenicidad ($p < 0.05$) con retraso significativo de 30 días en la aparición de los tumores respecto a los controles. El clon A7 indujo tumores comparables a los controles en tamaño y velocidad de crecimiento, sin embargo, mostraron pigmentación a diferencia de los controles y de G10. Este hallazgo

concuera con el aumento en la expresión de grupos de genes asociados a melanogénesis, demostrado por microarray. En conclusión, diferentes mecanismos compensatorios inducidos por la modulación de los niveles de H₂O₂ condujeron a un fenotipo menos maligno en los tres clones, ya sea por inhibición de proliferación y tumorigénesis o por inducción de diferenciación.

586. (371) EL FGF-2 COMO PARTE DEL MECANISMO DE ACCION ANTITUMORAL DE BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG) EN CANCER DE VEJIGA

Langle, Y.¹; Belgorosky, D.¹; Lamb, C.²; Góngora, A.²; Sahores, A.²; Baldi, A.²; Lanari, C.²; Eiján, A.¹
Instituto de Oncología Ángel H. Roffo¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental²

Bacilo Calmette Guerin (BCG) es el tratamiento estándar para prevenir recidivas y progresión del cáncer vejiga (CaV) no músculo invasor (NMI) de alto grado histológico. Anteriormente demostramos que BCG induce la muerte de células de CaV murino MB49 tanto *in vitro* como *in vivo*, generando una remodelación tisular que implica proliferación y diferenciación de fibroblastos (FB) en forma directa o vía FGF-2 liberado por los macrófagos (MAC). La inoculación de FGF-2 (5ng/ratón intra-tumoral) reduce el tamaño tumoral y no revierte la inhibición del crecimiento inducida por BCG. El objetivo del presente trabajo es estudiar el balance del FGF-2 y sus receptores (FGFR) en respuesta a BCG en las distintas células que conforman el tumor. Para ello evaluamos a) la actividad proliferativa de FGF-2 sobre FB y de células MB49 (MTS) y b) la expresión de FGF-2 y FGFRs1-4 en células MB49 y FB (embrionarios y línea NIH-3T3), por inmunofluorescencia y western blot. *In vitro* FGF-2 sólo o combinado con BCG induce la proliferación de FB (p<0.001). También induce una pequeña proliferación de células MB49, pero sin revertir la muerte inducida por BCG (p<0.001). Mientras que BCG induce la expresión de FGF-2 en células tumorales MB49, MAC y FB, la expresión de los receptores es diferencialmente modulada, observándose disminución de FGFR3 en células tumorales e incremento de FGFR1 en FB. Podemos concluir que el FGF-2 inducido por BCG es uno de los factores involucrados en la respuesta antitumoral. La regulación diferencial de FGFR3 y 1 inclina la respuesta hacia el crecimiento de los FB y la muerte de las células tumorales. Mutaciones activantes del FGFR3 se han descrito como responsables de la carcinogénesis en pacientes con CaV NMI por lo que el hecho de que BCG regule negativamente este receptor, plantea una posibilidad terapéutica novedosa para estos pacientes.

587. (248) DESARROLLO PRECLÍNICO DE INHIBIDORES DE RAC1 UTILIZANDO ESTRATEGIAS DE DISEÑO RACIONAL PARA EL TRATAMIENTO DE CARCINOMA MAMARIO AGRESIVO

Cardama, G.¹; Comin, M.²; Hornos, L.²; González, N.¹; Turjanski, A.³; Alonso, D.¹; Gomez, D.¹; Lorenzano Menna, P.¹
Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Química, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI)² Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. INQUIMAE/CONICET³

Las Rho GTPasas cumplen un rol clave en la regulación de múltiples procesos celulares. La activación aberrante de la GTPasa Rac1 está implicada en la progresión tumoral, invasión y metástasis. En particular, Rac1 está sobreexpresada e hiperactiva en cáncer de mama altamente agresivo. Esta hiperactivación está dada, en parte, por la sobreexpresión y mutación de sus activadores (GEFs). Rac1 es un blanco molecular relevante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer. Por ello, llevamos a cabo un *screening* virtual basado en *docking* con el objetivo de interferir la interacción Rac1-GEF y afectar la activación de la GTPasa. A partir del *screening* virtual de 200.000 moléculas, se evaluaron aproximadamente 15 compuestos *in vitro* y se seleccionó el compuesto ZINC69391. Este compuesto fue capaz de bloquear la interacción de Rac con su activador Tiam1 e interfirió en la activación de Rac1 inducida por EGF *in*

vitro. ZINC69391 presentó actividad antiproliferativa en un panel de células de carcinoma mamario (IC₅₀: MDA-MB-231: 48uM, MCF7: 31uM, F3II: 61uM), fue capaz de inhibir significativamente (p<0.001) la migración celular en F3II y MDA-MB-231 y de interferir significativamente (p<0.5) la progresión del ciclo celular a una dosis 10 uM. ZINC69391 disminuyó significativamente (p<0.01) un 75% la formación de nódulos metastáticos pulmonares en un modelo de metástasis experimental *in vivo*. Seguidamente, se desarrollo un protocolo de cálculo y se hizo el estudio *in silico* de la afinidad por Rac1 de al rededor de 70 compuestos diseñados racionalmente a partir de ZINC69391 con el objetivo de lograr una mejora en la afinidad por Rac1. Se evaluó un panel de 10 análogos novedosos *in vitro* y se seleccionó el compuesto 1A-116. Este análogo mostró ser más potente que ZINC693291, confirmando la predicción realizada por *docking*. Estos datos contribuyen a la validación de Rac1 como blanco molecular para el desarrollo de nuevas terapias en el tratamiento de cáncer de mama.

588. (543) LA DIETA HIPERCALÓRICA Y LAS HORMONAS ESTEROIDEAS MODULAN LA TRANSCRIPCIÓN DE BRCA1 A TRAVÉS DE CTBP1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Moiola, C.¹; De Luca, P.¹; Zalazar, F.¹; Cotignola, J.¹; Meiss, R.²; Vazquez, E.¹; De Siervi, A.¹
Depto de Química Biológica, FCEN, UBA - IQUIBICEN CONICET¹ Academia Nacional de Medicina, División Patología Experimental²

Las mutaciones germinales en el gen BRCA1 aumentan la agresividad del cáncer de próstata (PCa). La transcripción de esta proteína está controlada por co-activadores y co-represores, entre ellos CtBP1. La activación de CtBP1 es promovida por NADH, la cual reprime al supresor de tumores BRCA1. Además, la obesidad aumenta la agresividad del PCa. Nuestro objetivo fue determinar el efecto del suero de ratones alimentados con dieta hipercalórica sobre la regulación de BRCA1 por CtBP1 en células de PCa e investigar si este mecanismo es afectado por los andrógenos. Encontramos que las proteínas BRCA1 y CtBP1 se asocian al promotor de BRCA1 en células PC3 y, luego de la estimulación con testosterona, se liberan aumentando su transcripción. Para evaluar si esta inducción es mediada por la testosterona o por los estrógenos que surgen como producto de la aromatización de andrógenos por la enzima aromatasa, evaluamos este mecanismo en presencia de letrozol, un inhibidor de esta enzima. Este compuesto eliminó la inducción de BRCA1 por testosterona. Generamos líneas estables PC3 que tienen aumentada la expresión de CtBP1. La inducción de CtBP1 disminuyó los niveles de BRCA1 y este efecto se revirtió al silenciar CtBP1. Finalmente, el agregado de suero proveniente de ratones alimentados con dieta hipercalórica al medio de cultivo de las células PC3 y sus derivadas estables aumentó la proliferación celular. En estas condiciones, la expresión de BRCA1 disminuyó significativamente. Estos resultados sugieren que la dieta hipercalórica incrementaría los niveles de NADH, lo cual activaría a CtBP1 reprimiendo al supresor tumoral BRCA1 y aumentando la proliferación de las células de PCa. Asimismo, los estrógenos provenientes de la aromatización de los andrógenos inducen la transcripción de BRCA1. La desregulación de la vía CtBP1/BRCA1 podría influenciar la progresión del PCa en presencia de una dieta hipercalórica y de bajos niveles de andrógenos circulantes.

GASTROENTEROLOGÍA, METABOLISMO Y NUTRICIÓN 4

589. (384) SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDOS GRASOS ω3, ω6 Y ω9 ¿MEJORA LA CALIDAD DE LA VLDL EN LA INSULINO-RESISTENCIA?

Lucero, D.¹; Macri, V.²; Friedman, S.²; Schreiber, L.¹; Zago, V.¹
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-INFIBIOC-UBA¹ Cát. De Bioquímica General y Bucal. Facultad de Odontología-UBA.²

En estudios previos demostramos que en la insulino-resistencia (IR) se producen VLDL grandes, enriquecidas en triglicéridos (TG) y con mayor potencial aterogénico. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) ω 3 disminuyen la síntesis hepática de VLDL y los niveles plasmáticos de TG. Sin embargo, el papel de los ácidos grasos monoinsaturados (ω 9) y AGP ω 6 sobre los TG y las características de VLDL, no resultan claros. Objetivo: estudiar el efecto de la suplementación con AGP ω 3 y ω 6, y con ω 9 en la prevención de las alteraciones del perfil lipídico y del tipo de VLDL en un modelo de IR. Se utilizó aceites de pescado, de girasol y de girasol alto oleico (AGAO) como fuentes de ω 3, 6 y 9 respectivamente. Se estudiaron durante 12 sem ratas wistar macho, 180-200g, divididas al azar en 5 grupos: uno bajo dieta estándar y 4 con dieta rica en sacarosa (DRS, 30% en agua de bebida), que se subdividieron en: AGP ω 3 (n: 5), AGP ω 6 (n: 5), AGAO ω 9 (n: 6) -todas 15g/100g- y DRS control (C). 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. En comparación con C: AGP ω 3 y ω 6 presentaron menor TG (154±30 vs 70±5 y 68±10 mg%, p<0,01); AGP ω 3, ω 6 y ω 9 aumentaron col-HDL (22±2 vs 28±4, 33±5 y 29±3 mg%, p<0,05), sólo AGP ω 3 disminuyó el col-no HDL (28±9 vs 12±5 mg%, p<0,01) y AGL (0,67±0,16 vs 0,34±0,06 mmol/l, p<0,01); AGP ω 3 y ω 6 disminuyeron los niveles de insulina, p<0,05 y AGP ω 9 mostró aumento de peso (255±31 vs 332±14 g) y mayor grasa visceral (17±4 vs 25±6 g), p<0,05. No hubo cambios en la composición de VLDL en ninguno de los grupos. Las suplementaciones con AGP ω 3 y ω 6 produjeron un perfil lipoproteico más favorable, aunque no lograron corregir las características de VLDL. Si bien AGP ω 9 aumentó HDL, tampoco mejoró la calidad de VLDL e indujo acumulación de grasa visceral.

590. (394) ESTUDIO DE LOS PATRONES DE GLICOSILACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR EN UN MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICO
Calabrese, G.¹; Rasente, R.¹; Donoso, A.²; Puyó, A.²
Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA¹ Cátedra de Anatomía e Histología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.²

El remodelado de la matriz extracelular macrovascular, adquiere relevancia en patologías con injuria vascular. Nos propusimos estudiar la glicosilación de los proteoglicanos (PRGs) de aorta, en animales control (C) y con sobrecarga oral de fructosa (F), considerado un modelo de síndrome metabólico. Se usaron ratas Sprague-Dawley macho: grupo C (agua para beber, n=12) y grupo F (solución de F 10% P/V para beber, n=12) tratadas por 9 semanas. La expresión de los PRGs glicosilados con condroitín (CS) y dermatán sulfato (DS), decorina, biglicano y versicano, fue estudiada por inmunohistoquímica (cortes de aorta) y por Western blot (células aórticas aisladas). Los glicosaminoglicanos (GAGs) de aorta se aislaron por digestión papaínica y precipitación con cetilpiridonio. En estas muestras se analizaron los patrones de glicosilación en geles de agarosa y HPLC antes y después del tratamiento con condroitinasas. La inmunomarcación de versicano fue más intensa en F con respecto a C; mientras que no se observaron diferencias entre ambos grupos para decorina y biglicano. El Western blot mostró un incremento significativo en la producción de versicano (250 kDa) en F con respecto a C (104.80±6.85 vs 64.60±1.25; p<0.01). Mientras que para decorina y biglicano se detectaron las bandas correspondientes al esqueleto proteico (50kDa) y a los PRGs glicosilados (100 kDa), siendo esta última menor en el grupo F con respecto al grupo C (2.5 veces, decorina y 1.4 veces, biglicano; p<0.01). Se obtuvo un contenido similar de GAGs en ambos grupos (151 µg/5µl). El grupo C mostró un porcentaje en CS y DS de 26.6% y 73.4% respectivamente; principalmente sulfatados en posición C₄ (66.8%). Mientras que F mostró un incremento en el porcentaje de CS (30.1%) acompañado de la disminución del porcentaje de DS (70%), y sulfatados también en posición C₄ (63.8%). Los resultados obtenidos muestran que la sobrecarga oral de F induce cambios en la expresión y glicosilación de los PRGs vasculares

591. (301) IMPACTO DE LA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN LA VIDA ADULTA, EN ANIMALES CON CAMBIOS EN LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA IN UTERO

Alzamendi, A.; Castrogiovanni, D.; Spinedi, E.; Giovambattista, A.

Unidad de Neuroendocrinología. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular

Los cambios de programación metabólica *in utero* inducen efectos a largo plazo, pudiendo desencadenar alteraciones severas luego de recibir cargas alostáticas durante la vida adulta. El objetivo del trabajo fue evaluar el impacto del consumo de una dieta rica en fructosa (DRF, fructosa 10% p/v en agua de bebida) en ratas macho adultas, nacidas de madres que consumieron DRF durante la gestación. Ratas S-D preñadas fueron divididas en dos grupos alimentados *ad libitum* con dieta normal (agua para beber: MC) o DRF (MF) durante la gestación. Ambos grupos recibieron dieta normal durante la lactancia. Entre los días 21-60 de vida las crías C y F (provenientes de madres MC y MF, respectivamente) recibieron dieta normal. Al día 60 de vida, las crías se dividieron en subgrupos: uno recibió dieta normal (CC y FC, la primer letra indica el tratamiento de la madre y la segunda el de la vida adulta) y el otro DRF (CF y FF) durante 3 semanas. Se registró el PC y el día 81 se sacrificaron. Se obtuvo sangre para la determinación de glucosa (GLU), triglicéridos (TG), leptina (LEP) y adiponectina (ADIPO); se disecó el tejido adiposo retroperitoneal (TARP), se pesó y utilizó para análisis histológicos. Los CF mostraron un aumento (p< 0,05 vs. CC) en los niveles de TG, LEP, ADIPO, en la masa de TARP y en el tamaño celular. Los FC mostraron aumento en los niveles de GLU, TG, LEP y en el tamaño celular (p< 0,05 vs. CC). Los FF mostraron aumento en el PC entre los días 68-81 y en la masa de TARP (p< 0,05 vs. CC), en los niveles de GLU, TG, y LEP y el tamaño celular (p< 0,05 vs. CC, CF y FC). Los resultados indican que el consumo de DRF durante la gestación induce en sus crías adultas un aumento en la susceptibilidad al desarrollo de alteraciones endocrino-metabólicas y de la función del TA. Nuestro estudio refuerza la importancia del concepto de programación metabólica *in utero*. (PICT 2007-1051 y PIP 2009-0704).

592. (342) DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL POR TOXICIDAD CRÓNICA DEL COBRE EN CEREBRO DE RATA

Musacco Sebio, R.¹; Saporito Magriñá, C.¹; Semprine, J.¹; Repetto, M.¹²

Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL-UBA-CONICET)²

La acumulación de cobre (Cu) en cerebro genera daño oxidativo, está involucrado en la etiología de enfermedades neurodegenerativas, asociadas a su vez a disfunción mitocondrial y daño oxidativo. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del Cu sobre la actividad mitocondrial en cerebro de rata para entender los mecanismos bioquímicos de daño oxidativo involucrados. Ratas Sprague Dawley machos (150 g) recibieron Cu(II) en el agua de bebida (0,5 g/L) durante 7, 14 y 21 días. Se determinó el consumo de oxígeno (O₂) en cerebro y en mitocondrias aisladas, actividad de complejos mitocondriales y de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD). Se estimó el control respiratorio (CR). Se observó aumento significativo del 85% del consumo de O₂ en cerebro a partir del día 7 (C: 507 ± 26 nmol O₂/min g, p < 0.001); y a los 21 días: 77% de aumento del consumo de O₂ mitocondrial con sustratos del complejo I (malato-glutamato) en estado 4 de reposo (C: 4,7 ± 0,7 nmol O₂/min mg prot) y 65% en estado 3 activo (C: 17 ± 3 nmol O₂/min mg prot) y del 79% (estado 4) y 33% (estado 3) con sustratos del complejo II (succinato) (C: 9,5 ± 0,6 y 23,9 ± 0,7 nmol O₂/min mg prot), la actividad del complejo I disminuyó un 20% (C: 130 ± 12 nmol NADH/min mg prot) y la del complejo II aumentó un 24% (C: 8,6 ± 0,5 nmol /min mg prot). La actividad de SOD disminuyó 30% al día 7 (C: 2,6 ± 0,1 U/mg prot). La toxicidad crónica por Cu produce disfunción mitocondrial por inhibición del complejo I y desacople de la cadena respiratoria. El aumento del consumo de O₂ en tejido y mitocondrias podría explicarse por incremento del transporte de electrones a través de

la cadena respiratoria, aumentando la acumulación de anión superóxido, a su vez favorecida por la disminución de la actividad de Mn-SOD. La disminución del CR sería consecuencia de un aumento del flujo retrógrado de protones debido a la generación de especies reactivas del oxígeno y daño oxidativo en la membrana mitocondrial.

593. (417) DIETAS CON ALTO CONTENIDO EN ÁCIDOS GRASOS SATURADOS: ESTUDIO EN MODELO EXPERIMENTAL

Perris, P.; Silva, C.; Fernández, I.; Mambrin, C.; Slobodianik, N.; Feliu, S.

Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Se conoce la importancia de los lípidos en el desarrollo de enfermedades crónicas. Se estudia el efecto de dietas con alto contenido en grasas, sobre el perfil de ácidos grasos séricos en modelo experimental. Ratas Wistar al destete alimentadas con dieta experimental (F%45 aportadas por manteca). Grupo1: 10 días Grupo2: 40 días y Grupo3: 30 días con dieta stock y luego 40 días con dieta experimental. Los controles(C1,C2yC3)recibieron dieta normocalórica. Se determinó el perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa.Resultados(%área±DE, * p<0.01):

	Grupo 1	C1	Grupo2	C2	Grupo3	C3
Palmítico	18.10±6.48	17.84±2.12	20.63±2.35*	16.08±2.15	17.25±2.15*	16.44±1.62
Oleico	19.12±5.18*	10.60±2.01	20.37±2.06*	11.29±2.27	17.71±2.85*	10.08±1.34
Linoleico	8.91±1.79*	19.99±4.68	9.79±1.04*	17.45±4.11	8.38±0.79*	17.82±3.38
αLinolénico	0.49±0.32*	1.02±0.46	0.44±0.13*	0.81±0.22	0.43±0.11*	0.93±0.18
Araquidónico	6.36±1.45	8.59±2.15	10.77±1.05*	16.32±4.27	17.52±2.30*	22.78±1.98

Los niveles de ácido oleico se encuentran aumentados en los tres grupos. Ácido palmítico aumenta en los grupos 2 y 3 respecto a sus controles. Ácidos linoleico y linolénico presentan valores estadísticamente inferiores a los controles. El ácido araquidónico sólo disminuyó en grupos 2 y 3. En los grupos alimentados durante 40 días con dieta con alto contenido en grasa saturada, el impacto fue el mismo, independientemente del momento de administración. Los niveles séricos de los ácidos grasos se modificaron en respuesta al perfil de ácidos grasos de la fuente utilizada, del tiempo administrado y al porcentaje de grasa aportado por la dieta, que estarían exacerbando la vía del ácido oleico y disminuyendo la proporción de ácidos grasos esenciales.Financiado:UBACyT 20020100200078.

594. (458) SOBRE-EXPRESIÓN HEPÁTICA DE CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) PROTEGE DEL DAÑO INDUCIDO POR UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA (HIGH FAT DIET, HFD)

Francés, D.1; Motiño, O.2; Valverde, Á.2; Martín-Sanz, P.2; Carnovale, C.1

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), Rosario, Argentina¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Madrid, España²

En estudios realizados con modelos animales en los que una HFD induce esteatosis y resistencia a insulina (IR) en hígado y tejidos periféricos, se estableció la relación patogénica entre los ácidos grasos libres, esteatosis hepática y la IR. Por otro lado, se sabe que las prostaglandinas PGE₂ derivadas de la actividad de COX-2 juegan un rol hepatoprotector, aumentando la activación de la vía PI3K/Akt. Nos planteamos estudiar el rol de COX-2 en hígado en un modelo de insulino-resistencia generado por una HFD. Utilizamos ratones C57BL/6 transgénicos (Tg) que sobre-expresan COX-2 en hígado. Grupos experimentales: Wild Type (Wt) y Tg en HFD, **WtHFD** (n=6) y **TgHFD** (n=6). Resultados: las curvas de Tolerancia a la Insulina (0,75U/kg p.c. de insulina corriente) y Tolerancia a la Glucosa (2 gr/kg p.c. de glucosa) de animales tanto en Dieta estándar como en HFD, evidenciaron una respuesta a la insulina superior en el grupo Tg vs el Wt

(valores significativamente menores de glucemia a partir de los 60', p<0,05). Durante los 90 días de dieta, se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso (+20% **WtHFD** vs **TgHFD**), con igual ingesta de alimento. Al comparar **TgHFD** vs **WtHFD** se encontró una disminución significativa del contenido hepático de triglicéridos (TG) (-68%) que se correlacionó con lo observado por microscopía óptica en cortes de hígado teñidos con Hematoxilina-Eosina. Asimismo, disminuyeron significativamente los valores plasmáticos de TG (-17%), Colesterol (-29%) y Ácidos Grasos Libres no esterificados (-44%). Se analizó la activación de P-Akt por insulina (0,75U/kg p.c., 15' antes de la eutanasia) en extracto hepático por Western Blot, evidenciándose una mayor activación en **TgHFD** vs **WtHFD** (+40%). La sobre-expresión hepática de COX-2 indujo un aumento en la respuesta a insulina, conduciendo a una disminución de lípidos plasmáticos, previniendo su acumulación en hígado y evitando el daño hepático asociado a HFD.

595. (478) ESTUDIO DE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA ANGIOGENESIS EN CÉLULAS ENDOTELIALES VASCULARES TRATADAS CON VLDL TÍPICAS Y OXIDADAS

Oberskersch, R.1; Barakian, B.1; González, A.1; Valotta, R.2; Yuschak, S.2; Calabrese, G.1

Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.1 Servicio de Obstetricia del Complejo Médico Churrucá-Visca.2

Las VLDL típicas (VLDL_t) u oxidadas (VLDL_{ox}) podrían activar al endotelio vascular y desencadenar un programa trombótico, inflamatorio y angiogénico. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de estas lipoproteínas sobre la proliferación endotelial y el remodelado de su matriz extracelular. Las VLDL_t fueron obtenidas por ultracentrifugación y posteriormente oxidadas con cobre. Ambas fueron caracterizadas por su perfil proteico y contenido en proteínas, triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) fueron cultivadas frente a concentraciones crecientes de lipoproteínas (50-100 ug/ml).La proliferación se determinó por:(1) citometría de flujo, (2) exclusión del azul tripán y (3) translocación del factor NFκB por inmunofluorescencia; y zimografía para el remodelado de la matriz. El SDS-PAGE reveló bandas de 550kDa, 32kDa y 8.8kDa para VLDL_t siendo modificadas en las VLDL_{ox}. La relación colesterol/ triglicéridos de las VLDL_{ox} disminuyó versus las VLDL_t (0.10±0.004 VLDL_{ox} vs 0.18±0.001 VLDL_t, p<0.05, n=3). La proliferación celular (Nº cels/ml) se incrementó en presencia de concentraciones crecientes de VLDL_t (2.8 10⁵, 0ug/ml; 4.9 10⁵, 50µg/ml; 4.3 10⁵, 75µg/ml; 3.4 10⁵, 100µg/ml. Control vs 50µg/ml, p<0.01, n=4). Estos datos fueron confirmados por citometría de flujo (índice de proliferación 9.3%Control vs 40.6% 75µg/mlVLDL_t). Mientras que las concentraciones crecientes de VLDL_{ox} produjeron una disminución en el Nº cels/ml (2.8 10⁵, 0 ug/ml; 2.7 10⁵, 50ug/ml; 1.4 10⁵, 75ug/ml. Control vs 75µg/ml VLDL_{ox}, p<0.05, n=4).La translocación nuclear de NFκB sólo se observó frente a concentraciones crecientes de VLDL_t. La actividad de metaloproteasas de matriz (MMP) 2 y 9 no se modificó con ambas VLDLs. Nuestros resultados sugieren que durante la angiogénesis: (1) las VLDL_t y no su forma oxidadada serían responsables de inducir proliferación endotelial y (2) no habría remodelado de la matriz dependiente de MMP2-9

INMUNOLOGÍA ADAPTATIVA Y REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE 2

596. (337) CÉLULAS B REGULATORIAS. UN NUEVO ROL DE LOS LINFOCITOS B EN CÁNCER

Maglioco, A., Machuca, D., Badano, M., Nannini, P., Camicia, G., Camerano, G., Costa, H., Dran, G.
Instituto de Medicina Experimental-CONICET

En los últimos años se ha descripto la existencia de células B involucradas en la inhibición de la respuesta inmune, caracte-

rizadas por ser secretoras de IL-10. Estas células se estudiaron ampliamente vinculadas a enfermedades autoinmunes pero poco se sabe sobre su rol en cáncer. En un trabajo previo, estudiamos las alteraciones inducidas por el crecimiento del fibrosarcoma murino MCC a nivel de los ganglios linfáticos drenantes del tumor (GLDT). Hallamos que los linfocitos B constituyen la población más afectada a medida que el tumor avanza, observándose un marcado incremento en la proporción de linfocitos B totales y de aquellos secretores de IL-10. El objetivo del presente trabajo fue profundizar en la función de estas células durante el crecimiento tumoral en relación a otras células del sistema inmune. Para ello, depletamos de linfocitos B mediante la administración de anti-CD20 (250 µg/ratón, Biogen Idec). Observamos un retardo significativo en el crecimiento tumoral a partir del día 5 y un aumento en el número de células CD8+IFN γ + (anti-CD20: 20233 \pm 609 vs control: 10033 \pm 1628, n=3, p<0,01); sin embargo no observamos diferencias significativas en la expresión de granzima B ni en la capacidad citotóxica in vitro de estas células. La depleción indujo además una disminución en el número de células TCD4 regulatorias (anti-CD20: 186999 \pm 24788 vs control: 242574 \pm 30269, n=3, p<0,05) y no alteró el número de células TCD4 activadas. Por otro lado, demostramos que células B aisladas de ratones portadores de MCC son capaces de inhibir la proliferación T y que esta inhibición es dependiente de IL-10. Los resultados indican que las células B cumplen un rol inhibitorio en nuestro sistema propiciando el crecimiento del tumor. En este efecto estarían involucrados mecanismos tales como la disminución de las células TCD8, la inducción de células T regulatorias y la inhibición de la proliferación T mediada por IL-10.

597. (461) GALECTINA 8 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO

Carabelli, J., Cattaneo, V., Tribulatti, M., Campetella, O. *Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - UNSAM - CONICET.*

Las galectinas (Gals) constituyen una familia de lectinas de mamífero caracterizadas por poseer dominios conservados de unión a carbohidratos (CRD), típicamente beta-galactósidos. Varios miembros de esta familia se expresan en diferentes poblaciones celulares del sistema inmune y han emergido como reguladores clave de la respuesta inmune a través de su participación en procesos autoinmunes, inflamación, infección y progresión tumoral. Nuestro grupo ha demostrado previamente que galectina-8 (Gal-8) incrementa la respuesta T antígeno-específica en células T CD4 *naive*, siendo un requisito la interacción de esta Gal con las células presentadoras de antígeno (CPA). A partir de estos resultados, surge la hipótesis que Gal-8 podría estar estimulando las CPA, favoreciendo así la presentación antigénica. El objetivo del presente trabajo es analizar los efectos de Gal-8 en células dendríticas primarias derivadas de médula ósea de ratón (CD), y también estudiar la expresión endógena de Gal-8 en estas células. Mediante ensayos de *western blot* se confirmó la expresión endógena de Gal-8 en los cultivos de CD, y más aún, se observó un incremento en la expresión de esta Gal luego de la activación con LPS. Por otro lado, se analizó mediante citometría de flujo, la expresión de las moléculas coestimuladoras MHCII, CD80 y CD86 en CD cultivadas en presencia de Gal-8. Como resultado encontramos un marcado aumento de las CD que expresan las moléculas coestimuladoras luego del tratamiento con Gal-8. También se evaluó morfología por microscopía de fluorescencia, marcando los filamentos de actina. Observamos que las CD tratadas con Gal-8 muestran un fenotipo de células activadas/maduras, con una gran formación y prolongación de dendritas. En conjunto, nuestros resultados demuestran un aumento en la expresión de Gal-8 endógena en CD activadas y al mismo tiempo sugieren la participación de esta Gal en la maduración/activación de las CD.

598. (777) EFECTO DEL PH EN LA RELACIÓN ESTRUCTURAL-FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA INMUNOMODULADORA DE UNIÓN A GLICANOS GALECTINA-1

Di Lella, S.¹², Mendez Huergo, S.², Caramelo, J.³, Estrin, D.⁴, Gallo, M.³, Rabinovich, G.¹²

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Univ. de Buenos Aires¹ Laboratorio de inmunopatología, Instituto de Medicina y Biología Experimental, Conicet² Fundación Instituto Leloir³ Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química-Física, FCEyN - UBA⁴

Galectina-1 (Gal1) es una lectina endógena capaz de reconocer glicoconjugados en una amplia variedad de tejidos. Se le ha asignado un papel fundamental en la regulación homeostática de la respuesta inmune. Su potencial terapéutico inmunosupresor ha sido demostrado en modelos de autoinmunidad y cáncer. Los estudios funcionales de Gal1 han sido desarrollados a un pH fisiológico de 7,4. Sin embargo, los microambientes en los cuales se desarrollan respuestas inmunes presentan características físico-químicas particulares. Entre ellos, el pH es un factor crítico, ya que los ambientes inflamatorios pueden presentar una acidez considerable (pH 5, acidosis extrema). El objetivo de este estudio es comprender el impacto de variaciones en el pH sobre la actividad inmunorreguladora de Gal1, a través de un abordaje multidisciplinario desde ensayos experimentales en células hasta estudios biofísicos estructurales utilizando técnicas de modelado. Los resultados evidenciaron una asociación entre la actividad proapoptótica de Gal1 y la acidez del medio extracelular en ensayos en células mononucleares de sangre periférica humana (44%, 26%, 9% y 5% a pH 7,5; 6,5; 6 y 5, respectivamente). Esta asociación se verificó en ensayos de unión de Gal1 a células Jurkat por citometría de flujo (p<0,05) y en ensayos por fluorescencia, utilizando como ligando a la lactosa (567µM vs 2664µM a pH 7 y 5,5, respectivamente). Por último, y utilizando Resonancia Magnética Nuclear y simulación computacional, analizamos las bases estructurales de este fenómeno biológico, evaluando la protonación de determinados residuos histidinas como responsables de dicha modulación (pK_a protonación 5,7 y 6,3, para histidinas 44 y 52, respectivamente). En conjunto, los resultados expuestos revelan la influencia de la acidez del microentorno en la actividad inmunomoduladora de Gal1 con críticas implicancias en la regulación de la función de esta proteína en microambientes inflamatorios y tumorales.

599. (138) LA QUIMERA BLSOMP31 ES INMUNOGÉNICA E INDUCE ANTICUERPOS CON ACTIVIDAD BACTERIOLÍTICA CONTRA BRUCELLA OVIS EN OVINOS

Díaz, A.¹⁵, Clause, M.¹⁵, Paolicchi, F.², Fiorentino, M.², Gherzi, G.⁴, Zylberman, V.⁴, Goldbaum, F.³⁴, Estein, S.¹⁵ *Lab. de Inmunología, CIVETAN, CONICET, Fac. Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Bs As, Argentina¹ Lab. de Inmunología, CIVETAN, CONICET, Fac. Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Bs As, Argentina² Fundación Instituto Leloir e IIBBA-CONICET³ Immunova S.A.⁴ CONICET⁵*

El control de la brucelosis ovina en nuestro país se basa en la detección y eliminación de los animales infectados pre-servicio. En Argentina no hay vacuna aprobada para el control de esta enfermedad. En trabajos previos demostramos que la quimera proteica BLSOmp31 en adyuvante oleoso (AFI) administrada en corderos es inmunogénica y protege al ovino contra *Brucella ovis* cuando se emplean 3 dosis de inmunización. **Objetivos:** a) estudiar la respuesta inmunitaria y b) evaluar la actividad bacteriolítica de los Ac cuando se administran 2 dosis de la misma vacuna subcelular. M y M: Se emplearon 8 carneros Polled Dorset distribuidos en 2 lotes: A) inmunizados vía intramuscular con BLSOmp31+ AFI en 2 oportunidades con intervalo de 1 mes (n=6) y B) no inmunizados (n=2). Muestras de suero fueron obtenidas en la primera y segunda vacunación y a los 2, 5, 8 y 14 meses de esta última. El título de anticuerpos (Ac) y los isotipos fueron estudiados en ELISA anti-BLSOmp31. Se determinó la actividad bacteriolítica de los sueros en presencia de complemento homólogo. Se efectuó la determinación de IFN gamma a los 5 y 14 meses post-refuerzo y al mismo tiempo se practicó la intradermorreacción (IDR) con BLSOmp31. **Resultados:** BLSOmp31+AFI indujo elevados títulos de Ac anti-IgG con predominio de IgG1 respecto de IgG2. Los sueros de los animales inmunizados lisaron el 73,94% de B. ovis. A los 5 meses post-refuerzo se detectó una elevada producción de

IFN gamma y un incremento significativo del pliegue cutáneo en la IDR, sin embargo, tanto la respuesta humoral como la celular decrecieron significativamente al final del ensayo. **Conclusión:** Dos dosis de BLSOmp31+AFI generan una elevada respuesta humoral de perfil mixto IgG1:IgG2 con la inducción de Ac con actividad bacteriolítica e inducción de la respuesta celular que declinó a los 14 meses post-refuerzo. Futuros estudios con este protocolo de inmunización estarían orientados a evaluar el efecto de un refuerzo anual en la respuesta inmunitaria.

600. (485) CARACTERIZACIÓN COMPUTACIONAL E INMUNOQUÍMICA DE ALERGENOS DE SOJA DE REACTIVIDAD CRUZADA CON LECHE BOVINA

Candrea, Á.¹, Curciarelo, R.¹, Parisi, G.³, Petrucci, S.², Docena, G.¹

LISIN Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune La Plata¹ CIDCA Centro de desarrollo en criotecnología de alimentos² Departamento de Ciencia y Tecnología, UNQUI³

La alergia a la leche de vaca LV constituye la principal alergia alimentaria en niños en Argentina y en otras regiones. Las fórmulas a base de soja S son empleadas como sustituto. Sin embargo, aprox el 40% de los pacientes presentan una intolerancia al inicio del tratamiento, lo cual sólo puede ser explicado por una reactividad cruzada RC entre ambos sistemas proteicos. Nuestro grupo ha identificado 3 alérgenos de RC en S (A5A4B3, α -conglucina y su porción carboxilo terminal (α -CTD), y P34). Es importante destacar que los servidores disponibles en Internet que predicen RC no describen como tal a los sistemas LV/S. Nuestro objetivo fue evaluar las características secuenciales y estructurales de estos los alérgenos de S y desarrollar una estrategia para predecir epítopos de RC con LV. A partir de la base de datos se tomaron las secuencias de epítopos de las caseínas bovinas CB, se los alineó con las secuencias de P34 y α -CTD de S y se construyó un gráfico de acumulación de aas consenso. Para la confirmación experimental de este resultado se llevó a cabo el mapeo de epítopos lineales de P34 y α -CTD, a partir del análisis de la reactividad de péptidos solapados sintetizados sobre una membrana de celulosa. Los spots se revelaron con: pools de sueros de alérgicos a LV o S (IgE), mAbs de ratón esp de α , β y κ -caseínas (IgG). La aplicación de herramientas computacionales nos permitió predecir 2 epítopos de RC entre P34/CB y 2 epítopos de RC entre α -CTD/CB. Con el mapeo experimental demostramos que estos epítopos estaban entre los péptidos reactivos, no obteniéndose falsos positivos mediante la predicción computacional. En conclusión, mapeamos los epítopos de RC en P34 y α -CTD, que fortalecen los resultados *in vivo* e *in vitro* obtenidos previamente. Conocemos además los aas esenciales para la interacción Ag-Ab en este sistema lo que sería una información útil para el diseño de péptidos destinados a producir tolerancia oral en alérgicos a la LV.

601. (366) EMPLEO DE ALERGENOS DE REACTIVIDAD CRUZADA EN INMUNOTERAPIA ORAL PARA LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA ALÉRGICA EN UN MODELO MURINO DE ALERGIA A LECHE BOVINA

Smaldini, P., Orsini Delgado, M., Curciarelo, R., Candrea, A., Fossati, C., Docena, G.
LISIN

Actualmente se sabe que una de las principales causas de la alergia alimentaria es la falla en los circuitos de tolerancia que genera en ciertos individuos la aparición de reacciones adversas frente a proteínas de la dieta. Las terapias más avanzadas se basan en la aplicación de la *inmunoterapia (IT) específica con proteínas alimentarias*. Sin embargo, se desconoce su evolución a largo plazo, y los mecanismos inmunológicos subyacentes que permiten a los pacientes la exposición natural a los alimentos sin la aparición de reacciones adversas. El objetivo de este trabajo es estudiar los mecanismos de inducción de tolerancia oral frente a proteínas de leche de vaca (PLV) o de soja (PS) en un modelo murino de alergia a PLV. Ratones Balb/c fueron tratados por una semana con PLV (Tol PLV) o con PS (Tol PS) previo a la sensibilización oral con PLV y toxina colérica. Luego fueron desafiados oralmente con PLV y se

evaluaron diferentes parámetros *in vivo* e *in vitro* para caracterizar la respuesta inducida. Los ratones tolerizados presentaron una disminución en el score clínico, en los niveles de IgE específicos a PLV (DO 1.58 \pm 0.17 vs 0.52 \pm 0.03; sensibilizados vs Tol PLV; 1.58 \pm 0.17 vs 1.06 \pm 0.17, sensibilizados vs Tol PS, p<0.05) En mucosa intestinal los ratones tolerizados presentaron una disminución en la expresión de IL-13 (FI 19.2 \pm 0.88 vs 8.25 \pm 0.18; sensibilizados vs Tol PLV; 19.2 \pm 0.88 vs 4.85 \pm 0.31, sensibilizados vs Tol PS, p<0.001) con un aumento en la expresión de IL-10 (FI 3.66 \pm 0.27 vs 11.0 \pm 2.20, p<0.001, sensibilizados vs Tol PLV; 3.66 \pm 0.27 vs 11.0 \pm 0.56, sensibilizados vs Tol PS, p<0.001) y de T regulatorios. En conclusión, se logró inducir mecanismos de tolerancia mediante la administración de PLV o PS por vía oral, capaces de modular la respuesta Th2-e IgE-mediada en los ratones alérgicos, y se evidenció experimentalmente en la mucosa intestinal la aparición de Treg. Estos resultados nos permiten avanzar en la comprensión de la IT específica para la alergia alimentaria.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 3

602. (691) PARTICIPACIÓN DE MIX-AMPC EN LA ACTIVACIÓN DE C/EBP β Y PPAR γ DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS 3T3-L1 A ADIPOCITOS

Gabrielli, M.¹; Martini, C.¹; Romero, D.²; Price, J.²; Vila, M.¹
Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN - FCEyN - UBA¹ Dept. of Biochemistry - University of Mississippi Medical Center²

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 el laboratorio hemos encontrado que la señal de MIX-AMPC-PKA está involucrada en la ECM mientras que MIX-AMPC-EPAC media la diferenciación a adipocitos. Con el fin de estudiar la importancia de la señal de MIX en el proceso de diferenciación se analizó si la presencia de MIX en la mezcla de diferenciación era importante para la activación de dos genes maestros de este proceso: uno temprano, C/EBP β , y otro más tardío, PPAR γ . Se encontró que MIX contribuye al aumento de los mRNA de ambos factores de transcripción. Consistentemente al evaluar la cantidad de proteína por western-blot o inmunofluorescencia, también se observó aumento de estos factores de transcripción cuando MIX está presente en la mezcla de diferenciación. Por otro lado, resultados preliminares en los cuales se reemplazó MIX por un análogo de AMPc que activa específicamente EPAC, muestran que éste es capaz de aumentar el mRNA de PPAR γ . Estos resultados contribuyen a dilucidar la importancia de la señal de MIX-AMPC y la participación de EPAC en el proceso de diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos.

603. (36) LA ACTIVACIÓN SECUENCIAL DE PI3K, PKC DELTA Y P38 MAPK MEDIA EL EFECTO ANTITUMORAL INDUCIDO POR UN PÉPTIDO CÍCLICO DEL INTERFERÓN ALFA

Blank, V.; Bertucci, L.; Peña, C.; Roguin, L.
IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Previamente demostramos que la fosforilación de STAT1 en residuos de Tyr y la activación de p38 MAPK regulan la respuesta apoptótica inducida por un péptido quimérico cíclico (PQC) del interferón-alfa2b (IFN- α 2b). Puesto que el péptido también induce la fosforilación de STAT1 en el residuo de Ser727, el propósito del presente trabajo fue identificar la cascada de señalización involucrada en esta fosforilación y determinar su participación en el efecto antitumoral del PQC. En primer lugar, por ensayos de Western blot, observamos una disminución significativa en los niveles de fosfo-Ser STAT1 (p<0.001) luego de incubar células WISH durante 1h con PQC en presencia de un inhibidor farmaco-

lógico de p38 (SB203580), sugiriendo que p38 se comporta como una serina quinasa para STAT1. Puesto que comprobamos que el péptido activa PKC delta, evaluamos posteriormente el rol de esta quinasa. Luego de bloquear PKC delta con un inhibidor (rotterina) o de disminuir sus niveles de expresión con siRNA, los niveles de fosforilación de Ser-STAT1 y de p38 disminuyeron entre un 40-60%, indicando que PKC delta se comporta como un regulador de p38. También demostramos que en presencia de un inhibidor de PI3K (Ly 294002) se bloquea significativamente la activación de PKC delta ($p < 0.005$). Finalmente, mediante el uso de inhibidores farmacológicos de PI3K y PKC delta o por técnicas de siRNA específico para PKC delta encontramos que la inhibición de estas quinasas disminuye entre un 15-20% la actividad antiproliferativa del péptido ($p < 0.01$) y alrededor de un 10% la población de células hipodiploides ($p < 0.01$). En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que la fosforilación en Ser727 de STAT1 está mediada por la activación secuencial de PI3K, PKC delta y p38 MAPK. Esta cascada de señalización, conjuntamente con la activación de la vía clásica Jak/STAT, contribuye a la actividad antiproliferativa y el efecto apoptótico inducido por el péptido cíclico del IFN- α 2b.

604. (175) ROLES DIFERENCIALES DE ANGIOTENSINA II Y ANGIOTENSINA 1-7 EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS NORMALES Y TUMORALES

Cambados, N.¹; Nahmod, K.²; Sampayo, R.³; Simian, M.³; Kordon, E.¹; Schere Levy, C.¹
LEGMA, IFIBYNE-CONICET¹ Laboratorio de Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires² Área de Investigación, Instituto de Oncología Angel H Roffo, UBA.³

Los péptidos del sistema renina angiotensina (RAS): AngII, AngIII, AngIV y Ang-(1-7) median importantes funciones biológicas como crecimiento, diferenciación, apoptosis e inflamación. La Ang-(1-7) media efectos antiproliferativos y es generalmente aceptado que ejerce efectos opuestos a la AngII, el principal péptido del RAS. Evidencia creciente atribuye a la AngII un rol favorecedor del crecimiento y desarrollo tumoral mientras que Ang-(1-7) tendría un efecto inhibitorio. El objetivo del presente trabajo es estudiar el impacto de Ang-(1-7) en células mamarias normales y tumorales. En un primer set de experimentos estudiamos la activación de ERK1/2, STAT3, AKT y BCL-XL inducida por Ang-(1-7) en las células epiteliales mamarias murinas normales HC11 mediante western Blot. Ang-(1-7) indujo activación de ERK1/2, STAT3, AKT y BCL-XL con un patron similar a AngII previamente reportado por nuestro grupo. En un segundo set de experimentos realizados en células tumorales MDA-MB231 encontramos que AngII induce una activación sostenida en el tiempo de factores de supervivencia como pAKT y BCL-XL, mientras que la activación inducida por Ang-(1-7) es transitoria. En ensayos de migración realizados en células MDA-MB231 y en T47D, observamos que AngII induce mayor migración que el control ($9.6 \pm 7.4\%$ (control) vs. $40.5 \pm 7.1\%$ (AngII); $P < 0.0001$) mientras que Ang-(1-7) inhibe la migración inducida por TGB1 o EGF ($84.4 \pm 4.6\%$ (EGF) vs. $24.8 \pm 5.0\%$ (EGF+ Ang-(1-7)); $P < 0.0001$). Conclusión: En células mamarias no tumorales AngII y Ang-(1-7) actuarían en forma similar mientras que en células tumorales tendrían efectos contrapuestos. Estos resultados podrían explicar en parte el mecanismo subyacente a la estimulación del crecimiento e invasión tumoral mediado por AngII y a la inhibición del crecimiento tumoral reportado para Ang-(1-7).

605. (272) CANAL REGULADOR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA (CFTR) EN CÉLULAS BEWO DE TROFOBLASTO HUMANO, Y SU RELACIÓN CON EL CANAL DE SODIO EPITELIAL (ENAC)

Marino, G; Kotsias, B.
Inst.de Inv. Médicas Alfredo Lanari

El canal epitelial de sodio sensible al amiloride (ENaC) está presente y es funcional en la línea celular BeWo derivada de trofoblasto humano. En numerosos epitelios, el ENaC presenta una compleja regulación por el canal de cloruro CFTR, también expresado en placenta humana. Nuestro objetivo fue estudiar si el

CFTR es funcional en células BeWo, y si su activación afecta la expresión y/o actividad del ENaC en estas células. Utilizamos técnicas electrofisiológicas (*patch clamp*, configuración célula entera) y de biología molecular. Por RT-PCR del canal CFTR observamos la banda esperada a ~ 295 pb y por Western blot la banda típica de ~ 160 KDa. Para inducir la activación del CFTR estimulamos las células con forskolina ($20 \mu\text{M}$, 3 min.), un activador de la adenilato ciclasa, y registramos una corriente neta con una conductancia saliente de 32.5 ± 0.8 pS/pF, y entrante de 20.1 ± 0.8 pS/pF. La corriente se inhibió con el inhibidor específico de CFTR, tiazolidona CFTR_{inh}-172 ($2 \mu\text{M}$, 5 min.): conductancia saliente: 14.9 ± 0.7 pS/pF, y entrante: 14.3 ± 0.2 pS/pF ($n=4$, $p < 0.05$), reforzando la demostración de corrientes por el CFTR. Al evaluar la estimulación y el bloqueo del CFTR sobre la actividad del ENaC, comprobamos un aumento de las corrientes sensibles al amiloride (~ 8.0 pA/pF a -140 mV) con forskolina, las que se inhibieron con CFTR_{inh}-172: ~ 5.5 pA/pF (a -140 mV) ($p < 0.05$, $n=3$). Además, la forskolina aumentó la expresión de la forma proteolizada de la proteína α -ENaC (30-35 KDa) con respecto al control, y este incremento no se observó al inhibir específicamente el CFTR (en presencia de forskolina) ($n=3$). El inhibidor de CFTR por sí solo no presentó efectos en la expresión del ENaC ($n=3$). Concluimos que las células BeWo expresan el canal CFTR, el cual es funcional, presentando una relación regulatoria con el canal ENaC. Nuestros resultados suman evidencias al conocimiento de la fisiología del transporte placentario y la relación entre los canales ENaC y CFTR en este tejido.

606. (341) ACTIVACIÓN DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE ROR1 EN MELANOMA

Lorenzo, D.; Fernández, N.; Picco, M.; Lopéz Bergami, P.
Instituto de Biología y Medicina Experimental

El melanoma representa un importante problema de salud debido a su mal pronóstico y la falta de terapias efectivas en el estadio metastásico. Entre otras causas, esto se debe a que se observan múltiples vías de señalización implicadas en tumorigénesis activadas constitutivamente. Se ha demostrado que las vías de Wnt canónico y no canónico también se encuentran activadas en melanoma. Con el fin de caracterizar la vía de señalización Wnt no canónico se determinaron los niveles de ARNm de la familia de receptores Fzd y ROR mediante PCR en tiempo real. Observamos un incremento en los niveles de ROR1 y Fzd7 en líneas celulares de melanoma con respecto a melanocitos normales. Este resultado fue confirmado por Western blot (WB). Río abajo en la vía de Wnt no canónica observamos que Dvl-2 se encuentra fosforilada en varias líneas de melanoma. Para demostrar la contribución de ROR1 en la fosforilación de Dvl-2 se generaron células de melanoma Lu1205 y A375 que expresan establemente un *short hairpin* ARN contra ROR1. El silenciamiento de ROR1 disminuyó los niveles basales de fosforilación de Dvl-2. Por otro lado, determinamos la activación de pequeñas GTPasas mediante ensayos de "pull-down". Observamos que el silenciamiento de ROR1 produce una disminución en los niveles de actividad de RhoA/C. Además, estudiamos por WB las isoformas de la proteína quinasa C (PKC). Encontramos que el silenciamiento de ROR1 genera aumentos en los niveles de PKC alfa y disminución en los niveles de PKC beta. Mediante la realización de ensayos reporteros determinamos que ROR1 no está vinculado a la vía canónica de Wnt ya que su silenciamiento no afecta la activación del reportero TOP en respuesta a Wnt3a. Nuestros resultados muestran que ROR1 está sobreexpresado en melanoma y contribuye a la activación de la vía de señalización Wnt no canónica a través de la activación de Dvl-2, RhoA/C y PKC. Estas evidencias sugieren que ROR1 podría estar implicado en el desarrollo y la progresión del melanoma

607. (397) LA EXPRESIÓN DEL COACTIVADOR RAC3 ES REGULADA POR LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Rubio, M.; Alvarado, C.; Panelo, L.; Fernández Larrosa, P.; Costas, M.
IDIM-CONICET

RAC3 contribuye al desarrollo tumoral por mecanismos que involucran una acción anti-apoptótica, proliferativa y transformante;

sin embargo, poco se sabe acerca de las señales que aumentan su expresión en tumores. En el microambiente tumoral existe un aumento de citoquinas que median la activación de diversos factores de transcripción entre ellos NF- κ B. En este trabajo se investigó el rol de señales inflamatorias en la regulación de la expresión de RAC3. Hemos demostrado que TNF- α y NF- κ B modulan positivamente los niveles proteicos de RAC3. Para estudiar si estas señales están involucradas en la regulación transcripcional de RAC3, se evaluaron sus niveles de ARNm mediante qPCR y para ello se utilizaron dos modelos experimentales: 1- células embrionarias de riñón humano HEK293 transfectadas con la subunidad RelA del factor de transcripción NF- κ B en presencia o no del inhibidor I κ B-ss. 2- ratones Balb/c tratados por 24 hs con LPS (2 mg/kg), Dexametasona (6 mg/kg) ó la combinación. En los ensayos *in vitro* se vio un aumento de 2+/-0,4 veces en los niveles del ARNm en presencia de RelA respecto del control ($p < 0,001$) mientras que I κ B-ss inhibe el efecto (0,7+/-0,3 veces). Resultados similares se observaron en ensayos reporteros utilizando una construcción conteniendo un fragmento del promotor de RAC3 río arriba del gen de Luciferasa (RelA 10+/-0,6 y RelA + I κ B-ss 2+/-0,2 veces respecto al control $p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente). En el modelo *in vivo*, observamos que tanto LPS como Dexametasona producen un aumento en los niveles de ARNm (4+/-0,3 $p < 0,05$ y 17+/-2,3 $p < 0,001$, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento simultáneo no produce modificación en los niveles de ARNm con respecto al basal. De acuerdo con estos resultados podemos concluir que señales pro- y anti-inflamatorias estarían involucradas en la regulación de la expresión de RAC3 y que el factor de transcripción NF- κ B tendría un rol primordial en esta activación.

608. (432) NUEVO MODELO DE REGULACIÓN DE PROCESOS CELULARES POR EL YING-YANG DE INMUNOFILINAS DE LA SUBFAMILIA FKBP

Ballmer, L.¹; Daneri-Becerra, C.¹; Molinari, A.^{1,2}; Mazaira, G.²; Lagadari, M.¹; Erlejman, A.²; Piwien-Pilipuk, G.¹; Galigniana, M.^{1,2}
 IBYME¹ Depto. Quim Biol FCEN-UBA/IQUIBICEN²

Las inmunofilinas (IMMs) son proteínas que unen drogas inmunosupresoras, llamándose FKBP a las que unen FK506 (tacrolimus). FKBP51 y FKBP52 son dos IMMs descritas en los '90s como meros integrantes del complejo de chaperonas de los receptores de esteroides (SRs). Su función es aún poco conocida, pero no está relacionada con la inmunosupresión. Nuestro grupo se propuso elucidar el rol biológico de estas IMMs. Primero demostramos que se relacionan con el retrotransporte de SRs tales como GR y MR, los que son primariamente citoplasmáticos y forman complejos con FKBP51 en ausencia de hormona. Al unirse el esteroide, FKBP51 se intercambia por FKBP52, la que une dineína retrotransportando a los SRs. Observamos que un aumento de la razón FKBP52/FKBP51 favorece la acumulación nuclear de SRs, siendo FKBP52 un factor de anclaje de GR a proteínas del nucleoesqueleto. A nivel transcripcional, FKBP51 es un fuerte inhibidor mientras que FKBP52 es inerte o potenciador, según el grado de expresión endógena de FKBP52 de las células usadas. Con el fin de evaluar si otros factores nucleares también son regulados por estas IMMs, se analizaron p53 y NF κ B. Ambos son retrotransportados de manera similar a GR. En el caso de NF κ B, el balance de ambas IMMs también afecta la actividad transcripcional de p65/RelA y su grado de retención nuclear, pero a diferencia de los SRs, la asociación de la IMM al factor es Hsp90-independiente. FKBP51 también fue encontrada en las mitocondrias, en donde cumple acciones antiapoptóticas. Consistente con ello, demostramos que esta IMM tiene alta expresión en células tumorales y se asocia a la telomerasa. Ambas FKBP51 y FKBP52 son también muy abundantes en el sistema nervioso. La sobreexpresión de FKBP52 favorece la diferenciación neuronal así como la neuroregeneración, mientras FKBP51 favorece los efectos opuestos. En conclusión, nuestra evidencia experimental apoya un modelo en el que el balance de expresión entre FKBP51 y FKBP52 regula procesos celulares básicos

609. (464) ESTUDIO FUNCIONAL DE LA MODULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-KAPPAB POR PROTEÍNAS FKBP5

De Leo, S.¹; Mazaira, G.¹; Molinari, A.^{1,2}; Galigniana, M.^{1,2}; Erlejman, A.¹

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA. IQUIBICEN¹ IBYME - CONICET²

El factor de transcripción NF- κ B (Rel A/p50) regula genes involucrados en la inflamación, diferenciación, muerte celular y promoción de tumores. Su activación es mediada por la fosforilación del inhibidor I κ B y posterior degradación, lo que libera a NF- κ B para translocar al núcleo. Previamente observamos que las FK506 *binding proteins* (FKBPs) modulan la actividad transcripcional NF- κ B. Las FKBP5 se caracterizan por presentar un dominio con actividad enzimática de peptidil-prolil-cis/trans-isomerasa (PPIasa) y un dominio TPR (series de 34 aminoácidos) de interacción con otras proteínas. Resultados previos del laboratorio demostraron que la proteína FKBP51 es capaz de inhibir la activación de NF- κ B inducida por PMA (éster de forbol), mientras que FKBP52 estimula su activación, en forma PPIasa dependiente. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto funcional de esta modulación. Para esto se realizaron ensayos de gen reportero para NF- κ B en células HEK 293T estimuladas con PMA, y se observó que el efecto de FKBP52 fue revertido por cotransfección con FKBP51. Se logró transfectar en forma estable células HEK 293 (no T) con el plásmido de expresión pC-Neo-hFKBP51, por selección con el antibiótico G418. Al repetir el ensayo de sobreexpresión de FKBP52 en las células Hek 293 51+, no se observó estimulación en la actividad de NF- κ B inducida por PMA. Además en estas mismas células se evaluó la proliferación celular en comparación con sus pares *wild type* (wt), encontrándose que la sobreexpresión de FKBP51 aumenta significativamente la proliferación celular. Finalmente encontramos que tanto en las células Hek 293 51+ como en las wt, Rel A co-inmunoprecipitó con FKBP51. Concluimos que FKBP51 y FKBP52 modulan la actividad transcripcional de NF- κ B actuando en forma contrapuesta. Especulamos que el efecto observado sobre la proliferación celular podría explicar una de las funciones biológicas de las FKBP5 en células tumorales donde FKBP51 se encuentran sobreexpresada.

610. (499) CLONADO DEL GEN W02B12.15 DE C. ELEGANS, CODIFICANTE DE PROTEÍNA ORTOLOGA A CISD1 HUMANA

Schulman, G.; Valdivieso, A.; Clazure, M.; Massip Copiz, M.; Santa Coloma, T.

LBCM, IIB UCA-CONICET, Fac. Cs. Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina

La proteína mitocondrial CISD1 posee un dominio no antes descrito, altamente conservado de unión a centros 2Fe2S. *In vitro*, concentraciones fisiológicas de NADPH inhiben la transferencia de centros 2Fe2S desde CISD1 a apoproteínas aceptoras. CISD1 es el segundo blanco farmacológico conocido de la droga antidiabética pioglitazona, y su ARNm se ve disminuido en líneas celulares provenientes de enfermos de fibrosis quística. Dada la escasez de estudios sobre el rol fisiológico de CISD1 hemos decidido comenzar con ellos en *C. elegans*, que cuenta con una proteína ortóloga, codificada por el gen W02B12.15. Con ese fin, hemos generado distintos reactivos biológicos para utilizarlos como herramientas. Se clonaron distintas secuencias de W02B12.15 en los correspondientes plásmidos según su futura aplicación. Todos los clonados fueron hechos con productos de PCR amplificados a partir de ADN genómico o cDNA total. Tanto el ADN como el ARN se extrajeron de poblaciones no sincronizadas de *C. elegans* N2 cultivadas en medio NGM con bacterias *E. coli* HB101 como alimento. Para expresar la proteína codificada por W02B12.15 en bacterias, con la cual se obtendrán anticuerpos, se clonó la secuencia del ORF correspondiente a la región soluble de la proteína, según homología con CISD1, en el vector prSetA. Para estudiar la expresión tisular y su localización subcelular, se clonaron en el plásmido pPD95-75 de expresión en *C. elegans*,

fusionados al ORF de GFP, el promotor, y éste más el gen completo sin la secuencia 3'UTR. Por último, se clonó en el plásmido de RNAi L4440, el ORF completo de W02B12.15. El objetivo siguiente será estudiar la función de la proteína codificada por el gen W02B12.15. Se analizará si su localización es efectivamente mitocondrial, su posible rol en esta organela y el efecto en la sobrevivencia del nematodo, entre otros. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (GS, MC y MMMC) y UCA (AGV).

- 611. (542) REGULACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE OSTEÓBLASTOS DE RATA POR NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES**
Laiuppa, J.; Ayala, V.; Santillán, G.
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia - Universidad Nacional del Sur - CONICET

La proliferación, migración y diferenciación de osteoblastos cumplen un rol fundamental durante la reparación o consolidación de lesiones óseas. Estas situaciones, así como los movimientos corporales, pueden provocar la liberación de nucleótidos (ATP, UTP) desde células óseas, al medio extracelular. De esta manera, estos compuestos o sus metabolitos pueden desencadenar una variedad de respuestas celulares, al unirse a receptores P2 de la membrana plasmática, ya sea P2Y (metabotrópicos) o P2X (ionotrópicos). El objetivo del trabajo es estudiar el efecto de los nucleótidos extracelulares sobre la migración y diferenciación de osteoblastos. Para ello se utilizaron cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata neonata, los cuales se trataron con distintos nucleótidos. Para analizar la migración celular, se recurrió al "ensayo de la herida" seguido del tratamiento de las células con diferentes concentraciones de nucleótidos (1-100 μM) durante 3-7 días. Se observó que ATPgS 1, 10 y 100 μM y, en menor medida, ADP βS 10 μM estimularon la migración celular. Por otro lado, se determinó, por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), el nivel de expresión de distintos genes relacionados con diferenciación osteoblástica. Se obtuvieron aumentos significativos de Proteína Morfogénica Ósea 5 (BMP5) y 6 (BMP6) y Sialoproteína Ósea (BSP), transcurridos 5 días de tratamiento con ATPgS 10 μM en medio osteogénico (conteniendo ácido ascórbico 300 μM y β -glicerofosfato 10 nM). Estos resultados sugieren que nucleótidos extracelulares modulan la migración y maduración de osteoblastos. En el caso de la regulación de la migración celular, podrían estar involucrados los receptores P2Y1, 12 y 13, responsivos a ATP y ADP, cuya expresión ha sido reportada en osteoblastos de rata.

- 612. (623) EFECTOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) SOBRE LA CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) EN HÍGADO**
Irene, P.; Díaz, Mara, Eugenia; Miquet, J.; Sotelo, A.; Turyn, D; González, L.
Instituto de Química y Físicoquímica Biológica-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

La hormona de crecimiento (GH) interviene en la estimulación del crecimiento postnatal y tiene también importantes acciones metabólicas. Sin embargo, los niveles crónicamente elevados de GH han sido asociados con la progresión de cáncer. Ratones transgénicos que sobreexpresan esta hormona son más susceptibles a desarrollar distintos tipos de cáncer que sus hermanos de camada normales. La GH activa vías relacionadas con la oncogénesis no sólo mediante la activación de su receptor, 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 altos niveles de GH sobre la cinética de activación de distintas vías de señalización inducidas por el EGF en hígado. Se trabajó con ratones transgénicos que sobreexpresan GH bovina y sus hermanos normales de camada. Estos animales fueron estimulados con EGF durante 2.5, 5, 10 y 15 minutos o inyectados con solución fisiológica para evaluar condiciones basales. Luego del estímulo agudo, se extrajeron los hígados y fueron solubilizados. El contenido y nivel de fosforilación

de moléculas involucradas en la señalización de EGF fueron analizados por *Western Blot*. Los resultados mostraron que los efectos de la GH sobre la cinética de activación de las distintas vías de señalización inducidas por el EGF fueron diferentes. En el caso de la vía JAK/STAT, los ratones normales mostraron una respuesta luego de los 10 minutos del estímulo, mientras que en los ratones que sobreexpresan GH el factor de transcripción STAT5 no fue activado por el EGF. En el caso de las MAPK no se observaron diferencias en la activación de Erk1/2 entre ratones normales y transgénicos. En cuanto a la vía PI3K/Akt, los resultados mostraron que en el hígado de ratones transgénicos Akt es activada rápidamente pero la respuesta no se mantiene en el tiempo, mientras que en los ratones normales la activación de Akt es sostenida.

- 613. (638) PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALAMIENTO DE IGF-1 EN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR Y EL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ZEB1**
Perrone, A.; Llorens, M.; Cavallo, N.; Cabanillas, A.
Departamento de Bioquímica Clínica, Fac. Cs Químicas, CIBI-CONICET

ZEB1 es un factor de transcripción (FT) involucrado en la diferenciación celular y metástasis tumoral, el cual actúa como represor de varios genes entre los que se encuentra su propio promotor. Al igual que para muchos otros FT, se piensa que más de una vía de señalización intracelular participa en la regulación génica y modificación postraduccional del mismo en respuesta a cambios del medio ambiente celular. Entre las vías propuestas como reguladoras de ZEB1 se encuentran PI3K/Akt y MEK/ERK, ambas gatilladas por IGF-1. Nuestro objetivo es determinar el rol de la señal IGF-1 en la regulación del promotor de ZEB1 y la contribución de las vías mencionadas anteriormente a tal efecto. Las líneas celulares HEK 293T (baja o nula expresión de ZEB1) y CHO-K1 (expresión isoforma hipofosforilada) se transfectaron con el vector de expresión de ZEB1 y un fragmento de 1000pb del promotor del gen ZEB1 acoplado a luciferasa como gen reportero. Posteriormente las células fueron tratadas con los inhibidores LY294002 (de PI3K), PD98059 (de ERK), NVP (del receptor de IGF-1) y sometidas al estímulo con IGF-1 en una concentración y tiempo de incubación predeterminados óptimos para inducir al promotor de ZEB1, obtenidos previamente a través de una curva dosis-efecto. Los valores de luciferasa demostraron incremento en la actividad transcripcional del promotor luego del estímulo con IGF-1, que disminuyó moderadamente por efecto de LY y marcadamente con NVP. Concluimos que la actividad de las vías de IGF-1 podrían jugar un rol importante como inductoras del promotor de ZEB1, ya que la inhibición de la misma revierte fuertemente el efecto de IGF-1. Así mismo, de las dos vías activadas por dicho factor, la de PI3K/Akt estaría más comprometida en la sumatoria de efectos de la vía, aún cuando no se puede descartar la participación de MEK/ERK.

- 614. (808) REGULACIÓN DE LA TIROSINA QUINASA C-SRC MEDIANTE LA ACTIVIDAD DEL CANAL DE CLORURO CFTR**
Massip Copiz, M.; Valdivieso, Á.; Clazure, M.; Schulman, G.; Santa Coloma, T.
Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina

La Fibrosis Quística (FQ) es una de las enfermedades hereditarias autosómicas recesivas más frecuentes en la mayoría de los países europeos y americanos, entre ellos la Argentina, con una incidencia de 1 cada 2500. La FQ es causada por mutaciones en el canal de cloruro CFTR, siendo la más frecuente la delección de la fenilalanina en la posición 508. Anteriormente encontramos que la expresión y activación de c-Src estaba aumentada en células FQ. Los objetivos de este trabajo fueron determinar el rol diferencial del LPS sobre la actividad de c-Src en células control y células FQ y corroborar si en otros modelos celulares se puede observar este aumento de la actividad de c-Src. Primeramente, se utilizaron células IB3-1 (con la mutación deltaF508 que afecta

el transporte de Cl⁻) y S9 (IB3-1 corregidas mediante un vector viral que expresa CFTR wt) a las cuales se las trató con cóctel de estimulación de la actividad del CFTR (db-AMPC, isoproterenol e IBMix) y concentraciones crecientes de LPS. Mediante la técnica de Western Blot se observó un aumento diferencial de la actividad de c-Src en las células IB3-1 comparadas con las S9. Posteriormente, se utilizó otro modelo celular para poder corroborar estos resultados. Se transfectaron células CaCo2, que expresan CFTR wt, con cuatro ARNs de interferencia. Se realizó una selección clonal de estas células y se observó que los ARNi inhibieron la expresión del CFTR en diferente grado. Mediante WB se observó que la actividad de c-Src era mayor en las líneas celulares transfectadas que mostraban mayor inhibición del CFTR. Paralelamente, 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 de la ANPCYT (PICT-2007, 00628), CONICET (PIP 2009-2011) y UCA. Becas CONICET (MMMM, MC, GS) y UCA (AGV).

615. (116) LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA FACILITA LA ACCIÓN PRO-APOPTÓTICA DE INHIBIDORES DE MAPK Y NF-KB

Papademetrio, D.; Simunovich, T.; Cavaliere, V.; Costantino, S.; Lombardo, T.; Álvarez, E.

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Los tumores de páncreas son altamente resistentes a la quimioterapia. Entre las vías de señalización involucradas en su carcinogénesis pancreática están MAPK y NF-κB, de las que poco se conoce en estos tumores. Por ello, nuestro objetivo fue determinar el rol de estas vías en los mecanismos muerte/sobrevivencia de esta patología. Describimos la sobre-activación de las vías MEK/ERK y NF-κB. Comprobamos que los inhibidores UO126 y CAPE, disminuyen el crecimiento de las líneas MIAPaCa-2 y PANC-1 ($p < 0.001$), pero con bajos porcentajes de apoptosis. Demostramos que el pretratamiento con 3 metil-adenina (3-MA) induce porcentajes significativos de muerte apoptótica por tratamiento con UO y CAPE, incrementándose en un 15% los valores obtenidos previamente. Con UO126 se alcanzaron valores de muerte celular del 24,8±3,4% y 40,2±4,9% para MIAPaCa-2 y PANC-1 respectivamente, analizados por la técnica de TUNEL. En tanto que CAPE mostró valores del 38,0±1,5% y 34,2±4,5% para las ambas. Mediante ensayos de detección de picos subG1 se obtuvieron resultados similares. Finalmente demostramos que luego del pre-tratamiento con 3-MA, UO produjo aumento de Bax/Bcl-XL y Bad/Bcl-XL, con la caída de los niveles de survivina e incremento de pro-caspasa 3 y clivaje de PARP en las células MIAPaCa-2. Sobre la línea PANC-1, también produjo aumento de Bax/Bcl-XL y Bad/Bcl-XL, con una disminución de los niveles de survivina. CAPE estimuló el incremento de Bax/Bcl-XL y Bad/Bcl-XL, una disminución de los niveles de survivina y aumento de pro-caspasa 3 y clivaje de PARP en la línea MIAPaCa-2. En la línea celular PANC-1, indujo un mayor aumento de Bax/Bcl-XL y disminución de Bad/Bcl-XL, acompañado de la caída de survivina, sin modificaciones de pro-caspasa 3 ni PARP. Nuestros resultados ayudan a comprender la implicancia de las vías de señalización de MAPK y NF-κB en la tumorigénesis pancreática y su asociación a la instauración de autofagia como mecanismo resistencia a la muerte celular.

REPRODUCCIÓN 5

616. (80) OFERTA DIETARIA DE ÁCIDOS GRASOS N-6 Y N-3 Y MEMORIA: ¿RELACIÓN O CANTIDAD?

Bianconi, S., Vico Castro, B., Sella, E., Carlini, V., Santillán, M., Stutz, G.

Cátedra de Fisiología Humana, FCM, UNC

Un adecuado aporte dietario de ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3 durante la gestación y la lactancia puede tener repercusiones

en las habilidades psicomotrices del individuo adulto. En el presente estudio exploramos la influencia de diferentes niveles de estos compuestos sobre la performance de la memoria en ratones *albino swiss* machos y hembras. Se administraron tres dietas con el siguiente contenido (g/100g de alimento) y relación de n-6/n-3 respectivamente: **C** o Control: alimento balanceado comercial -ABC- (1,59; 0,08; 19,87); **S5**: ABC + 5% de aceite de soja (4,14; 0,43; 9,62); **B5**: ABC + 5% de aceite de hígado de bacalao (1,51; 1,33; 1,13). Tres grupos de hembras fueron alimentadas durante gestación y lactancia (**C**, n=5; **S5**, n=5; **B5**, n=8) y sus crías recibieron las dietas respectivas desde el destete hasta la adultez, momento en el cual se realizó en estos últimos test de reconocimiento de objetos para evaluar memoria no aver-siva según Ennaceur y Aggleton. Cumplieron con los criterios de inclusión del test **C**, n=20; **S5**, n=16; **B5**, n=20. El hallazgo más relevante fue que el porcentaje de tiempo de exploración del objeto nuevo fue semejante en **B5** y **C** siendo significativamente menor en **S5** vs **C** para ambos sexos. El detrimento observado en la memoria del grupo **S5** podría fundamentarse considerando que su dieta posee una oferta absoluta de n-3 y una relación n-6/n-3 más adecuada que **C** pero excede los valores absolutos de n-6 recomendados. Esta situación permite inferir que debido a la competencia enzimática entre las series n-6 y n-3, la producción de ácidos grasos de cadena larga de los primeros prevaleció sobre los segundos, entre estos el ácido docosahexaenoico, cuyo papel es relevante en el desarrollo y función del SNC. Además nuestras evidencias indican que el aumento absoluto en la oferta de n-3 en **B5** no produjo optimización de la función evaluada respecto al control. Queda claro que tanto la cantidad absoluta como la relación n-6/n-3 recomendables según la especie, merecen todavía estudios adicionales.

617. (86) EL TRATAMIENTO CON CABERGOLINA LOGRÓ REVERTIR LA HIPERPROLACTINEMIA Y LA INFERTILIDAD EN RATONES HEMBRAS HIPERSECRETORAS DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICAS HUMANAS (HCG)

Ratner, L.¹, González, B.¹, Ahtiainen, P.², Di Giorgio, N.¹, Poutanen, M.², Calandra, R.¹, Huhtaniemi, I.³, Rulli, S.¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental/ Departamento de Fisiología, Instituto de Biomedicina. Universidad de Turku/ Departamento de Cirugía y Cáncer, Imperial College of London. Londres³

Se ha demostrado previamente que ratones transgénicos que sobreexpresan la subunidad β de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCGβ+) producen elevados niveles de hCG, son infértiles y desarrollan hiperprolactinemia asociada a la formación de prolactinomas en la adultez (Rulli y col., *Endocrinology* 2002). El objetivo de este trabajo consistió en analizar los efectos de un tratamiento breve con el agonista dopaminérgico cabergolina sobre la infertilidad en estas hembras. Para ello, hembras hCGβ+ de 5 (hCGβ+cab5s) ó 12 semanas de edad (hCGβ+cab12s) se inyectaron i.p. con 500 µg/kg de cabergolina día por medio durante una semana. Luego de dos semanas, dichas hembras se sometieron a estudios de fertilidad. Un 70% de las hembras hCGβ+cab5s (7/10) recuperaron la fertilidad, mientras que todas las hembras hCGβ+cab12s (0/4) permanecieron infértiles luego del tratamiento. Se determinó a los 2 y 6 meses de edad, el peso de la hipófisis y las concentraciones séricas de prolactina, progesterona y testosterona por radioinmunoensayo. En ambas edades, se detectó un aumento significativo en el peso hipofisario y en los niveles de todas las hormonas en hCGβ+ ($p < 0,05$) y una disminución en hCGβ+cab5s ($p < 0,05$). Por otro lado, se estudió la expresión génica de *Prl* y la proteína de unión al elemento regulador de prolactina (*Preb*), por RT-PCR en tiempo real. A los 6 meses de edad, estos factores resultaron aumentados en hCGβ+ y disminuidos sólo en hCGβ+cab5s ($p < 0,05$). Se estudió además la expresión de genes reguladores de la proliferación hipofisaria, observándose una activación de *Pcna*, *Ccnd1* y *E2f1* en hCGβ+ a los 6 meses, mientras que el tratamiento con cabergolina logró prevenir dicho efecto. En conclusión, el tratamiento breve con cabergolina aplicado a hembras transgénicas jóvenes logró re-

cuperar la fertilidad y revertir la hiperprolactinemia y el desarrollo de tumores hipofisarios en la adultez.

618. (122) ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL FETO Y LA PLACENTA DE RATA DIABÉTICA

Mazzucco, M., Fornes, D., Martínez, N., Jawerbaum, A., White, V.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CEFYBO-CONICET

La diabetes materna induce anomalías de crecimiento en la descendencia. La macrosomía y placentomegalia son indicadores de desbalances en los factores de crecimiento, que afectan el desarrollo y crecimiento feto-placentario. Hemos reportado placentomegalia y macrosomía en la descendencia de rata diabética. El crecimiento placentario y fetal es inducido por insulina (I) y los factores de crecimiento similar I (IGF1 y 2) que ejercen su efecto a través del receptor de insulina (RI) y de IGF1 (RIGF1). **Objetivo:** Evaluar si la diabetes materna induce alteraciones en los niveles y expresión de I, IGF 1 y 2 y sus receptores en la placenta y feto de rata de 21 días de preñez. **Métodos:** La diabetes fue inducida por administración neonatal de estreptozotocina a ratas hembra. Ratas control (C) y diabéticas (D) fueron apareadas con machos sanos. Al día 21 de preñez se sacrificaron las ratas y se obtuvieron placentas y órganos fetales. La expresión de IGF1 y 2, del RIGF1, RIGF2 y RI fue evaluada por PCR en tiempo real. Se dosaron los niveles de I, IGF1 y 2 por EIA. **Resultados:** Los niveles de I están disminuidos en la madre D ($p < 0.05$) y aumentados en el feto D ($p < 0.01$). Las madres D presentan niveles elevados de IGF2 ($p < 0.05$), mientras que sus fetos tienen altos niveles de IGF1 ($p < 0.001$). La placenta D presenta incrementos en la expresión de IGF1 ($p < 0.01$), IGF2 ($p < 0.05$) y de IGF2R ($p < 0.05$). La expresión de IGF1, IGF2 y de IGFR1 está incrementada en el hígado de fetos D ($p < 0.01$). El corazón de fetos D presenta incrementos en la expresión de IGF1, RI ($p < 0.001$) y de IGF2, RIGF1, RIGF2 ($p < 0.01$). En cuanto al pulmón de feto D, se observó una disminución en la expresión de IGF1 ($p < 0.01$), RI ($p < 0.05$) y un incremento en la de RIGF2 ($p < 0.01$). **Conclusiones:** La diabetes materna induce alteraciones en la expresión y niveles de I, IGFs y sus receptores, lo que podría generar las anomalías observadas en el crecimiento placentario y fetal, siendo el corazón fetal, el órgano más alterado.

619. (90) TRATAMIENTOS DIETARIOS SUPLEMENTADOS CON ACEITE DE OLIVA REGULAN LA EXPRESIÓN DE PGC-1 Y LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS Y SUS INHIBIDORES ENDÓGENOS EN EL TEJIDO DECIDUAL DE RATAS DIABÉTICAS

Higa, R., Kurtz, M., White, V., Jawerbaum, A.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CEFYBO-UBA-CONICET

La diabetes materna induce un ambiente proinflamatorio intrauterino que afecta el desarrollo embrionario. Previamente observamos que tratamientos dietarios maternos con aceite de oliva conteniendo 75% de ácido oleico, agonista de receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) previenen alteraciones embrionarias y placentarias. Las desaturasas son enzimas insulino-dependientes que regulan la síntesis de ácidos grasos insaturados agonistas de PPARs. Los PPARs regulan vías de desarrollo y antiinflamatorias, siendo PGC-1 coactivador de dichos receptores. Las metaloproteasas (MMPs) son enzimas proteolíticas involucradas en el desarrollo, que pueden ser sobreactivadas en un entorno proinflamatorio y los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs) controlan su actividad. **Objetivo:** Analizar el efecto de una dieta rica en aceite de oliva (OL) sobre la expresión de PGC-1 y $\Delta 5$ desaturasa y sobre la actividad de las MMPs y TIMPs en decidua de ratas sanas y diabéticas en día 10,5 de preñez. **Métodos:** Ratas sanas y diabéticas fueron tratadas o no desde el día 0,5 al 10,5 de gestación con OL (6%, suplementación dietaria). Se evaluó la expresión de PGC-1 y $\Delta 5$ desaturasa por PCR y la actividad de MMP2 y MMP9 por zimografía y de TIMPs por zimografía reversa.

Resultados: La decidua de rata diabética presentó menor expresión de PGC-1 y $\Delta 5$ desaturasa ($p < 0.05$). OL incrementó la expresión de PGC-1 en deciduas de ratas sanas y diabéticas ($p < 0.05$) sin tener efecto sobre $\Delta 5$ desaturasa. La decidua de rata diabética mostró mayor actividad de MMP2, MMP9 y TIMPs ($p < 0.05$). OL redujo la actividad de MMP9 e incrementó la de TIMPs en decidua de ratas sanas y diabéticas ($p < 0.01$). **Conclusiones:** En la decidua de rata diabética se encuentran alterados reguladores de la vía de señalización de PPARs y tratamientos maternos enriquecidos en ligandos de PPARs incrementan la expresión de PGC-1 y la actividad de TIMPs decidual, reduciendo la anómala sobreactividad de MMPs.

620. (127) EL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) INDUCE APOPTOSIS EN EL ÚTERO DE RATÓN PREÑADO A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES 1 (CB1)

Salazar, A.¹, Vercelli, C.¹, Aisemberg, J.¹, Bariani, M.¹, Davio, C.², Franchi, A.¹

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos¹ Laboratorio de Farmacología de Receptores, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA²

Los endocannabinoides son una familia de mensajeros endógenos que han surgido como nuevos e importantes reguladores que modulan diversas condiciones fisiológicas, incluyendo la reproducción. 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. En el presente trabajo estudiamos el efecto apoptótico del LPS (1ug/ml) y de la meta-anandamida, un análogo no hidrolizable de la anandamida, en fragmentos uterinos provenientes de sitios de implantación de hembras Balb-C en el día 7 de gestación. El LPS y la meta-anandamida aumentaron la desorganización tisular en los fragmentos uterinos y produjeron condensación de la cromatina así como la formación de pequeños cuerpos apoptóticos, hecho que fue revertido, en ambos casos, por la co-incubación con un antagonista del receptor CB1. Se midió también la actividad de las caspasas 3 y 7. Se realizó una curva en el tiempo para determinar la actividad máxima inducida por el LPS, la cual fue a las 9 horas de incubación (incremento del 63%). En ese tiempo también se realizó una curva concentración-respuesta de meta-anandamida y se pudo determinar que el EC, a una concentración de 10^{-8} M, aumenta la actividad de estas enzimas ($p < 0,05$). Estos resultados muestran que tanto el LPS como la meta-anandamida producen daño tisular; y aumento en la actividad de las caspasas ejecutoras de la apoptosis, lo que sugiere que la el receptor CB1 podría participar del mecanismo de acción del LPS.

621. (232) EXPRESIÓN DE CD44 Y RHAMM EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL (ETG)

Mascar, M.¹, Zotta, E.², Bianconi, M.³, Lago, N.⁴, Lomparda, S.¹, Otero, S.³, Alvarez, E.¹, Jankilevich, G.³, Hajos, S.¹

Cátedra de Inmunología-IDEHU - FFyB - UBA-CONICET¹ Laboratorio de Fisiopatogenia, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA.² Servicio de Oncología, Hospital de Agudos "C G Durand".³ Centro de Patología Experimental y Aplicada, Depto. de Patología, Facultad de Medicina, UBA.⁴

La ETG abarca un grupo de entidades interrelacionadas derivadas del trofoblasto tales como mola hidatiforme (MH), y tumores malignos como coriocarcinoma (CC). Mola hidatiforme puede ser clasificada como parcial o completa según la expresión del marcador p57kip2. El ácido hialurónico (AH) es uno de los principales componentes de la matriz extracelular, cuyos principales receptores son CD44 y RHAMM. Estos están involucrados en varios procesos celulares tales como proliferación y migración celular. Previamente demostramos que AH se expresa tanto en membrana basal como

apical de las vellosidades de mola hidatiforme versus placenta temprana, independientemente de la clasificación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia y distribución de CD44 y RHAMM, y determinar su potencial empleo como marcador diferencial en esta patología. Para ello se emplearon técnicas inmunohistoquímicas. Con el aval del Comité de Ética del Hospital de Agudos "C G Durand", se utilizaron muestras de de placenta temprana normal (n=4), mola hidatiforme (n=8) y CC (n=2). Resultados: en mola hidatiforme RHAMM se halla presente en el área perinuclear del citotrofoblasto vellosito y en la membrana apical de la vellosidad. Además, también se encuentra rodeando la membrana del trofoblasto extraveloso. En placenta temprana se halla expresado con menor intensidad en el citoplasma del citotrofoblasto relacionado a las vellosidades de anclaje. En coriocarcinoma, se encontraron áreas de intensa tinción en las uniones intercelulares de las células tumorales próximas al tejido materno. Resultados preliminares sobre CD44 sugieren una disminución en la expresión de esta proteína en las muestras analizadas. Conclusión: La sobreexpresión de RHAMM en MH sugiere que podría ser utilizado en el diagnóstico diferencial de esta patología. Además, nuestros resultados permiten inferir que RHAMM podría estar involucrado en mayor medida que CD44 en la patogénesis tanto de MH como de CC.

622. (251) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES RELACIONADOS AL DESARROLLO DEL LINAJE GERMINAL FEMENINO EN LAGOSTOMUS MAXIMUS, VIZCACHA DE LAS LLANURAS

Leopardo, N., Willis, M., Muscarse, M., González, C., Vitullo, A.
Universidad Maimónides

El desarrollo del linaje germinal en los mamíferos ha sido exhaustivamente estudiado en ratón. En este marco se determinó que las células germinales primordiales (PGCs) se diferencian en el huevo cilíndrico en la región del ectodermo embrionario (EctEm) por inducción del ectodermo extraembrionario (EctEx). Esto promueve que un grupo de células embrionarias expresen *FRAGILIS* y luego *STELLA* diferenciándose a PGCs. *Lagostomus maximus* es un roedor con desarrollo embrionario en forma de disco, similar al conejo e incluso al humano. El objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo de especificación de las PGCs en este modelo mamífero con disco embrionario, analizando la expresión de los genes de especificación de linaje germinal (*FRAGILIS*, *STELLA*, *OCT3/4* y *VASA*). Se trabajaron con 34 hembras preñadas de *L. m.* Se estudiaron 64 embriones en estadios pre-somíticos y somíticos por inmunohistoquímica sobre cortes histológicos e *in toto*. *OCT3/4* se observó en el núcleo de células en el EctEm al momento de la especificación del linaje germinal, en estadio de gastrulación. En embriones con 8 somitos se observaron PGCs en migración en la base del alantoides. *FRAGILIS*, *STELLA* y *VASA* no se detectaron en esas etapas embrionarias. Durante la migración, las PGCs en proliferación expresaban nuclearmente *STELLA* y *OCT3/4*, y citoplasmáticamente *FRAGILIS* y *VASA*. *L. m.* muestra un patrón de expresión espacio-temporal específico para los genes de especificación germinal no comparable al descripto para ratón. Es probable que estas diferencias se asocien a la falta de contacto entre el EctEx y el EctEm característico del desarrollo con disco. A diferencia de lo que ocurre en ratón, se encontró que ni *FRAGILIS* ni *STELLA* son necesarios para la especificación germinal. Estos resultados constituyen la primera descripción en un mamífero con desarrollo mediante disco y establecen una diferencia en la expresión génica germinal respecto del desarrollo mediante huevo cilíndrico como en ratón.

623. (273) REGULACION HORMONAL DEL DESARROLLO DE LA GLANDULA MAMARIA ADULTA DE LAGOSTOMUS MAXIMUS EN FUNCION DEL ESTADIO REPRODUCTIVO

Halperin, J., Dorfman, V., Giacchino, M., Vitullo, A.
CEBBAD, Universidad Maimónides

La pubertad marca cambios morfológicos en la estructura de la glándula mamaria debido a la acción de las hormonas estrógeno (E), progesterona (P) y prolactina (PRL). E regula la proliferación

y elongación del epitelio tubular y en tanto que P y PRL favorecen la ramificación y diferenciación durante la preñez y la lactancia. La vizcacha presenta poliovlulación masiva, supresión de atresia folicular, pseudo-ovulación durante la gestación y un perfil hormonal singular. Con el objetivo de estudiar la modulación hormonal del desarrollo de la glándula mamaria adulta de vizcacha, se caracterizó la morfología mamaria durante los estadios: reposo, preñez, lactancia e involución y se analizó la expresión de los receptores de E α y β (ER α y ER β), P (PR) y PRL (PRLR). Observamos que la glándula en reposo presenta una baja relación parénquima:estroma y una estructura simple conformada por túbulos interlobulillares y pocos alvéolos. Éste estadio se caracteriza por una expresión casi ausente de ER α y ER β mientras que PR se expresa en algunas células de los bulbos terminales. Durante la preñez aumenta la relación parénquima:estroma debido a la proliferación, elongación y ramificación tubular. ER α , ER β , PR y PRLR tienen una expresión marcada: ER α se localiza en el estroma subyacente a ductos y alvéolos mientras que ER β , PR y PRLR se localizan en el epitelio glandular. Al final de la preñez y durante la lactancia se observó diferenciación de alvéolos secretores de leche los cuales ocupan casi la totalidad de la glándula. Ésto se correlacionó con una marcada expresión de PR y PRLR. Durante la involución de la glándula no se observó expresión significativa de los receptores. Si bien la morfología de la glándula mamaria de vizcacha en relación al estadio reproductivo es similar a la descrita en otros roedores, existen marcadas diferencias en la regulación hormonal del desarrollo y diferenciación que estarían relacionadas con la pseudo-ovulación que ocurre durante la gestación.

624. (292) ALTERACIONES MATERNO-FETALES PRODUCIDAS POR TOXINA SHIGA-2 EN ETAPA TEMPRANA DE PREÑEZ

Sacerdoti, F., Amaral, M., Zotta, E., Ibarra, C.
Laboratorio de Fisiopatogenia-Facultad de Medicina-UBA

Introducción: En Argentina la toxina Shiga-2 (Stx2) producida por *E. coli* enterohemorrágica es la principal responsable del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Experimentos previos de nuestro laboratorio demostraron que la inoculación intraperitoneal (i.p.) de sobrenadante de cultivo de *E. coli* recombinante que expresa Stx2 es capaz de producir parto prematuro de fetos muertos en etapa tardía de preñez. Objetivo: Evaluar el efecto de Stx2 purificada (Lab.Phoenix.USA) sobre el estado materno-fetal en etapa temprana de preñez. Materiales y Métodos: Ratas Sprague Dawley (200 gr) se inocularon i.p. en día 8 de gestación (dg 8) con 200 μ l de Stx2 (0,25; 0,5; 1 ng Stx2/g de peso). El grupo control se inyectó con igual volumen de PBS. Se evaluó la sobrevivencia materna, la ingesta de agua y comida hasta la fecha de parto y el número de fetos viables posparto. Otros grupos de ratas controles y experimentales se sacrificaron entre 4 y 6 días post tratamiento para evaluar la macro y microscopía fetal y uterina. Resultados: En los tres grupos experimentales se observó pérdida de apetito con descenso de peso hasta los 6-7 días post tratamiento (dg 15), recuperándose posteriormente. Además presentaron sangrado vaginal entre los 6 y 12 días post inyección (dg14-20). La dosis de 0,25 ng Stx2/g produjo reabsorción fetal total o parcial con algunos nacimientos de crías vivas a término. La dosis de 0,5 ng Stx2/g también ocasionó reabsorción fetal total o parcial y los fetos que nacieron vivos a término no sobrevivieron. En cambio, la dosis de 1 ng Stx2/g produjo pérdida total de la preñez. Conclusión: El tratamiento con Stx2 en día 8 de gestación produce efectos variables en el mantenimiento de la preñez como reabsorción fetal total o parcial y algunos nacimientos normales a término.

625. (330) ESTUDIO DE ENZIMAS Y MARCADORES DEL BALANCE REDOX EN MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA EN LA EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS

Rivero Osimani, V.^{1,2}, Quintana, M.^{1,3}, Guinazú, N.¹, Magagnelli, G.^{1,2}
IDEPA-CONICET UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE¹ Facultad de Ciencias Médicas² Facultad de Ciencias de la Educación UNCo.³

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, son mediadoras de vías de señalización y de mecanismos de estrés. La producción de estas especies es sensible a los contaminantes ambientales, entre los que se incluye a los plaguicidas. Estudios previos de nuestro laboratorio en placenta de embarazadas expuestas a organofosforados (OF) demostraron incremento en la actividad de arginasa, enzima que compete por el sustrato con la oxido nítrico sintasa (NOS). Considerando además el rol regulador de dichas especies reactivas en la función mitocondrial, el objetivo de este trabajo fue estudiar si la exposición a OF afecta marcadores del balance redox de mitocondrias y a enzimas involucradas en dicho balance. Previa aplicación de criterios de exclusión y obtención del consentimiento informado, se colectaron placentas de residentes rurales (ZR, n=37) y urbanos (ZU, n=17) en periodo de pulverización (PP) y de receso (PR). Se obtuvieron mitocondrias del sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto por centrifugación diferencial. El impacto de OF en placenta se evaluó mediante la actividad del biomarcador carboxilesterasa, que disminuyó (17 %; $p < 0,05$) en ZR en PP respecto de ZU. Los niveles de proteínas modificadas con 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), estudiados por western blot, mostraron una tendencia a la disminución en ambos tipos de mitocondrias de ZR en PP. La actividad de Mn-superóxido dismutasa de mitocondrias, determinada por espectrofotometría no varió, mientras que la expresión de iNOS (NOS inducible) de homogenato de placenta, estudiada por western blot, resultó significativamente disminuida en PP vs PR y ZU ($p \leq 0,01$). Estos resultados sugieren que la exposición ambiental a OF, no induce estrés oxidativo a nivel mitocondrial. Sin embargo, la disminución de iNOS, concomitante con el aumento de arginasa disminuiría los niveles de NO afectando la relajación vascular placentaria.

Agradecimientos: Méd. M. Curioni., S. Santa Cruz. Subsidios: UNCo, CONICET, Beca FONCyT.

626. (457) FUNCIÓN DUAL DEL PDGF (FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS) EN EL OVARIO: ¿ANGIOGÉNICO Y ANTIAPÓPTÓTICO?

Pascuali, N.¹, Scotti, L.¹, Abramovich, D.¹, Tesone, M.^{1,2}, Parborell, F.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental/ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA²

En el ovario, la angiogénesis cumple un rol esencial en la foliculogénesis y la formación del cuerpo lúteo. Junto al VEGF, participan otros sistemas como el de PDGF en el desarrollo de la vasculatura funcional. Previamente, demostramos en ovario de rata que la inhibición de PDGF alteraba la foliculogénesis. El objetivo fue estudiar en ovario el rol del PDGF sobre la apoptosis, la proliferación y el desarrollo vascular. Ratas prepúberes tratadas con eCG (gonadotropina coriónica equina) fueron inyectadas en forma intraovárica con un inhibidor del receptor de PDGF (AG1295, 20 µg/ovario) en un ovario y el contralateral con vehículo (C). A las 24hs de tratamiento, los ovarios fueron aislados para extracción de ADN apoptótico, para proteínas para western, y para cortes histológicos (IHQ para el marcador endotelial: VW, y peri-endotelial: a-actina). El AG1295 causó un incremento en la fragmentación apoptótica del ADN respecto al C ($p < 0,001$). El AG1295 aumentó los niveles de caspasa-8 activa ($p < 0,05$) sin alterar los niveles de FAS ni de FASL. El AG1295 aumentó los niveles de BAX (proapoptótica) sin cambios en BCL-2 (antiapoptótica). Con respecto a la proliferación, el AG1295 disminuyó los niveles de pAKT y de pBAD (inactivo). Por IHQ observamos que en el ovario, el AG1295 disminuyó el área vascular en células endoteliales y peri-endoteliales ($p < 0,001$). En conclusión, en el ovario, el sistema de PDGF cumpliría un rol fundamental como factor de supervivencia en la selección del folículo dominante, no solo por participar en la regulación de la angiogénesis folicular, sino también por participar en la regulación de la proliferación y la apoptosis de las células ováricas.

627. (515) EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA DE UNIÓN A IGF (IGFBP4) Y DE LA ENZIMA PROTEOLÍTICA PAPP-A EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE VACAS CON ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA (COD)

Rodriguez, F.^{1,2}, Colombero, M.¹, Panzani, C.¹, Salvetti, N.^{1,2}, Ortega, H.^{1,2}, Rey, F.^{1,2}

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada- FCV-UNL¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas²

El crecimiento y dominancia folicular son controlados por hormonas a través de acciones endocrinas, paracrina y autocrinas que incluyen la participación del sistema IGF. IGF1 y 2 ejercen sus acciones principalmente a través del receptor tipo 1 (IGFR1). La unión al receptor es modulada por proteínas de unión (IGFBPs) y por la acción de proteasas específicas de IGFBPs. Las proteasas como PAPP-A, degradan IGFBPs e incrementan la disponibilidad de IGF1 y 2. Se ha descrito que señales endocrinas y el microambiente folicular regulan el desarrollo de la COD, postulando al sistema IGF como uno de los principales moduladores. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de IGFBP4 y PAPP-A en ovarios de vacas con COD espontánea e inducida, y controles. Se evaluó el ARNm de IGFBP4 por PCR en tiempo real y por hibridación *in-situ* en la pared de folículos terciarios controles y quísticos. Para el estudio de la expresión génica de PAPP-A se realizó PCR en tiempo real en células de la granulosa provenientes de muestras foliculares controles y con COD. Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, mostraron niveles de IGFBP4 similares en las diferentes estructuras analizadas. Sin embargo, por hibridación *in-situ*, se observó una disminución en la expresión de IGFBP4 en las células de la granulosa de quistes respecto a folículos controles en crecimiento ($p < 0,05$), observándose bajos niveles de expresión en células de la teca en todas las estructuras analizadas. Se observó una mayor expresión de PAPP-A en células de la granulosa en quistes respecto a folículos terciarios controles ($p < 0,05$). Podríamos proponer que la alta expresión de PAPP-A, afectaría la síntesis de IGFBP4 en animales con COD. De esta manera, se apoyaría la hipótesis de que alteraciones en componentes fundamentales para el control del crecimiento folicular como el sistema IGF, constituirían factores relevantes en el desarrollo de la COD bovina.

628. (685) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN LA REMODELACIÓN UTERINA: EFECTO DE ANGIOTENSINA II EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS POR CÉLULAS DE ESTROMA DE ENDOMETRIO, INHIBICIÓN POR CICLOSPORINA A

Abraham, M., Parrado, C., Rey-Roldan, E., Gentile, M., Canellada, A.

IDEHU Prof Dr Ricardo Margni, CONICET UBA. Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

El sistema renina-angiotensina se expresa en la interfase materno fetal. Angiotensina II (Ang) inhibe la invasión trofoblástica mediante la inducción de PAI-1 por la ruta de calcineurina (CN) y NFAT. Hemos demostrado que esta ruta participa en la inducción de Cox-2 por Ang en células de estroma aisladas de endometrio de ratas vírgenes (rESC). Cox-2 y Ang están involucradas en endometriosis y pre-eclampsia. Quisimos investigar si Ang participa en la remodelación uterina a través de la ruta de CN/NFAT. Aislamos rESC y analizamos el efecto de Ang (125-500nM) en presencia y ausencia de un inhibidor de CN (ciclosporina A, CsA), sobre la proliferación celular (incorporación de BrdU); y sobre la secreción de metaloproteinasas (enzimografía). Se comparó el efecto de Ang con el de estradiol (E2). Ang inhibió ($p < 0,001$ a la máxima cc) la proliferación de rESC de manera dosis dependiente, efecto revertido por CsA: (RLUs±SEM) Control: 222872±8235; Ang 125nM: 195605±14950; Ang 500nM: 148248±12877; CsA/Ang 125 nM: 181565±215; CsA/Ang 500nM: 244498±2653. Este efecto se opone a la inducción de la proliferación de rESC por E2 ($p < 0,001$), también inhibida por CsA: Control: 222872±8235; E2 10(-9)M: 257323±34035; E2 10(-8)M: 477917±7974; CsA/E2 10(-9)M: 198337±24995; CsA/E2 10(-8)M: 336162±27094. Asimismo Ang inhibió ($p < 0,05$) la inducción de la proliferación de rESC por E2: E2 10(-8)M: 477917±7974; Ang 125nM/E2 10(-8)M: 375973±9678. Por otro lado Ang estimuló ($p < 0,001$ a la máxima cc) la secreción

de MMPs por rESC de forma dosis dependiente, efecto revertido por CsA: (veces de incremento \pm SEM) Control: 1 \pm 0; Ang 125nM: 1,15 \pm 0,14; Ang250 nM: 1,59 \pm 0,02; Ang 500nM: 2,23 \pm 0,15; CsA/Ang 125nM: 1,16 \pm 0,09; CsA/Ang 250nM: 0,85 \pm 0,24; CsA/Ang 500nM: 1,65 \pm 0,23. Concluimos que Ang, a través de la actividad de CN, podría regular los procesos de remodelación uterina, y que este miembro del RAS afectaría el normal desarrollo de los mismos al modificar las acciones de los estrógenos sobre el estroma.

629. (759) CONTRIBUCIÓN DEL NEUROPEPTIDO VIP AL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS EN LA INTERFASE MATERNO-PLACENTARIA: SU RELEVANCIA EN MODELOS MURINOS DE GESTACIÓN NORMAL Y PATOLÓGICA

Gallino, L., Fraccaroli, L., Grasso, E., Hauk, V., Pérez Leirós, C., Ramhorst, R.

Laboratorio de Inmunofarmacología, Dpto. Química Biológica, FCEN-UBA. IQUIBICEN-CONICET

La generación de la interfase materno-placentaria implica una respuesta inflamatoria inicial que luego es controlada con inducción de una respuesta tolerogénica materna. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) tiene actividad inmunomoduladora por acción sobre linfocitos T y células presentadoras de antígeno, promoviendo un perfil anti-inflamatorio y tolerogénico. En este trabajo analizamos el efecto de VIP en sitios de implantación en cruces de ratones normales y con fallas en la gestación. Las hembras de cruces normales (BALBxBALB y CBAXBALB) y patológicas (CBAXDBA y NODxNOD) se sacrificaron al día 9 de preñez y se tomaron explantes de sitios de implantación. La expresión del VIP analizada por RT-PCR y real time-PCR, mostró que VIP se induce en los sitios de implantación de las hembras preñadas en todas las cruces comparado con útero de hembras no preñadas (no detectable). Además, su receptor VPAC2 también se indujo por la gestación mientras que VPAC1 se expresa en forma constitutiva. En todas las cruces, el tratamiento de los explantes con VIP indujo marcadores de perfil tolerogénico. Particularmente en la cruce CBAXDBA, con alta tasa de resorción embrionaria, se evidenció un aumento de IL-10 y Foxp3 y disminución de IL-17 y ROR γ T evaluados por RT-PCR ($p < 0,05$). Más aún, el tratamiento in vivo con VIP (1nmol ip) en el día 6 de gestación aumentó significativamente el número de sitios con embriones viables al día 9 (5,0 \pm 0,32 vs 7,5 \pm 0,50 $p < 0,05$ Test de Student) en comparación con las hembras de la misma cruce tratadas con PBS. Asimismo, los sitios viables de hembras tratadas con VIP presentaron menores niveles de expresión de IL-17 evaluado por RT-PCR y mayores de IL-10, entre otros mediadores. En conclusión, VIP indujo un aumento de citoquinas compatible con un perfil tolerogénico en los sitios de implantación en cruces normales y patológicas y un mayor número de embriones viables en estas últimas.

GENÉTICA 3

630. (45) ESTUDIO MOLECULAR DE HIPOACUSIAS NO SINDRÓMICAS EN LA ARGENTINA. ABORDAJE MULTIGÉNICO

Dalamon, V.¹; Wernert, M.¹; Lotersztein, V.²; Elgoyhen, A.¹ INGEBI¹ Servicio de Genética-Hospital de Clínicas "José de San Martín"²

La hipoacusia es el desorden neurosensorial con mayor prevalencia en los países desarrollados. Aproximadamente 1/1000 niños nacen con algún tipo de deficiencia auditiva, de los cuales el 50% son genéticos. La mayor cantidad de pacientes presentan una herencia autosómica recesiva (70%) y no evidencian ningún otro síntoma asociado (forma no sindrómica, 70%). Estudios multicéntricos han demostrado que el 50% de las formas recesivas son causadas por mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6*, y el otro 50% de los casos se debería a mutaciones en otros genes. Los genes *GJB2* y *GJB6* codifican para la conexina 26 y 30 respectivamente, las cuales permitirían el reciclado del potasio hacia la endolinfa. El objetivo del trabajo realizado en el laboratorio fue

ampliar el número de genes analizados, realizando un abordaje multigénico para aquellos pacientes que no pueden ser genotipificados mediante el estudio de los genes *GJB2* y *GJB6*. Por lo que se deciden estudiar los genes *OTOF*, *MT-RNR1*, *TECTA* y *EYA4*. Se analizaron 474 muestras de ADN de pacientes no relacionados (104 familiares y 370 esporádicos). Inicialmente se comenzó con el estudio en los genes *GJB2* y *GJB6*. En los pacientes en los que no se detectaron mutaciones, se amplió el estudio a los genes *OTOF*, *MT-RNR1*, *TECTA* y *EYA4*. Se detectaron variaciones de secuencia en 169 de los 474 pacientes analizados (36%). En total se hallaron 43 mutaciones distintas en los genes *GJB2* y *GJB6*. El efecto de las mutaciones sobre los aminoácidos traducidos incluyó cambios de sentido, pérdida de sentido, inserciones, deleciones, corrimiento del marco de lectura y aparición de codón stop. Cuatro de las mutaciones identificadas en *GJB2* resultaron nuevas: c.233 insG, p.Ala78Ser, p.Val190Asp y p.Cys211Tyr. Hasta el momento no se han identificado mutaciones en ninguno de los otros genes analizados. Los resultados permitieron identificar nuevas mutaciones en los genes en estudio y establecer por primera vez en el país, un estudio sistemático a gran escala, mediante un abordaje multigénico para pacientes con hipoacusia no sindrómica.

631. (136) PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS POR TRATAMIENTO CON GB3 Y DGJ EN CÉLULAS DENDRÍTICAS Y MACRÓFAGOS DERIVADOS DE PBMC NORMALES. IMPLICACIONES PARA LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE FABRY

De Francesco, P.; Mucci, J.; Ceci, R.; Rozenfeld, P.

Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

La enfermedad de Fabry (EF) es un desorden genético X-ligado, caracterizado por la deficiencia en la actividad de la enzima lisosomal α -galactosidasa A (α Gal), que conduce a la acumulación de glicolípidos neutros, principalmente globotriaosilceramida (Gb3). Se ha sugerido la existencia de un estado proinflamatorio crónico como uno de los factores de su fisiopatología. Resultados previos de nuestro grupo mostraron una producción y expresión aumentada de citoquinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con EF, y en particular en células dendríticas (DC) y monocitos (M). El objetivo del presente trabajo es investigar los efectos del Gb3 y del DGJ, un inhibidor de α Gal, sobre la producción de citoquinas en DC y macrófagos (M Φ) derivados de PBMC normales. Partiendo de *buffy coats* normales, se aislaron PBMC por centrifugación en gradiente de ficoll, y posteriormente se purificaron M por adhesión en cultivo de 1h. Los M obtenidos se cultivaron por 6 días en presencia de GM-CSF e IL-4, o M-CSF, para diferenciarlos a DC o M Φ , respectivamente. Se cultivaron luego las DC y M Φ obtenidos por 24 hs en presencia o ausencia de Gb3 20 μ M y/o, DGJ 200 μ M, y se analizaron los niveles de IL- β , IL-6 y TNF en los sobrenadantes. Tanto en los cultivos de DC como de M Φ se observó un aumento significativo en la producción de IL-1 β y TNF, respecto del control, solo si se trataba conjuntamente con Gb3 y DGJ, (DC $p = 0,0018$ y $p = 0,0041$; M Φ $p = 0,0002$ y $p = 0,0054$, respectivamente). Se observó una tendencia similar para la producción de IL-6. Estos resultados muestran que mediante el agregado conjunto de Gb3 y DGJ en cultivos normales de las dos subpoblaciones estudiadas se puede inducir un estado proinflamatorio similar al observado en PBMC de pacientes con EF, lo que indicaría que los niveles elevados de Gb3 propios de la EF están directamente implicados en la fisiopatología del estado proinflamatorio en esta enfermedad.

632. (468) CLONADO DEL CDNA WT Y MUTAGENIZADO DEL GEN DE TIROPEROXIDASA HUMANA RESPONSABLE DE BOCIO CONGÉNITO

Belforte, F.^{1,2}; Osorio Larroche, C.^{2,1}; Olcese, C.^{1,2}; Citterio, C.^{1,2}; Targovnik, H.^{1,2}; Rivolta, C.^{1,2}

Lab. de Genética y Biología Molecular, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM UBA-CONICET), Hosp. de Clínicas¹ Cátedra de Genética y Biología Molecular (FFyB-UBA)²

El gen de Tiroperoxidasa (TPO) es el principal responsable de defectos en la organificación de yodo (IOD) los cuales se vinculan al Hipotiroidismo Congénito (HC), patología de alta prevalencia en Argentina (1/2100). Se propone aquí la obtención del cDNA de TPO para evaluar el impacto funcional de mutaciones identificadas en pacientes con diagnóstico clínico y bioquímico de IOD. La imposibilidad de obtener un TPOmRNA completo, siendo el tejido tiroideo abundante en RNAsas, llevó a diseñar 3 juegos de primers para obtener por RT-PCR 3 fragmentos de cDNA contiguos con parcial solapamiento de 1058, 959 y 1316 pb. Dichos fragmentos fueron clonados independientemente en el vector pGEMTEasy obteniéndose los clones pGEMT-TPO1, pGEMT-TPO2 y pGEMT-TPO3 los cuales fueron digeridos con enzimas de restricción que permitieran el correcto solapamiento de los fragmentos amplificados. Las enzimas Fse1 y Spe1 generaron fragmentos de 3820 y 825 pb a partir de pGEMT-TPO1 y pGEMT-TPO2 que ligados dieron lugar al clon pGEMT-TPO1+2. Este constructo junto con el pGEMT-TPO3 fueron clivados con Sma1 y Spe1 generándose 2 fragmentos de 4588 y 1269 pb que luego de ligados dieron origen al clon pGEMT-TPO1+2+3, obteniendo la secuencia proteica completa wt de la TPO (2772 pb). Se utilizó QuikChange XL para reproducir en el clon pGEMT-TPO1+2+3 mutaciones identificadas previamente en nuestro laboratorio (2382 T>C, p.C808R; 1119 G>A, p.G387R; 1456C>T, p.P499L y delC347). Cada una de las construcciones obtenidas al igual que las mutaciones introducidas fueron verificadas por secuenciación. Finalmente se liberaron los cDNAs mutagenizados de TPO por digestión con EcoRI, se purificaron los fragmentos y se ligaron al vector pAcGP67B-8Arg2. Esta estrategia molecular ofrece una valiosa alternativa para la obtención del cDNA del gen de TPO de difícil obtención por las técnicas habituales, permitiendo generar tanto clones wt como mutantes para el futuro estudio funcional de mutaciones responsables de HC.

633. (495) COMBINACIÓN DE LOS ALELOS ÉPSILON Y -491A/T DEL GEN APOE EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CORONARIA EN ARGENTINA

Bañares, V.^{1,2}; Tavella, M.²; Schreier, L.³
Centro Nacional de Genética Médica, A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" PROPIA - Programa de prevención del Infarto en Argentina -, UNLP - CIC.² Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, FFYB - UBA.³

En el gen APOE el alelo ϵ 4 lo asociamos con niveles elevados de col y riesgo aumentado de enfermedad coronaria aterosclerótica (ECA) en varones mientras que en mujeres jóvenes el alelo APOE-491 T lo asociamos con valores más bajos de colesterol y con un efecto de protección respecto de la ECA. Sería posible que el alelo T enmascare la acción del alelo ϵ 4 en las mujeres jóvenes? Objetivo: observar la distribución de las combinaciones alélicas, presencia / ausencia alelo -491T y presencia / ausencia alelo ϵ 4, en una población con diagnóstico de ECA y su relación con los niveles lipídicos, agrupando por género y edad. Muestra: 380 pacientes, ambos sexos, sometidos a angiografía coronaria como st. de referencia para diagnóstico de EC o para evaluación prequirúrgica valvular, conformándose 2 grupos según la presencia de estenosis: casos n=253 y controles n=127, sin diferencias en edad. Se excluyeron pacientes que recibían hipolipemiantes. Resultados: Entre los casos los valores de colesterol total, LDL y TG fueron significativamente más altos y menores los de HDL. La combinación alélica más desfavorable, fue más común que la favorable, entre los casos mujeres jóvenes, 60% con- ϵ 4/sin-T vs 40% sin- ϵ 4/con-T, y por el contrario entre los controles la más frecuente fue sin- ϵ 4/con-T, 93% vs. 7%, p=0,04. El grupo con- ϵ 4/sin-T mostró los valores lipídicos más altos mientras que las sin- ϵ 4/con-T presentaron los más bajos, colesterol total, 243,7 \pm 52 vs. 207,7 \pm 64; LDL 154,8 \pm 49,4 vs. 123,6 \pm 38,7 y TG, 265,4 \pm 71,0 vs. 138,3 aunque las diferencias no alcanzan la significancia. Entre los varones no se observaron diferencias. Conclusión: estos resultados sugieren que el alelo ϵ 4 podría actuar como un factor de riesgo de ECA también en mujeres, y que el alelo T podría crear alguna confusión si no es considerado, pero es necesario

ampliar estos análisis en muestras más grandes o meta-análisis para arribar a una conclusión definitiva.

634. (533) ESTUDIO MOLECULAR DE HIPOACUSIAS SINDRÓMICAS. MUTACIONES IDENTIFICADAS EN SÍNDROME BRAQUIO-OTO-RENAL (BOR) Y SÍNDROME DE QUERATITIS-ICTIOSIS-SORDERA (KID)

Wernert, F.; Dalamon, V.; Elgoyhen, A.
 INGEBI

La hipoacusia de origen genético tiene una incidencia de 1/2000 nacidos vivos. Aproximadamente el 30% de ellas se presentan asociadas a otros signos clínicos, por lo que se denominan formas "sindrómicas". El objetivo del trabajo realizado en el laboratorio fue estudiar las causas genéticas subyacentes en dos familias con hipoacusia sindrómica. Una familia con sospecha de síndrome de BOR (Braquio-oto-renal) y otra con síndrome de KID (queratitis-ictiosis-sordera). El Síndrome de BOR tiene una incidencia de 1:40.000 y es una de las formas más comunes de hipoacusia sindrómica de herencia autosómica dominante. Incluye pérdida de audición acompañada de malformaciones en el arco braquial y anomalías renales. Tiene penetrancia incompleta y expresividad variable. Se postulan principalmente los genes EYA1 y SIX1 como causa genética subyacente. El síndrome de KID es una rara enfermedad ectodérmica congénita caracterizada por una queratitis vascularizante, lesiones cutáneas hiperqueratósicas y sordera. La hipoacusia es congénita, neurosensorial y profunda. Las manifestaciones cutáneas se desarrollan progresivamente y los pacientes tienen un riesgo mayor de desarrollar células escamosas y carcinoma de lengua. El síndrome de KID se debe a determinadas mutaciones que afectan al dominio N-terminal y al primer bucle extracelular del gen GJB2, que codifica para la conexina 26. Para el caso de la familia con BOR se realizó inicialmente un análisis de segregación de alelos mediante STRs en los loci de los genes SIX1 y EYA1. La segregación fue compatible con el locus EYA1, por lo que se secuenciaron los 16 exones del gen. Se identificó una nueva mutación truncante en el exón 12 del gen, la cual se detectó en todos los miembros afectados de la familia, compatible con una herencia autosómica dominante. En el caso del paciente con KID, se secuenció la región codificante del gen GJB2, detectando una mutación en la región NH2 terminal. La identificación de mutaciones en dos casos de hipoacusia sindrómica, permitió el asesoramiento genético a todos los miembros de la familia, así como modificó el tratamiento médico posterior.

635. (637) DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DE 10 LOCI STR AUTOSÓMICOS EN ROSARIO, STA. FE, ARGENTINA

De La Vega Elena, C.^{1,2}; Landi, C.²; Castro Cossio, M.³; Fornes, C.¹; Raillón, M.¹; Chialina, S.¹; Solis, E.¹
Instituto Universitario Italiano de Rosario IUNIR¹ Laboratorio STEM SRL, Rosario. Argentina.² Alumna del Curso Internacional de Inmunoematología y Transfusión (IUNIR-UNR-ULg)³

Los marcadores genéticos Short Tandem Repeats (STRs) son utilizados principalmente en estudios de identificación de personas y paternidad. Un laboratorio de referencia tal como recomienda la literatura, debe disponer de bases de datos validadas para calcular probabilidades en estos casos. El objetivo del presente trabajo fue establecer una base de datos STRs representativas de la ciudad de Rosario. Para ello fueron genotipificados 170 individuos no relacionados de la ciudad de Rosario, para 10 loci STR (CSF1PO, TPOX, THO1, F13AO1, FESFPS, vWA, D13S317, D7S820, D16S539 y F13B) utilizando un kit comercial Gene-Print® STR system amplification (Promega). A partir de una muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA, se extrajo ADN utilizando el método de salting out. Se usó la técnica de PCR-SSP siguiendo estrictamente los protocolos de amplificación recomendados por el fabricante. Por medio de corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 4% (acrilamida:bis-acrilamida 19:1) seguida por tinción con nitrato de plata se revelaron los productos de las muestras en estudio. Se estimaron las frecuencias alélicas para

los 10 loci STR y se compararon con las frecuencias provistas por el kit comercial para poblaciones caucásicas (Gene-Print® STR system amplification, Promega) y las reportadas anteriormente para la ciudad de Rosario (Tenaglia M. et al, Forensic Science International 2004;141:185–187). Asimismo se calcularon parámetros de interés en paternidad y forense y el ajuste de las frecuencias obtenidas al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). Los resultados permitieron establecer una base de datos de frecuencias alélicas para la población de Rosario. Asimismo se encontró que esta población se encuentra en equilibrio de HW para los 10 loci STR estudiados. No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas estimadas y las reportadas para la población de Rosario con anterioridad. Estas pueden ser usadas para calcular cocientes de probabilidades aplicables a estudios de paternidad e identificación de individuos.

636. (658) CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES DE SPLICING EN EL GEN DE LA PPOX

Granata, B.¹²; Baralle, M.³; Baralle, F.³; Rossetti, M.¹²
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias¹ CONICET² International Center of Genetic Engineering and Biotechnology³

Las porfirias son un grupo de desordenes metabólicos causados por la deficiencia parcial primaria de alguna de las enzimas involucradas en la biosíntesis del grupo hemo. Cuando la enzima afectada es la protoporfirinogeno oxidasa (PPOX), se desarrolla la llamada Porfiria Variegata (PV), enfermedad de herencia autosómica dominante. En 2008 reportamos tres mutaciones nuevas las cuales afectarían el splicing dado que dos de ellas son intrónicas (c.338+3insT y c.808-1 G>C) y la restante (c.807 G>A), a nivel proteico, genera un cambio sinónimo. Los ensayos de RT-PCR realizados a partir de muestras de los pacientes no brindaron resultados concluyentes, por lo cual diseñamos minigenes para estudiar su efecto. La mutación c.808-1 G>C provoca exon skipping, resultado consistente con la interrupción del dinucleótido 100% conservado AG de la unión exón/intrón. En el caso de c.807 G>A, los resultados iniciales fueron complementados con ensayos de rescate de splicing en presencia de U1, encontrándose también skipping, lo cual nos llevó a hipotetizar un efecto de la mutación sobre el sitio de unión a U1. Por último, c.338+3insT fue ensayada en dos minigenes diferentes y uno de ellos en presencia de U1, encontrándose una fuerte banda de skipping del exón, aún cuando en el WT el perfil no es tan claro. De acuerdo a los resultados, las tres mutaciones causan exon skipping, lo cual lleva al mRNA proveniente del alelo portador de la falla del paciente a degradación por el mecanismo de NMD, razón de la manifestación de PV.

637. (660) ANÁLISIS DE MARCADORES AUTOSÓMICOS Y MEZCLA GÉNICA EN LA POBLACIÓN DE ROSARIO, PROV. DE SANTA FE

CARLOS DANIEL ALBERTO DE LA VEGA ELENA¹; Mara Raggio³; F Di Fabio De La Vega Elena, C.¹; Raggio, M.³; Di Fabio Rocca, F.³⁴; Romaldini, M.⁶; Ares, A.³; Avena, S.³⁴⁵; Dejean, C.³⁴; Fornes, C.¹²; Raillón, M.¹²; Chialina, S.¹²; Carnese, F.¹²; Venera, G.¹⁵; Solis, E.¹²
Instituto Universitario Italiano de Rosario IUNIR¹ Servicio de Hematología y Medicina Transfusional, Hospital Italiano Garibaldi² CEBBAD y Fundación Azara, Universidad Maimónides³ Sección Antropología Biológica, FFyL, UBA.⁴ CONICET⁵ Alumnos del IUNIR⁶

Argentina presenta una gran diversidad en los procesos de poblamiento de sus diferentes regiones. El proyecto "Estudio de Polimorfismos de Importancia Clínica y Bioantropológica En La Ciudad De Rosario" tiene como objetivo realizar un análisis demográfico de la ciudad de Rosario y comparar los resultados con otras ciudades de nuestro país, estudiando la variabilidad intra e interregional. Con este marco analizamos una muestra hospitalaria de la ciudad de Rosario, provincia de Santa Fe. Se determinaron las frecuencias alélicas para los sistemas ABO, Rh, Diego, Duffy, Kell, Kidd y las inmunoglobulinas GM. Las muestras fueron tomadas con consentimiento informado, a la fecha

se han estudiado 102 dadores de sangre no emparentados que concurren al Hospital Italiano Garibaldi durante el año 2011. Rosario comparte numerosos aspectos en su dinámica histórico-demográfica con la ciudad de Buenos Aires (masiva inmigración europea entre fines del s. XIX y principios del XX, seguido por un auge industrial que motivó migraciones desde zonas rurales del país y de países limítrofes) por lo que podríamos suponer una estructura genética similar. La estimación de mezcla génica mostró una presencia de la parental europea del 82%, 15% de la amerindia y 3% de la subsahariana. Estos resultados coinciden a los obtenidos para Buenos Aires y Bahía Blanca. Se marca una unidad entre las ciudades de la Pampa Húmeda, diferenciándolas de las ciudades patagónicas (Esquel, Comodoro Rivadavia y Puerto Madryn) y del NOA (Salta), estudiadas previamente por el equipo. Se registró la particularidad de frecuencias sensiblemente mayores de Di*A respecto a Buenos Aires, probablemente debido a un mayor aporte de poblaciones del litoral, donde este alelo tiene una alta prevalencia.

638. (700) CARACTERIZACIÓN DE UNA DELECIÓN INTRÓNICA EN EL GEN DE LA PBGD PARA EL DIAGNÓSTICO PRESINTOMÁTICO EN PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

De La Vega Elena, C.¹; Raggio, M.³; Di Fabio Rocca, F.³⁴; Romaldini, M.⁶; Ares, A.³; Avena, S.³⁴⁵; Dejean, C.³⁴; Fornes, C.¹²; Raillón, M.¹²; Chialina, S.¹²; Carnese, F.¹²; Venera, G.¹⁵; Solis, E.¹²
CIPYP¹ Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA²

Las porfirias son enfermedades metabólicas que surgen como consecuencia de una deficiencia, hereditaria o adquirida, de una de las enzimas del camino biosintético del hemo. En el caso de la Porfiria Aguda Intermitente (PAI), la deficiencia enzimática es debida a mutaciones en el gen que codifica para la Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-D). Presenta una sintomatología neuroabdominal aguda que puede ser inducida por diversos agentes (hormonas, stress, ayuno, etc), por lo que no todos los portadores de la falla genética desencadenan los ataques neurológicos. El objetivo del trabajo es elucidar el probable efecto de la delección de 8 pb en el intrón 6 (267-61 del gaaggggt) de la PBGD, que fue encontrada en un paciente en trans a la mutación G111R, y en sus familiares. Esta delección fue reportada previamente pero no estudiada exhaustivamente, no quedando claro si corresponde o no a una mutación. Se analizaron 100 alelos normales, no encontrándose la delección en ninguno de ellos, descartando la posibilidad que sea un polimorfismo. Los estudios bioinformáticos indicaron que se podría estar afectando un sitio de unión a proteínas hnRNP que interviene en la regulación del splicing. Para llevar a cabo un diagnóstico certero de cuatro familiares asintomáticos de la probando, se debió caracterizar esta delección a fin de conocer su efecto sobre el ARNm y/o la proteína. Se realizaron estudios del ADN codificante en la probando mediante RT-PCR y posterior secuenciación automática, no encontrándose cambios en el ARNm. Se están realizando estudios de expresión génica por PCR real time para elucidar el posible efecto en la regulación del splicing. Por lo tanto podemos afirmar que la delección no provoca la pérdida del exón 7, como fue sugerido por otros autores. La caracterización de la variación de secuencia encontrada es fundamental para asociarla a la patología y así poder llegar a un diagnóstico certero de los portadores de la enfermedad.

639. (721) ASOCIACIÓN ENTRE LA PORFIRIA CUTÁNEA TARDÍA Y LA INFECCIÓN POR VIH: POLIMORFISMOS DEL GEN DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS (MDR1)

Melito, V.¹; Parera, V.¹; Rossetti, M.¹²; Battle, A.¹; Lavandera, J.³; Buzaleh, A.¹²
CIPYP, CONICET, Hospital de Clínicas, UBA¹ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA² Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe³

La Porfiria Cutánea Tardía (PCT), la más frecuente en Argentina (1:25000), se desencadena por distintos factores incluyendo

fármacos y drogas de abuso. En nuestro país el 13% de los PCT son portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La glicoproteína transmembrana P-gp, codificada por el gen de resistencia a multidrogas (MDR1), es un transportador ATP dependiente y se considera relevante en la absorción y eliminación de xenobióticos y antirretrovirales. Esta proteína se expresa en hígado, riñón y tracto gastrointestinal, órganos relacionados con la absorción y eliminación de drogas. Su nivel de expresión y actividad biológica afecta la farmacocinética de las drogas tanto en su eficacia terapéutica como en su toxicidad. El polimorfismo de nucleótido simple (SNP) c.3435C>T presente en el exón 26 afecta la expresión de P-gp. Previamente se estudió la frecuencia de polimorfismos del CYP3A5 y CYP2B6 en individuos PCT y PCT-VIH sin encontrar una asociación significativa. El objetivo fue evaluar la incidencia del polimorfismo del gen MDR1 en la asociación PCT-VIH. La genotipificación del exón 26 se realizó por PCR-RFLP. La frecuencia genotípica en los grupos estudiados fue: control: CC=34,6% (18/52); CT=61,5% (32/52) y TT= 3,9% (2/52); PCT: CC=13,8% (3/26); CT=51,7% (14/26) y TT=34,5% (9/26) y PCT-VIH: CC=11,1% (5/27); CT=55,6% (15/27) y TT=33,3% (9/27). La frecuencia génica del alelo polimórfico fue 0,35 (control); 0,62 (PCT) y 0,54 (PCT-VIH). Se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos PCT ($p<0,001$) y PCT-VIH ($p<0,05$), indicando una mayor prevalencia de la mutación en individuos con PCT. No hubo diferencia significativa entre los grupos PCT y PCT-VIH. Los resultados obtenidos indicarían una posible influencia del SNP c.3435C>T en el desencadenamiento de la PCT independientemente de la infección por VIH.

640. (722) DETECCIÓN DE 4 NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN UROD EN FAMILIAS CON PORFIRIA CUTANEA TARDIA

Medina, N.^{1,3}; Colombo, F.¹; Piñeiro Pauwels, M.¹; Rossetti, M.^{1,2}; Battle, A.¹; Parera, V.¹
CIPYP-Hospital de Clínicas-CONICET / UBA¹ FCEN-UBA² Hospital Ramos Mejía³

La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) se produce por una deficiencia en la Uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) llevando a la acumulación de porfirinas altamente carboxiladas en hígado, plasma y orina. Presenta ampollas en áreas expuestas, fragilidad cutánea e hipertricosis. Existen 2 tipos principales de PCT: tipo I (esporádica o adquirida), la forma más común (70-80%) y tipo II (hereditaria), que se transmite en forma autosómica dominante con baja penetrancia y la actividad enzimática de URO-D está reducida un 50%. Su manifestación se asocia a factores desencadenantes como abuso de alcohol, estrógenos, compuestos polihalogenados y sobrecarga de hierro entre otros. El objetivo fue detectar las mutaciones en UROD en nuevos pacientes. Se estudiaron 5 mujeres y 2 varones (8-46 años). El diagnóstico se basó en la determinación de porfirinas plasmáticas, urinarias y su patrón cromatográfico. Se amplificaron y secuenciaron las regiones codificantes y uniones intrón-exón de los genes UROD y UROS (Uroporfirinógeno Sintetasa) y RT-PCR según corresponda. Se detectaron las siguientes mutaciones nuevas: en P1, p.P158S; en P2, p.A251EfsX7; en P3, p.R332LfsX11 y en P4, IVS 3+1G>T, en el sitio dador de splicing, estudio que se completó con RT-PCR. En P5 y P6 el patrón cromatográfico no se correspondía con el de una PCT, indicando que podría tratarse de una Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE: forma homocigota de la PCT) o de una Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE), producida por mutaciones en el gen UROS. El estudio confirmó una PCT en ambos casos. En P5 se detectó la mutación más frecuente en Argentina: c.10InsA y tanto P6 como P7 presentaron la mutación ya reportada en Argentina, p.M165R. El estudio genético permitió detectar 4 nuevas mutaciones, lograr el diagnóstico diferencial en casos con bioquímica atípica y realizar el diagnóstico presintomático para el asesoramiento familiar a fin de evitar el contacto con los agentes desencadenantes de la porfiria.

641. (792) MICRORNAS DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS: COMPARACIÓN DE SU EXPRESIÓN EN DISTINTOS ESTADIOS DE DESARROLLO DEL PARÁSITO

Prada, L.; Cucher, M.; Macchiaroli, N.; Kamenetzky, L.; Rosenzvit, M.
IMPAM, Facultad de Medicina, UBA

La hidatidosis quística es una enfermedad que afecta la salud pública a nivel mundial, siendo endémica en nuestro país. Su agente etiológico es el parásito cestode *E. granulosus*. Un mayor conocimiento de los mecanismos involucrados en su desarrollo sería de gran importancia médica y sanitaria, ya que podría contribuir a desarrollar nuevas estrategias antihelmínticas, métodos diagnósticos y/o vacunas. En nuestro laboratorio hemos identificado y caracterizado microRNAs (miRNAs) por primera vez en cestodos. Para muchos de ellos hay evidencia del rol fundamental que cumplen en la regulación de procesos biológicos vinculados al desarrollo. El objetivo de este trabajo es profundizar el estudio de los miRNAs mediante la caracterización de sus patrones de expresión en distintos estadios del parásito obtenidos en modelos *in vitro* desarrollados en nuestro laboratorio. Para lograr este objetivo, se han construido dos genotecas de cDNAs de RNAs pequeños, una correspondiente al estadio de protoscolex y la otra a microquiste. Se han obtenido aproximadamente 2000 clones de cada genoteca. Se realizó PCR-colonia, cuyos resultados mostraron que los plásmidos contenían insertos de tamaño compatible al clonado de concatémicos de miRNAs. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la estrategia ha sido exitosa dado que se clonaron miRNAs de ambos estadios. Se han secuenciado y analizado bioinformáticamente insertos que han permitido la identificación de un nuevo miRNA candidato que hemos denominado egr-miR-new31. Además, se han identificado nuevas isoformas de miRNAs conservados y específicos ya descritos, aportando mayor evidencia a la existencia de dichos RNAs. La secuenciación y análisis bioinformático de un mayor número de insertos permitirá comparar la expresión de miRNAs a lo largo del ciclo de vida del parásito lo que proveerá nuevas bases para estudiar su desarrollo.

INMUNOLOGÍA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS 6

642. (311) PARÁMETROS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD HELMINTOCITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS DEL PARÉNQUIMA PULMONAR CONTRA EL ESTADIO MIGRANTE DE TRICHINELLA SPIRALIS

Falduto, G., Gentilini, M., Saracino, M., Calcagno, M., Vila, C., Venturiello, S.
Catedra de Inmunología, FFyB UBA; IDEHU-CONICET

Células del parénquima pulmonar (CPP) de ratas son capaces de atacar al estadio migrante (EM) de *Trichinella spiralis* a través del mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Esta actividad helmintocitotóxica (AH) se ve aumentada cuando las CPP utilizadas provienen de ratas infectadas mostrando un mayor % de mortalidad (M) con el tiempo post-infección (pi). Considerando que el EM atraviesa el pulmón entre los días 6-13pi el objetivo de este trabajo fue evaluar comparativamente parámetros de la AH a estos días. Se analizó la relación entre los %M con la presencia de tipos de poblaciones celulares, título de isotipos de anticuerpos (Acs) y presencia de IgE en la superficie celular. Se realizaron ensayos *in vitro* de CCDA poniendo en contacto EM, CPP de ratas infectadas y Acs anti-EM (sueros días 6 y 13pi). Los controles (ctrl) fueron realizados con CPP y sueros de ratas no infectadas. La presencia de IgE en la superficie celular (IgE⁺) se evaluó por citometría de flujo y la fórmula leucocitaria por coloración de Giemsa. Los resultados indican: I) las CPP-13pi tienen AH en presencia de suero ctrl (%M CPP-ctrl: 7±3, 6pi: 7±2, 13pi: 18±2), II) CPP-6pi con los Acs séricos presentes al día 6pi presentan %M significativamente mayores ($p<0,05$) que en presencia de suero ctrl, III) la AH es dependiente del título de isotipos de Acs presentes, IV) al día 13pi se observa un aumento significativo ($p<0,05$) de la relación del % CPP-IgE⁺ infectadas/ CPP-IgE⁺ ctrl, V) a los días 6 y 13pi se observa un aumento de eosinófilos (6 y 18 veces, respectivamente) y de neutrófilos (>2 veces) en relación a la población ctrl. Los resultados sugieren

que al día de mayor pasaje del EM por pulmón (6pi) se produce un ataque parasitario motivado principalmente por la presencia de células efectoras y el parásito opsonizado con Acs séricos. El aumento de CPP-IgE⁺ podría ser la causa de la mortalidad ejercida al día 13pi en ausencia de Acs anti-EM.

643. (645) PD-L2 ES NECESARIO PARA LA ACTIVACIÓN ALTERNATIVA DE MACRÓFAGOS EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON FASCIOLA HEPÁTICA

Stempin, C., Falcon, C., Aoki, P., Motran, C., Cerban, F., Cervi, L.

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Las infecciones por helmintos inducen un incremento en la molécula co-inhibitoria programmed death ligand-2 (PD-L2) la cual ha sido definida como un marcador de macrófagos alternativamente activados (MAcA) y participa en la inhibición de la proliferación de células T. Sin embargo no se conoce cómo PD-L2 modula la activación de MAcA, los cuales favorecen la fibrosis en infecciones por helmintos, mientras que la activación clásica produce metabolitos tóxicos deletéreos para los mismos. El objetivo de este trabajo fue investigar la participación de PD-L2 en la activación de macrófagos durante la infección experimental con *Fasciola hepatica*. Ratones BALB/c WT y PD-L2 KO fueron inyectados con un homogenato total del parásito (HT), ó infectados por vía oral con 6 metacercarias de *F. hepatica*. En estos animales se determinó el porcentaje de expresión de PD-L2, PD-L1 y PD-1 en células F4/80+ por citometría de flujo, la actividad y expresión de arginasa I y la producción de citoquinas en células adherentes peritoneales (CAP). Los resultados muestran que células F4/80+ de ratones inyectados con HT o infectados con *F. hepatica* presentan una incrementada expresión de PD-L2, PD-L1 y PD-1 en relación a la expresión en células F4/80+ de ratones inyectados con PBS o sin infectar respectivamente. Además, CAP de ratones PD-L2 KO infectados con el parásito, presentan una actividad de arginasa y producción de IL-10, característicos de MAcA, significativamente menores a los detectados en CAP de ratones WT infectados ($p < 0.05$). Del mismo modo, CAP de ratones PD-L2 KO infectados con HT mostraron menor expresión de arginasa I comparado con ratones WT. Estos resultados muestran que a diferencia de lo descrito en infecciones por ciertos protozoarios, la ausencia de PD-L2 disminuye marcadores fundamentales de MAcA como son arginasa e IL-10, sugiriendo que esta vía es crucial en las infecciones por helmintos para una completa polarización de los macrófagos hacia un perfil alternativo.

644. (740) EFECTO PROTECTOR DE LA ADMINISTRACIÓN DE KEFIR EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR GIARDIA INTESTINALIS

Correa Franco, M.¹, Golowcyc, M.¹, De Antoni, G.^{1,2}, Pérez, P.^{1,2}, Serradell, M.², Humen, M.¹

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos¹ Cátedra de Microbiología, Depto de Cs Biológicas, Fac. de Cs Exactas, UNLP²

Giardia intestinalis es un parásito intestinal que puede causar síndrome de malabsorción. El kefir es un producto fermentado probiótico en el cual conviven bacterias y levaduras de distintas especies. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración de kefir sobre un modelo murino de infección por *G. intestinalis*. Se emplearon ratones C57BL/6 de 6-8 semanas, divididos en 4 grupos: C (control), K (kefir), G (infectados), GK (infectados + kefir). Los grupos K y GK recibieron una dilución 1/100 de kefir en agua de bebida durante 14 días. Al día 7, los grupos G y GK fueron infectados por vía i.g. con 4×10^5 trofozoítos de *G. intestinalis*. Los animales fueron sacrificados a los 2 y 7 días post-infección (pi), y se analizaron poblaciones celulares en PP, MLN y bazo por citometría de flujo, células IgA⁺ en LP por inmunohistoquímica, expresión de IL-12, IFN- γ , TNF- α , CCL20 y CXCL10 en tejido intestinal por qPCR, y se llevó a cabo el recuento de trofozoítos en duodeno. Se registró una disminución significativa en la intensidad de infección en el grupo GK respecto

del grupo G a los 7 días pi ($P < 0.05$). El porcentaje de LT CD4⁺ en PP a los 2 días pi aumentó ($P < 0.05$) en el grupo G, mientras que los grupos K y GK mostraron valores similares al grupo C. Por otro lado, solo los animales del grupo K mostraron una disminución del porcentaje de mastocitos en bazo a 2 días pi ($P < 0.05$). No se observaron diferencias en las poblaciones de LT CD8⁺ y células B220⁺MHCII⁺ en PP, MLN y bazo entre los distintos grupos. Sin embargo, se observó un aumento en el número de células IgA⁺ en LP y en la expresión de IL-12 respecto del control sólo en el grupo K a los 2 y 7 días pi ($P < 0.05$). No se observaron modificaciones en la expresión de los otros mediadores analizados. Los resultados obtenidos indican que el kefir ejerce un efecto protector frente a la infección con *G. intestinalis*, el cual podría asociarse a la actividad inmunomoduladora de este probiótico.

645. (767) CÉLULAS DENDRÍTICAS INSTRUYEN UNA RESPUESTA TH2 DURANTE LA INFECCIÓN POR S. MANSONI A TRAVÉS DE MECANISMOS DEPENDIENTES DE GALECTINA-1

Dergan Dylon, L.¹, Ilarregui, J.¹, Rutitzky, L.², Stadecker, M.², Rabinovich, G.¹

Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET¹ Department of Pathology, Tufts University School of Medicine, Boston, MA 02111, USA.²

La equistosomiasis es una enfermedad causada por el parásito *S. mansoni* que afecta a más de 200 millones de individuos en países tropicales y subtropicales. La patología de la infección varía entre la forma aguda inflamatoria (Th1 y Th17) y la forma crónica (Th2), cuyas diferencias no han sido aún claramente dilucidadas. En el presente estudio examinamos el papel de Galectina-1 (Gal-1), proteína con propiedades inmunomoduladoras, como mediadora de la respuesta Th2. Observamos por Western blot (WB), qPCR y ELISA que SEA (antígeno del huevo de *S. mansoni*), induce de manera dosis dependiente un aumento en la expresión y secreción de Gal-1 en células dendríticas (CDs) ($p < 0.05$). El análisis del perfil de citoquinas de CDs estimuladas con SEA de ratones C57BL/6 WT deficientes en el gen de Gal-1 (*Lgals1*^{-/-}) no mostró diferencias entre sí. Por el contrario el perfil de citoquinas de células T naive CD4⁺ (BALB/c) co-cultivadas con CDs estimuladas con SEA, mostró que las CDs de *Lgals1*^{-/-} poseen una menor capacidad de inducir la producción de IL-5 ($p < 0.05$). Además en células T estimuladas con CDs provenientes de ratones *Lgals1*^{-/-}, se observó un aumento en la secreción de IFN- γ ($p < 0.05$) y una disminución en la secreción de IL-10 ($p < 0.05$). En modelos de infección con *S. mansoni* observamos que los ratones WT abundante expresión de Gal-1 en granulomas. Por otro lado células T CD4⁺ obtenidas de ratones WT secretan más IL-5 e IL-10 y menos IFN- γ que ratones *Lgals1*^{-/-} ($p < 0.05$). Además CDs de ratones WT extraídas de bazos de ratones infectados poseen mayor capacidad de generar un aumento de IL-5 ($p < 0.05$). Por otro lado análisis de los ARNm de citoquinas en ganglios linfáticos mesentéricos de ratones infectados muestra para los ratones *Lgals1*^{-/-} un aumento de los mensajeros de IFN- γ ($p < 0.05$). Estos resultados indican que Gal-1 jugaría un papel clave en la respuesta crónica inducida por *S. mansoni* posiblemente instruyendo a CDs a polarizar la respuesta hacia un perfil Th2.

646. (77) COMPORTAMIENTO DE ANTICUERPOS ANTI-P2B Y ANTI-FRA EN UN MODELO MURINO INOCULADO CON DIFERENTES AISLADOS DE TRYPANOSOMA CRUZI

Vicco, M.¹, Ragone, P.², Bontempi, I.¹, Bottasso, O.³, Diosque, P.², Marcipar, I.¹

Laboratorio de Tecnología Inmunológica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL - CONICET¹ Unidad de Epidemiología Molecular, UNSA² Instituto de Inmunología, FCM - UNR³

Uno de los mecanismos propuestos como responsable de desencadenar la enfermedad de Chagas es la autoinmunidad mediada por anticuerpos que se generan por mimetismo molecular contra

el antígeno ribosomal P2B de *T. cruzi*. Estos anticuerpos actúan formando inmunocomplejos con el receptor β 1-adrenérgico. El antígeno flagelar FRA, igual que P2B, es constitutivo del parásito pero no presenta mimetismo molecular con otros antígenos del huésped. En el presente trabajo, nos hemos planteado la hipótesis de que, ante la disminución de la carga parasitaria los anti-FRA libres deberían incrementarse al dejar de formar inmunocomplejos (IC) con el antígeno parasitario, pero los anti anti-p2 β no deberían aumentar en la misma magnitud ya que continuarían formando los IC con los receptores β 1. Se inocularon 2 grupos de 3 ratones de la cepa C57BL/6J con 104 parásitos/ratón (DTU TcI y DTU TcVI respectivamente). Posteriormente, se tomaron muestras de suero a distintos días post-inoculación (dpi): 7, 14, 30, 45, 90 y 120, determinándose la carga parasitaria, y las densidades ópticas de anti-FRA y anti-p2 β mediante ELISA. En nuestro modelo TcI presenta un incremento de la carga parasitaria hacia el dpi 30 con su posterior descenso hasta un nuevo incremento en el día 120; mientras que TcVI presenta el máximo de la carga parasitaria en el dpi 45, descendiendo luego y manteniendo una meseta desde el dpi 90. Respecto a los anticuerpos, en DTU TcVI se observa un incremento de anti-FRA continuo hacia el dpi 120, mientras que DO de anti-p2 β conforma una meseta a partir del día 90, y en TcI presenta una tendencia creciente junto al repique de la carga parasitaria, pero de menor cuantía que anti-FRA. El modelo de TcVI se comporta acorde a la hipótesis planteada, pero TcI no. Este último, no nos permite valorar la hipótesis, debido al incremento de la carga parasitaria en la fase crónica. Acorde a los resultados obtenidos, se prevé el estudio de los inmunocomplejos formados in vivo.

647. (416) MENOR CONTROL DE T.CRUZI EN AUSENCIA DE IL-10 EN UN MODELO DE INFECCIÓN MURINA: CORRELACIÓN CON UNA MENOR EXPANSIÓN Y ACTIVACIÓN DE LTCD8+

Pino Martínez, A., Solana, M., Batalla, E., Novoa, M., González Cappa, S., Alba Soto, C.
Instituto de Microbiología y Parasitología Médica, IMPaM-UBA CONICET

La IL-10 regula la respuesta adaptativa y previene del daño inmune. En humanos, variaciones polimórficas en su expresión condicionarían el curso de la enfermedad. En el modelo de infección con *T. cruzi* en ratones IL-10^{-/-} de background Balb/c, contrario a lo esperado, encontramos que la ausencia de IL-10 disminuye el control de este protozoo. Nos propusimos estudiar la influencia de esta citoquina sobre los mecanismos efectores y el daño en órganos blanco durante la infección. Inicialmente, evaluamos el daño producido en ratones IL-10^{-/-} y controles (WT) observando mayor cantidad de infiltrados en corazón y cuádriceps en ausencia de IL-10. En cuádriceps de ratones IL-10^{-/-} se registraron, desde el día 21 pi, calcificaciones y fibrosis además de nidos de amastigotes de mayor tamaño que en los WT. A su vez, la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales aumentó con la infección en ratones IL-10^{-/-} y WT pero, en ausencia de IL-10, este incremento fue significativamente mayor. Medimos la frecuencia y número absoluto de linfocitos esplénicos por FACS. En bazo de ratones WT se registró un aumento significativo del número absoluto y porcentaje de LTCD8 con la infección. Sin embargo, en ausencia de IL-10, el número absoluto de LTCD8 no se incrementó y el porcentaje de los mismos disminuyó con respecto a otras poblaciones linfocitarias esplénicas. Analizando la funcionalidad de estos LTCD8, los ratones IL-10^{-/-} presentaron una disminución en su potencial citotóxico (expresión de CD107a en superficie) y una menor producción de IFN-gamma que los WT. Dada la importancia de los LTCD8 en la destrucción de células infectadas con *T. cruzi*, la falta de expansión y su menor activación funcional en bazo de ratones IL-10^{-/-} podría relacionarse con el menor control parasitario. Es relevante comprender la relación de la IL-10 con la expansión y activación de LTCD8 para diseñar estrategias de control antiparasitario. Financiaron: CONICET, ANPCYT y UBACYT.

648. (451) LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI POTENCIA LA PRODUCCIÓN DE IL6 Y TNF α Y ALTERA

EL PERFIL LIPÍDICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROESCLEROSIS

Onofrio, L.¹, Arocena, A.¹, Cabalen, M.², Cabral, M.², Cano, R.², Gea, S.¹

CIBICI Conicet. Dpto Bioquímica Clínica UNC¹ Universidad Católica de Córdoba - Fac.de Ciencias Químicas²

Una de las características del síndrome metabólico es la generación de esteatosis hepática asociada a obesidad, insulino-resistencia y enfermedad cardiovascular. En nuestro laboratorio previamente se demostró que una dieta grasa induce este síndrome en ratones C57BL/6 WT. Objetivo: investigar si la infección con *T. cruzi* combinado con una dieta rica en lípidos es capaz de favorecer el acumulo de grasa ectópica y analizar la relevancia de TLR2/4 en este proceso. Ratones machos WT y TLR4KO se dividieron en grupos: B, basal dieta estándar (3% grasas); D, dieta (13% grasas); ID, Infectado + Dieta (100 tripomastigotes, cepa Tulahuén) e I (infectado). Se evaluó la sobrevida y el peso corporal; los triglicéridos (TG), colesterol (CT), MCP1, IL6, TNF α y las transaminasas (TS) en plasma. Se analizó la arquitectura de hígado y aorta por histología (H-E) y tinción de lípidos, y se estudió la expresión de TLR2 en ambos tejidos. Se observó un aumento significativo en el peso corporal de D WT vs B (p<0.001) y vs D TLR4KO (p<0.05) a 6 meses (m). Al mismo tiempo, se detectó una hipertrofia de adipocitos en la adventicia de aorta de D WT. En hígado se detectaron micro/macrovesículas lipídicas y focos inflamatorios compatibles con esteatohepatitis. Se observó un incremento de las TS en todos los grupos, más marcado en ID a 1m (p<0.001). En tejido hepático se observó un incremento en la expresión de TLR2 vs. B, más evidente en ID. En aorta se observó un incremento de TLR2 a 1 y 6m de D TLR4KO mientras que TLR2 disminuyó en ID de ambas cepas. Altos niveles de MCP1, IL6 y TNF α se observaron a 6m en todos los grupos (IL6 en ID WT p<0.05). El perfil lipídico fue similar en ambas cepas, siendo CT mayor en ID vs B (p<0.0001). Los TG estuvieron elevados solo en ID TLR4KO (p<0.001). Conclusión: La infección con *T. cruzi* exacerbaría el proceso de aterosclerosis involucrando a TLR2/4, citocinas inflamatorias y alterando el perfil lipídico.

649. 472) LA AUSENCIA DE LINFOCITOS B EN RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI SE ASOCIA CON CAMBIOS EN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS QUE CONDICIONARÍAN LA EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN

Gorosito Serran, M., Bermejo, D., Tosello Boari, J., Rameallo, C., Amezcua Vesely, M., Fiocca Vernengo, F., Montes, C., Acosta Rodríguez, E., Gruppi, A.

Facultad de Ciencias Químicas - UNC - CIBICI - CONICET

Durante la infección con *T. cruzi*, ratones C129.BL6uMT deficientes en linfocitos (Li) B maduros cursan con mayor parasitemia que los controles C57BL/6 (WT) y sucumben a partir del día 22 post infección (pi). Para determinar las causas de la mayor susceptibilidad, ratones uMT y controles WT fueron infectados intraperitonealmente con 10000 tripomastigotes cepa Y. Ambas cepas de ratones presentan un pico de IFN γ sérico al día 8pi que es significativamente mayor en uMT (p<0.01). Similar comportamiento muestran las transaminasas hepáticas en suero, cuyo mayor nivel en ratones uMT (GOT: p<0.05; GPT: p<0.001) se correlaciona con mayor necrosis e infiltración hepática y mayor número de nidos de amastigotes. Además, ratones uMT infectados presentan menores niveles de Hemoglobina que los WT (d14pi: p<0.001; d18pi: p<0.01) y menores niveles séricos de Glucosa (p<0.05). Los niveles séricos de TNF están incrementados en ambas cepas en el día 8pi y hacia los días 16 y 20pi disminuyen en los ratones WT y aumentan en los uMT (d16pi: p<0.001; d20pi: p<0.001). No hay diferencias entre uMT y WT en las concentraciones séricas de IL6, IL10 e IL12 mientras que IL17 fue indetectable. Por citometría de flujo observamos que ratones uMT infectados presentan un mayor % de células CD4⁻ y CD4⁺ productoras de TNF en el día 8pi. Con la progresión de la infección se produce un infiltrado creciente de células CD11b^{hi} Ly6G⁺ que al día 20pi es mayor en los uMT (p<0.01) y que producen TNF pero no IL10 ni IL17. Además, ratones uMT presentaron

mayor % de LiCD8+ productores de IFN γ en el día 10pi ($p < 0.01$) mientras que el % de LiT CD4+ y células no T productores de IFN γ fueron similares en uMT y WT. Nuestros resultados sugieren que la ausencia de LiB en ratones infectados con *T. cruzi* conduce a un desbalance de células y citoquinas pro-inflamatorias induciendo un gran daño hepático que afecta la homeostasis del hospedador y el control de la infección.

650. (476) REPERCUSIONES EN LAS RESPUESTAS METABÓLICAS E INFLAMATORIAS FRENTE A LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI EN UN MODELO EXPERIMENTAL NO GENÉTICO DE OBESIDAD IN VIVO

Cabalen, M.¹, Onofrio, L.^{1,2}, Andrada, M.¹, Arocena, A.², Gea, S.², Cano, R.^{1,2}

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba' CIBICI Conicet. Dpto Bioquímica Clínica UNC²

La obesidad y la enfermedad de Chagas predisponen a enfermedad cardiovascular. El tejido adiposo posee funciones en la homeostasis metabólica y la respuesta inmune innata. Desarrollamos un modelo de obesidad con el fin de estudiar las alteraciones metabólicas e inflamatorias gatilladas por el *T. cruzi*. Se administró a ratones C57BL/6 dieta grasa+fructosa+ estreptozotocina 8 mg/Kg (STZ), en dosis no diabotogénica (Dieta, D). Además, se trabajó con grupos: Basal (B), dieta estándar; Dieta + Infección (D+I) e Infección (I), 500 parásitos, hasta 3 meses (m). Se evaluaron: peso corporal (PC), glucosa, insulina, colesterol (CT), triglicéridos (TG), transaminasas (TS), citocinas y proteinograma. Se obtuvo hígado y corazón para histología e inmunofluorescencia (TLR2). El PC fue significativamente mayor en D vs B y en D+I fue menor que en D (media 29,3 D+I vs 31,6 g D) a 3m. Estos PC se correlacionaron con obesidad visceral. La parasitemia fue subpatente hasta 1m. En D, se demostró insulino-resistencia (HOMA-IR), 6 y 19 veces mayor vs B, a 1 y 3m, asociada con dislipemia. A 2m, el CT medio fue 73 y 130 mg.dl⁻¹, $p < 0.005$ en B y D. Los TG aumentaron más del doble en D vs B, $p < 0.004$. En D+I, no hubo cambios significativos de CT y TG. En I, la glucosa aumentó vs B, $p < 0.001$. Globulinas $\alpha 1$ y 2 se elevaron en D e I con sinergismo en D+I. IL-6 y TNF α no variaron entre grupos, excepto TNF α que aumentó a 1m en I. En hígado y corazón de D y D+I se observó depósito de grasa ectópica e infiltrado inmune, siendo la esteatohepatitis y cardiomiopatía más marcada en D+I, sin cambios en TS. TLR2 fue mayor en ambos tejidos. Conclusión: este modelo favorece el desarrollo de obesidad visceral, IR y dislipemia compatible con síndrome metabólico en ratones D y la infección con *T. cruzi* lleva a menor aumento de PC y de obesidad visceral, pero las proteínas de fase aguda y expresión de TLR2, sugieren un proceso inflamatorio más potente en D+I.

651. (613) INTERLEUQUINA-6 Y EL RECEPTOR TIPO TOLL-2 PARTICIPAN EN EL RECLUTAMIENTO DE MACRÓFAGOS Y LINFOCITOS T EN TEJIDO CARDÍACO DURANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI

Ponce, N., Gea, S., Aoki, M.

CIBICI-CONICET, Fac. Ciencias Químicas, UNC, Córdoba, Argentina

La infección con el parásito cardiotrópico *Trypanosoma cruzi* genera la principal cardiomiopatía infecciosa a nivel mundial. El influjo de leucocitos al miocardio infectado sería determinante de los mecanismos de defensa/patogénesis y reparación. Recientemente demostramos en miocardio de ratones BALB/c un claro predominio de macrófagos (M ϕ) con fenotipo pro-inflamatorio M1 a 4 días post-infección (dpi) que cambia posteriormente (7, 14, 21 y 23 dpi) hacia un fenotipo anti-inflamatorio/de reparación M2, coincidente con la expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2. Objetivo: Estudiar el papel de TLR2 e IL6 en el reclutamiento de leucocitos cardíacos durante la infección con *T. cruzi* (ip Tulahuén) por citometría de flujo. Se investigó a 21dpi la presencia de linfocitos T (CD3+), M ϕ M1 (F4/80+CD68+) y M ϕ M2 (F4/80+CD206+)

infiltrantes de miocardio en ratones B6 (WT) y deficientes en TLR2 ó en IL6 (base genética B6). El número absoluto y porcentaje de leucocitos totales, M ϕ y linfocitos T en corazón de B6 no presentaron diferencias significativas respecto de BALB/c. Sin embargo, un aumento significativo de M ϕ M2 se observó en miocardios TLR2KO vs WT ($47 \pm 4\%$ vs $23 \pm 5\%$, $p < 0.001$), concordante con el mayor incremento de la expresión de Arginasa-1 detectado por qRT-PCR. Además, una marcada disminución de leucocitos totales y de cada población analizada se observó en miocardio de IL6KO vs WT (LT: $8 \pm 3\%$ vs $35 \pm 13\%$, $p < 0.01$; M2: $12 \pm 3\%$ vs $23 \pm 5\%$, $p < 0.01$). Sólo el 40% de los ratones IL6KO sobrevivieron en contraste con la supervivencia del 100% de los TLR2KO y WT a los 21dpi. Conclusión: Existe un predominio del fenotipo M2 en miocardio de los diferentes grupos lo que sugiere la importancia que tendrían los mecanismos de reparación cardíaca durante la infección independientemente de la cepa de ratón, IL6 ó TLR2. Además, la citoquina IL6 sería clave para la sobrevida del hospedador y el reclutamiento leucocitario en tejido cardíaco durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*.

652. (624) PAPEL DE IL-17RA EN EL DESARROLLO DE UNA RESPUESTA CITOTÓXICA ESPECÍFICA DURANTE LA INFECCIÓN TRYPANOSOMA CRUZI

Tosello Boari, J., Ramello, M., Gorosito Serrán, M., Fiocca Vernengo, F., Montes, C., Gruppi, A., Acosta Rodríguez, E. Facultad de Ciencias Químicas - CIBICI CONICET

Previamente demostramos que IL-17RA es necesario para la resistencia a la infección con *T. cruzi* al regular una inflamación exacerbada a través del reclutamiento de neutrófilos productores de IL-10. Datos preliminares indican que IL-17RA también regularía la respuesta adaptativa durante esta infección. Nuestro objetivo es determinar el rol de IL-17RA en el desarrollo de una respuesta citotóxica específica para *T. cruzi* comparando ratones salvajes (WT) y deficientes en IL-17RA (KO). Análisis de citometría de flujo mostraron que ratones KO infectados con las cepas Tulahuén e Y presentaron, a diferentes días post infección (dpi, $p < 0.05$), un menor porcentaje (%) de LiT CD8 que reconocen un péptido de la enzima transilidasada (TSKB20) o de la proteína ASP-2 (PA8), respectivamente. Además, un menor % de los LiT CD8 de estos ratones expresaron CD107a (marcador de degranulación) e IFN γ en respuesta a TSKB20 y PA8. Concordantemente, durante la etapa aguda de la infección, la citotoxicidad in vivo e in vitro frente a células blanco cargadas con el péptido TSKB20 (Tulahuén, día 20 pi, $p = 0.021$) o PA8 (Y, día 28 pi, $p = 0.03$) fue menor en ratones KO infectados y esto se correlacionó con un mayor nivel de parasitismo tisular cuantificado en bazo ($p = 0.0005$) e hígado ($p = 0.0002$) por PCR. En la etapa crónica de la infección (130 dpi), no se detectaron LiT CD8 específicos en ratones WT infectados demostrando una importante contracción de la respuesta citotóxica que se correlacionó con una marcada disminución del parasitismo tisular. En contraste, LiT CD8 específicos fueron detectados, aunque en menor % que en la etapa aguda, en ratones KO infectados indicando una menor contracción de la respuesta citotóxica probablemente como consecuencia de la mayor persistencia parasitaria en tejidos. Nuestros resultados muestran que durante la infección con *T. cruzi*, IL-17RA es requerido para la inducción de una respuesta citotóxica robusta que permita un eficiente control del parasitismo tisular.

653. (629) LA EXPRESIÓN TRANSIENTE DE LA E3 UBIQUITINA LIGASA GRAIL CONTRIBUYE A LA HIPORESPUESTA DE CÉLULAS T OBSERVADA DURANTE LA ETAPA AGUDA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI

Stempin, C., Baigorri, E., Cerban, F.

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

La ubiquitinación de proteínas mediada por E3 Ubiquitina Ligasas (E3-Ubi-Lig) es una señal indispensable que regula la tolerancia hacia antígenos propios, controlando la abundancia o localización de mediadores de señalización, restringiendo la ac-

tivación y proliferación de la célula T. Sin embargo, la activación de estos mecanismos ha mostrado ser perjudicial durante el curso de infecciones crónicas. Una de las E3-Ubi-Lig involucrada en hiporespuesta de células T durante infecciones es Gene Related to Anergy in Lymphocytes (GRAIL). Dado que en la enfermedad de Chagas se observa una disfunción en las células T, investigamos la participación de la E3-Ubi-Lig GRAIL en la infección experimental con *T. cruzi*. Para ello, ratones BALB/c se infectaron i.p. con 500 tripomastigotes. A distintos días post infección (15, 21, 28, 36 d.p.i) se prepararon suspensiones de células mononucleares de bazo (CMB). Se evaluó por citometría de flujo el número de células CD3+ y la respuesta proliferativa, a través de la marcación con CFSE, en respuesta a anti-CD3, anti-CD3 más anti-CD28 y PMA más Ionomicina. Además se midió en estas células la expresión de GRAIL por Western blot y por PCR en tiempo real. En cada ensayo se incluyeron CMB de animales controles no infectados. Las CMB de animales controles proliferaron frente a los estímulos utilizados, sin embargo en las CMB de animales infectados se observa menor respuesta proliferativa en respuesta a los estímulos a los 15 y 21 d.p.i. La respuesta proliferativa se recupera entre los 28 y 36 d.p.i. La expresión de GRAIL por Western blot se detectó a los 15 y 21 d.p.i mientras que no se observó expresión a tiempos más tardíos. Cuando se evaluó por PCR en tiempo real mostró un aumento significativo a los 15 d.p.i ($p < 0.01$) y 21 d.p.i ($p < 0.05$). Por lo tanto, la expresión de E3-Ubi-Lig durante la infección por *T. cruzi* podría contribuir con otros mecanismos ya descritos, para favorecer la inmunosupresión observada en la enfermedad de Chagas.

- 654. (636) CLONADO, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA INICIAL DE LA PROLIL OLIGOPEPTIDASA DE 80 KDA DE TRYPANOSOMA CRUZI (TC80)**
Bivona, A.^{1,2}, Sánchez Alberti, A.^{1,2}, Matos, M.^{1,2}, Malchiodi, E.^{1,2}, Cazorla, S.^{2,1}
IDEHU - CONICET. FFyB UBA¹ IMPAM, UBA-CONICET, Fmed. UBA²

Tc80 es una proteína de secreción de *T. cruzi* expresada principalmente en los estadios de amastigote y tripomastigote. Es una serin proteasa con actividad de prolil oligopeptidasa que degrada componentes de la matriz extracelular como fibronectina, colágeno tipo I y IV, por lo que estaría implicada en la invasión tisular del parásito. Por ello nos propusimos clonar Tc80, expresarla y caracterizarla inmunológicamente para evaluar su utilización en vacunas profilácticas y/o terapéuticas contra *T. cruzi*. Amplificamos la secuencia codificante por PCR a partir del ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa RA. El amplicón de 2152 pb fue digerido con enzimas de restricción para su ligación al plásmido pET23a+. El inserto obtenido mostró más de un 99% de identidad con la secuencia esperada (GenBank: AF452421.1). Se expresó Tc80 en forma soluble en células BL21 y se purificó por IMAC con Ni-NTA agarosa. El correcto plegamiento de Tc80 se demostró al observar actividad catalítica frente al sustrato específico Z-Gly-Pro-AMC. Por inmunización con Tc80 se obtuvieron sueros de ratones anti-Tc80 que mostraron por inmunofluorescencia reconocer epis y tripomastigotes de *T. cruzi*. La incubación previa de tripomastigotes transgénicos Tul-beta gal con estos Ac disminuyó su invasión a células Vero. Observamos además, que macrófagos J774 cultivados en presencia de Tc80 presentaban niveles elevados de NO comparados con los controles tratados con PBS (23.1±4.3 µM y 1.0±0.9 µM respectivamente). Por último, inmunizamos ratones C3H los días 0 y 15, con Tc80 y ODN-CpG por vía subcutánea (Sc) o intramuscular (Im). Observamos un elevado título de Ac anti-TC80: Sc (4300), Im (3300), respecto al control inmunizado con PBS (18). Ambos grupos inmunizados presentaron respuestas de DTH en la almohadilla plantar que fueron significativas respecto al control. Actualmente se están realizando los desafíos parasitarios para analizar la capacidad inmunoprotectiva de Tc80.

- 655. (678) EVALUACIÓN DE NUEVOS CANDIDATOS VACUNALES PARA LA INMUNOPROFILAXIS DE LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI**

Bontempi, I.¹, Fleitas, P.¹, Vicco, M.¹, Arias, D.², Guerrero, S.², Marcipar, I.¹
Laboratorio de Tecnología Inmunológica, FBCB, UNL¹
Laboratorio de Bioquímica Microbiana, FBCB, UNL²

En la última década se han obtenido evidencias de los beneficios que podría presentar la inmunoprofilaxis para el control de la enfermedad de Chagas. En ese sentido, numerosos trabajos han mostrados que, en modelo murino de infección con *Trypanosoma cruzi*, formulaciones de distintos antígenos del parásito previamente administrado permiten altos niveles de sobrevida mediada por una respuesta citotóxica TCD8+. Además la infección por *T. cruzi* genera una cinética de respuesta inmune lenta que podría ser mejorada mediante la inmunoprofilaxis. El objetivo de este proyecto fue evaluar, en un modelo murino de infección, nuevos candidatos vacunales de *T. cruzi* correspondiente a: las proteínas repetitivas FRA2, B13, Tc3 y Tc6, altamente conservadas en la especie y las proteínas TXN y CPX, involucradas en vías metabólicas redox. Se inocularon, en grupos de 9 ratones BALB/c, 3 dosis intraperitoneales de cada proteína, empleando adyuvante de Freund. Quince días luego de la última inmunización, los ratones fueron desafiados con parásitos de la cepa Tulahuen cl2. Se evaluaron durante 2 meses la parasitemia, mortalidad y respuesta de anticuerpos específicos IgG totales, IgG1 e IgG2a. El antígeno Tc3 fue el único evaluado que permitió un mayor porcentaje de sobrevida frente al desafío, aunque este no llegó a ser significativo ($P > 0,0902$ vs control y otros grupos, Mantel-Cox). La inoculación con los antígenos Fra2, Tc6, TXN, CPX y Tc3 generó altos niveles de anticuerpos específicos previo al desafío ($P > 0,05$ vs preimmune; Mann-Whitney) y la relación IgG2a/IgG1 fue superior a 1 únicamente con la proteína Tc3 ($P < 0,001$, Kruskal-Wallis). La proteína B13 no indujo respuesta específica para ninguno de los subtipos de IgG. Para confirmar la utilidad de Tc3 cuando se formula con un adyuvante de uso humano, actualmente se está evaluado a este inmunógeno con el inmunopotenciador ISCOMATRIX

- 656. (731) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ALOPURINOL DURANTE LA ETAPA CRÓNICA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR TRYPANOSOMA CRUZI**
Novoa, M., Pino-Martínez, A., Batalla, E., Alba-Soto, C., González-Cappa, S., Solana, M.
Instituto de Microbiología y Parasitología Médica, IMPaM-UBA CONICET

Actualmente las drogas usadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas presentan variados efectos adversos, por lo que el hallazgo de nuevas alternativas terapéuticas resulta prioritario. El *T. cruzi* es incapaz de sintetizar purinas *de novo* y deben tomarlas del medio externo. Por ello, la hypoxantina-guanin fosforibosil transferasa (HGPRT) resulta una enzima blanco clave. El alopurinol (ALO) (4-hidroxy-pyrazol- (3,4d)-pyrimidina) es un análogo de purinas que es incorporado por la HGPRT parasitaria en su DNA, afectando la síntesis de RNA y proteínas. La efectividad del tratamiento parasiticida resulta de la acción sinérgica del fármaco y de la respuesta inmune antiparasitaria. Nos proponemos estudiar el efecto del tratamiento con Alo en ratones infectados crónicos. Para ello se inocularon ratones Balb-c con 5 X10⁴ tripomastigotes (clon K98) por vía intradermoimplantar. A los 60 días postinfección se inició el tratamiento con Alo a razón de 10mg/kg diarios durante 2 meses por vía intraesofágica. No se observó parasitemia patente en ninguno de los grupos estudiados al finalizar el tratamiento. Se registró la evolución del peso a lo largo del mismo, observándose una ganancia de peso similar en todos los grupos experimentales. Además, se analizó el porcentaje de LT CD4+, CD8+ y LB así como los marcadores de activación CD69+ y CD62L. No se registraron cambios en el perfil fenotípico linfocitario por efecto del tratamiento aunque el número absoluto de linfocitos resultó menor ($p < 0.05$). La frecuencia de LTCD8+ de activación reciente (CD69+) no se modificó por efecto del tratamiento. Sin embargo, los animales infectados tratados con ALO mostraron una tendencia al aumento de LT CD8+ efectores (CD62L^{low}) ($p = 0.05$) que fue corroborada al considerar el recuento celular absoluto ($p < 0.05$). Concluimos que la efectividad terapéutica de una droga se basa

en su capacidad parasitocida y en el impacto que ejerce sobre la respuesta inmune del huésped.

657. (753) DISTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES CODIFICANTES DEL FACTOR DE VIRULENCIA TRANS-SIALIDASA EN LOS DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS DE TRYPANOSMA CRUZI

Burgos, J.¹, Rizzo, M.², Scaraffia, A.², Brenière, F.³, Barnabé, C.³, Pascuale, C.², Campetella, O.¹, Leguizamón, M.²
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas IIB-UNSAM INTECH-CONICET¹ IMPAM-Facultad de Medicina, UBA² Unité de recherche MIVEGEC, Equipe INCHA, Représentation de l'IRD en Bolivie³

En *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, se reconocen seis grupos genéticos o "discrete typing unit (DTU)", TcI a TcVI que aún no han sido claramente relacionados a las características biológicas de las cepas. La trans-sialidasa enzimáticamente activa (Tsa) es un factor de virulencia involucrado en patogénesis, expresado diferencialmente entre cepas de baja y alta virulencia. Debido a un SNP (T/C) en los genes codificantes, existen isoformas inactivas (TSi) que retienen características tipo lectina. Nos propusimos analizar la relación de los genes codificantes para TS en los distintos DTUs y su asociación con la virulencia. Cuantificamos por qPCR los genes codificantes para Tsa y TSi en cepas de alta y baja virulencia y alta/baja expresión de Tsa, respectivamente. Las cepas (n = 4) que generaron infecciones letales, pertenecientes a las DTU TcII y TcVI, contenían genes codificantes para TSi y Tsa, aunque en diferentes proporciones, mientras que las 4 cepas que inducían cronicidad (baja virulencia), pertenecientes a la DTU TcI, carecieron de TSi. Luego se secuenciaron fragmentos que flanquean el SNP en 38 aislamientos obtenidos de diferentes países del área endémica. Según la presencia en el SNP del nucleótido T o de la ambigüedad (T/C) se pudo predecir la presencia de ambas isoformas de TS en las DTUs TcII, TcV y TcVI, mientras que las DTUs TcI, TcIII y TcIV carecen de TSi. Estos resultados sugieren la presencia de dos grupos evolutivamente diferenciados y son compatibles con la historia evolutiva de *T. cruzi* actualmente aceptada. Estas observaciones además plantean una relación directa entre la presencia de TSi y la virulencia que podría hacerse extensiva a otras propiedades biológicas. Por primera vez, identificamos una distribución diferencial de los genes codificantes para un factor de virulencia entre las DTUs de *T. cruzi*. Financiado por ANPCyT/NIH.

658. (770) EFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO CON GLUCOCORTICOIDES E IL-2 SOBRE LA POBLACIÓN T REGULADORA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN POR T. CRUZI

Fernández Bussy, R.¹, Martín, G.³, Pilon, C.³, Villar S.¹, González, F.¹, Manarín, R.¹, Bottasso, O.¹, Cohen J.³, Piaggio, E.², Pérez, A.¹
Instituto de Inmunología, Facultad de Cs Médicas, UNR¹ Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (INSERM), París, Francia² Pôle Recherche Clinique Santé, Publique Hôpital Henri Mondor (INSERM), Créteil, Francia³

Previamente observamos que la infección aguda experimental causada por *T. cruzi* (Tc) cursa con una alta mortalidad y un extenso daño tisular. Esto se asocia a una disminución periférica en la proporción de células T reguladoras (Treg) a expensas de un incremento en la proporción de T efectoras (Tef). Dado que la biodisponibilidad de IL-2 es crucial para el desarrollo de las Treg y asimismo, se ha reportado que el glucocorticoide sintético dexametasona (Dex) suprime la activación de las Tef e incrementa la proporción de Treg, nos propusimos evaluar si Dex podría utilizarse junto a IL-2 a fin de amplificar la expansión selectiva de las Treg y aumentar la relación Treg/Tef a fin de disminuir la gravedad de la fase aguda durante la infección por Tc en ratones C57BL/6 (n=3-5/grupo/día). En este estudio observamos que luego del tratamiento combinado con Dex (14ug/día) e IL-2 (50.000 UI/día) durante 7 días consecutivos en forma previa a la infección,

la población de Treg se expandió significativamente en la sangre (Sg), bazo y ganglios linfoides subcutáneos (GL) de animales no infectados [mediana±rango (%); Sg: 7días post-tratamiento, Co=6,8(8-6), Dex+IL-2=14,3(14,5-14,1) p<0,05] mientras que en los animales Tc el tratamiento restauró parcialmente la proporción de Treg y mejoró la relación Treg/Tef [GL= 14 días post-tratamiento, Tc vs Tc+Dex+IL-2 p<0,05 en ambos casos] sin modificar la parasitemia. La expresión de CD62L (marcador de activación de Treg) aumentó en los animales Tc respecto de los no infectados, independientemente del tratamiento recibido. La administración simultánea de Dex+IL-2 optimizó el nivel de Treg, sin modificar la carga parasitaria. Se pretende evaluar los efectos a largo plazo del tratamiento combinado Dex+IL-2 sobre la supervivencia y la miocarditis en los animales infectados.

659. (779) ACTIVIDAD DE TC52 Y CRUZIPAÍNA SOBRE RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES (RRPS); Y DE TC52 Y SUS DOMINIOS EN CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (CPA)

Matos, M.^{1,2,3}, Cazorla, S.^{1,2}, Ebensen, T.³, Cabrera, A.³, Guzman, C.³, Malchiodi, E.^{1,2}
IDEHU-Inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA¹ Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM, UBA-CONICET). Fmed. UBA² Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH. Braunschweig. Alemania³

Tc52 es una proteína de *T. cruzi* con actividad glutatión transferasa, que posee dos dominios con alta homología. Cruzipaína (Cz) es una proteasa de *T. cruzi* involucrada en la invasión celular que posee dos dominios diferenciados. Estudiamos la capacidad de unión de las recombinantes Tc52, Cz y sus dominios sobre diferentes PPRs, utilizando células HEK-blue (Invivogen). Todas ellas fueron capaces de unirse a TLR2, activando la expresión del gen reportero. Tc52 y sus dominios unieron TLR9, no así Cz ni sus dominios. Además, Tc52 y C-term unieron TLR8, pero no N-term ni Cz y sus dominios. Ninguna de las proteínas ensayadas unió NOD1, NOD2, TLR5 ni TLR3. Estudiamos la actividad de Tc52 y sus dominios sobre células dendríticas (CD) extraídas de médula ósea de ratones. Las CD fueron coincubadas con ovalbúmina (OVA) y Tc52 o sus dominios y evaluamos su capacidad de procesar y presentar péptidos de OVA y activar la proliferación de linfocitos T obtenidos de ganglios linfáticos de ratones C57/BL6 OTI y OTII, que poseen células T CD8+ y CD4+ específicas para OVA, respectivamente. Observamos mayor índice de proliferación en linfocitos estimulados con CD pretratadas con OVA+Tc52 o sus dominios, respecto a los estimulados con CD pretratadas únicamente con OVA. El efecto fue mayor con Tc52 entera respecto a cada uno de sus dominios, sin diferencias significativas entre ellos. Macrófagos de la línea Raw264.7, incubados con Tc52 y sus dominios produjeron niveles de nitritos bajos pero apreciables y significativamente diferentes de los controles (p<0.05), que no se modificaron al agregar Polimixina B a las proteínas. Estos resultados sugieren que en la infección por *T. cruzi*, Cz induciría en las células la transducción de señales a través de TLR2, mientras Tc52 lo haría a través de TLR2, TLR9 y TLR8. Además, Tc52 es capaz de activar CPA promoviendo la presentación antigénica en CD y la activación de células T; y la producción de óxido nítrico en macrófagos.

660. (794) VIAS INTRA-ADRENALES INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS DE GLUCOCORTICOIDES EN AUSENCIA DE FNT-R1 EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI

Villar, S.¹, Ronco, T.², Roggero, E.¹, Fernández Bussy, R.¹, Lepletier, A.³, Ferri, A.⁴, Savino, W.³, Manarín, R.¹, Prez, A.¹, Bottasso, O.¹
Instituto de Inmunología, Facultad de Cs Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹ IFISE, Fac de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario² Department of Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brasil³ Dpto Química Analítica, Fac de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario⁴

Durante la infección por *T. cruzi* hay una intensa estimulación del eje HPA, que se incrementa significativamente en animales deficientes en el receptor FNT-R1 (KO). A fin de evaluar qué vías podrían estar implicadas en el aumento de glucocorticoides (GC) en ausencia de FNT-R1 durante el proceso infeccioso, analizamos en glándulas adrenales el grado de activación de las vías de MAPKs y NF- κ B y la expresión de enzimas de síntesis de GC. Se trabajó con ratones C57BL/6 wild type y KO. Los animales se infectaron con *T. cruzi* (Tc) o se inocularon con solución fisiológica (Co). Al día 17 post-infección (n=6/grupo) se observó un significativo aumento de la masa de tejido adrenal en KO-Tc respecto de los Tc (p<0.05) que se condice con el mayor incremento sistémico de GC y un aumento paradójico en los niveles de FNT- α . El grupo Tc presentó mayor actividad de NF- κ B que el grupo KO-Tc en fracciones nucleares de tejido adrenal [% de actividad= Co:0.079 \pm 0.003; Tc:0.160 \pm 0.002; KO-Co:0.090 \pm 0.010; KO-Tc:0.110 \pm 0.021**]. En ambos grupos infectados el grado de activación de MAPKs estuvo aumentado [W. blot de lisados de glándula adrenal, % ; ej: p38-P= Co:100 \pm 7; Tc:136 \pm 4*; KO-Co:100 \pm 47; KO-Tc:292 \pm 63⁸***]. La expresión de las enzimas de síntesis de GC estuvo incrementada durante el proceso infeccioso, siendo mayor el aumento en los animales KO-Tc que en los Tc [Real Time RT-PCR, Δ Ct; ej: StAR= Co:346 \pm 118; Tc:2740 \pm 195*; KO-Co:806 \pm 45; KO-Tc:11656 \pm 4445⁸***]. Los datos se informan como media \pm ESM, Referencias: *p<0.05 vs Co, **p<0.05 vs Tc, ⁸p<0.05 vs KO-Co. El significativo incremento de GC en ausencia de FNT-R1 se asoció a un aumento en la activación de la vía de las MAPKs y de la expresión de las enzimas involucradas en su síntesis, en ausencia de activación de NF- κ B. Estos datos sugieren que otros factores de transcripción estarían involucrados en la liberación de GC durante la infección chagásica.

661. (801) TRYPANOSOMA CRUZI INDUCE LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN UNA LÍNEA CELULAR DE MACRÓFAGOS MURINOS

Paroli, A., Arocena, A., Onofrio, L., Ponce, N., Crespo, P., Cano, R., Gea, S.
CIBICI - CONICET - FCQ - UNC

Los macrófagos son células de la inmunidad innata capaces de detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y señales de peligro endógenas (DAMPs) mediante diversos receptores. Además, juegan un papel crucial en la aterogénesis y son capaces de secretar citocinas proinflamatorias. La liberación de IL-1 β requiere la activación de caspasa-1 por complejos multiproteicos citosólicos: los inflamasomas, de los cuales el NLRP3 ha sido el más estudiado. Previamente, demostramos una inducción de los transcritos de NLRP3 y ASC en hígado y corazón junto con la síntesis de IL-1 β por leucocitos hepáticos en un modelo de infección aguda con *Trypanosoma cruzi* (Tulahuén). Objetivo: Investigar la inducción de NLRP3 por inmunofluorescencia en un modelo de infección *in vitro* con *T. cruzi* y en presencia de cristales de colesterol (CC). Se empleó la línea celular de macrófagos J774 en diferentes condiciones de cultivo con 2x10⁵ células/pocillo en placa de 24: 1) LPS+ATP (control +); 2) medio completo (control -); 3) Infectado con tripomastigotes (2:1, parásito:célula); 4) LPS+ATP+*T. cruzi*; 5) CC (500 μ g/ml); por triplicado. Se determinó IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de 6 horas post estímulo por ELISA sándwich y se fijaron las células con paraformaldehído al 4%. Se observó la marca del anticuerpo específico anti-NLRP3 en el citoplasma celular tanto en el control (+) (LPS+ATP), como en las células infectadas con *T. cruzi*. La marca para NLRP3 fue negativa en citoplasma de macrófagos cultivados con DMEM solamente. En las condiciones experimentales empleadas, no se detectó activación de NLRP3 por estimulación con CC. Los niveles de IL-1 β fueron significativamente mayores respecto del control (-) en las células cultivadas con LPS+ATP e infectadas con *T. cruzi* (p<0,05). **Conclusión:** estos resultados sugieren que el *Trypanosoma cruzi* activaría al inflammasoma NLRP3 e induciría la liberación de IL-1 β en una línea de macrófagos murinos.

662. (744) RESPUESTA INMUNE CONTRA TC52 Y SUS DOMINIOS N- Y C-TERMINALES INDUCIDAS POR

C-DI-AMP Y A-GCPEG COMO ADYUVANTES INTRANASALES

Matos, M.^{1,2,3}, Cazorla, S.^{1,2}, Schulze, K.³, Weissmann, S.³, Guzman, C.³, Malchiodi, E.^{1,2}
IDEHU-Inmunología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA¹ Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM, UBA-CONICET) Fmed. UBA² Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH. Braunschweig. Alemania³

Tc52 es una proteína de *T. cruzi* con actividad glutatión transferasa, vital para el parásito. Previamente demostramos que el ADN de Tc52 y sus dominios N- y C-term, transportados por *Salmonella* atenuada, generaban una respuesta protectora. En este trabajo estudiamos la respuesta inmune desarrollada por Tc52 y sus dominios utilizando como adyuvante bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate (c-di-AMP) comparando con inmunizaciones de N-term + ODN-CpG. Los ratones C3H se inmunizaron por vía intranasal con 3 dosis. Postinmunización se tomaron muestras de suero, lavado ocular, lavado nasal, saliva y se extrajo el bazo y los ganglios linfáticos drenantes. Los grupos inmunizados con adyuvantes desarrollaron respuesta inmune específica con títulos muy altos de IgG anti-Tc52 en suero y de IgA anti-Tc52 en mucosas. Así mismo, estos grupos desarrollaron una respuesta inmune celular específica en ganglios linfáticos y esplenocitos que proliferaron en presencia de Tc52 (determinado por incorporación de ³H-timidina, índice de proliferación >2, p<0.05). En esplenocitos, por ELISPOT, se determinó el número de células secretoras de IL-4, IFN-g e IL-17 en presencia de Tc52. Todos los grupos presentaron bajo número de células productoras de IL-4 y alto número de células IFN-g+, sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, solo los grupos inmunizados con c-di-AMP presentaron alta respuesta de IL-17+ comparado con el grupo inmunizado con N-term + CpG-ODN. Adicionalmente, otro grupo se inmunizó con N-ter y α -galactosilceramida PEGilada (a-GCPEG) junto a c-di-AMP. Encontramos que la a-GCPEG impide el aumento de células productoras de IL-17 inducida por c-di-AMP. Se concluye que los grupos inmunizados con las proteínas recombinantes desarrollaron una respuesta inmune específica frente a Tc52, siendo el patrón de la misma altamente dependiente del adyuvante. Se están llevando a cabo los estudios de inmunoprotección frente a la infección con estos adyuvantes.

663. (139) RELEVAMIENTO SEROLÓGICO DE LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS PARA EVALUAR SU POTENCIAL COMO RESERVORIOS DE AGENTES PATÓGENOS PARA EL HOMBRE Y OTROS ANIMALES

Ledesma, M.¹, Friedrich, A.¹, Fernández, B.², Mundo, S.², Restelli, M.³, Bertot, G.³, Venturiello, S.¹, Leoni, J.¹, Ferrari, A.¹

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA² Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"³

Introducción: Los camélidos sudamericanos (CS) constituyen una forma de ganado en crecimiento, cuyos productos derivados son cada vez más utilizados en nuestro territorio. En ese contexto, el relevamiento de sus enfermedades infecciosas resulta crucial para proteger a los consumidores, otras especies de ganado y los propios animales. **Objetivos:** Realizar un relevamiento serológico de anticuerpos específicos para agentes infecciosos parasitarios (*T. spiralis*) y bacterianos (complejo *Burkholderia cepacia* [BCC] y *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*). **Metodología:** Se analizaron 72 sueros de CS, provenientes de distintas regiones del país. El estudio realizado sobre el complejo *B. cepacia* consistió en la detección por ELISA de IgG e IgM contra las OMP (outer membrane protein) de 5 genomovares del complejo. En el caso de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*, se evaluaron por ELISA las IgG e IgM contra el antígeno protoplasmático. La detección de anticuerpos contra *T. spiralis* se realizó por ELISA y Western Blot (antígenos de excreción/secreción) y por inmunofluorescencia (improntas con larvas musculares). **Resultados:** Los resultados indican presencia de anticuerpos específicos para todos los microorganismos en estudio. Para BCC se encontraron

diferencias de acuerdo con la especie y diferencias regionales. El análisis de Ac de tipo IgG específicos demostró una seroprevalencia de 22,2% de positividad anti *B. vietnamiensis*-OMP; 19,4% anti *B. stabilis*-OMP y 5,6% anti *B. cenocepacia*-OMP. Para *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* se demostró un 11% de positividad para IgG, con marcada heterogeneidad regional. A su vez, un 11% de los sueros mostraron reactividad contra *T. spiralis* por dos de las tres técnicas empleadas (criterio de positividad). **Conclusiones:** estos resultados sugieren que los CS están en contacto con estos microorganismos y que podrían actuar como potenciales reservorios, constituyendo así un riesgo sanitario.

664. (473) INVESTIGACION DE VENENO DE BOTHROPS ALTERNATUS (YARARA GRANDE). DETECCION DE VENENO CIRCULANTE EN SUERO Y ORGANOS. ALTERACIONES ANATOMOPATOLOGICAS

Guilleron, C.¹, Suárez, R.²

Inst.Nac.Produccion de Biologicos.ANLIS.Malbran¹ Inst.Nac. de Enfermedades Infecciosas. INEI. ANLIS-Malbran²

La detección, medida y distribución de veneno de serpiente es importante para la elección del antiveneno, el diagnóstico de el envenenamiento, y la investigación forense. Los accidentes son una emergencia médica. En Argentina son de mayor importancia sanitaria la picadura de *Bothrops alternatus* responsable del 83,4% de los accidentes, y la de los géneros *Crótalos* 2,5%, y *Micrurus* 0,5%, y se registran casos indeterminados en un 13,6%. Se desarrolló un ELISA (EIE) para identificar la presencia de veneno circulante (VC) de *B.alternatus* en suero y en homogenatos de órganos de ratas inoculadas experimentalmente. Se realizaron estudios anatomopatológicos para relacionar cambios funcionales y morfológicos comparables a los observados en accidentes en humanos. El veneno fue obtenido del INPB-Malbran. Un lote de 20 ratas Wistar fueron inoculadas con 0,8mg/Kg de veneno (VSc). Seis ratas fueron sacrificadas, a las tres horas de su inoculación y sus órganos estudiados por hematoxina y eosina. En todas las inoculadas se realizó ELISA en forma seriada para intentar cuantificar VC y en los órganos. El EIE fue capaz de detectar el veneno desde 3 ng/ml y fue efectuado seriamente, y a las tres horas de inoculación junto al sacrificio para patología. El veneno fue hallado en el siguiente orden de concentración riñón, corazón, piel, hígado, pulmón. Los estudios en piel mostraron proteólisis del tejido conectivo en la epidermis y la dermis. En las fibras musculares, infiltración inflamatoria de neutrófilos bajo número de fagocitos. En el hígado se observó daño tisular, vasos capilares con hemólisis y presencia de linfocitos y células fagocíticas. En el riñón retracción de glomérulos sin alteración de la cápsula de Bowman, con elevada hemólisis y daño endotelial. La EIE es un ensayo rápido para la identificación de VC en suero, así como la distribución del mismo en los órganos.

ONCOLOGÍA 8

665. (218) UTILIZACIÓN DEL INHIBIDOR ESPECIFICO DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE, 1400 W, EN UN MODELO ORTOTÓPICO DE CÁNCER DE VEJIGA MURINO

Belgorosky, D.; Langle, Y.; Eijn, A.

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

El óxido nítrico (NO) es un radical libre producido por enzimas llamadas NOS. La isoforma inducible (iNOS), produce niveles altos de NO en respuesta a estímulos inflamatorios. La expresión de iNOS en los tumores de vejiga humana es un factor de mal pronóstico, asociado a mayor invasión y recurrencias tumorales. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino de cáncer de vejiga (CaV) con diferente grado de invasión que mimetiza la patología humana. La inoculación ortotópica de la línea MB49 desarrolla tumores confinados al epitelio vesical con una baja expresión de iNOS, mientras que MB49-I desarrolla tumores invasores, con una alta expresión de la enzima en tejido tumoral y en el urotelio no tumoral. El **objetivo** fue estudiar la respuesta de estas líneas tumorales al tratamiento con 1400W, inhibidor

específico de la iNOS. In vitro, 1400W (5µM), inhibe la proliferación de la línea MB49-I (p<0,05) (MTS) sin afectar la de MB49. MB49-I produce mayores niveles de NO que MB49 (p<0,05). 1400W disminuye la producción de NO de ambas líneas (Griess) (p<0,001). In vivo, la administración endovesical de 1400W (5µM, dos veces por semana) inhibe el crecimiento tumoral en el 71% y 57 % de los ratones MB49-I y MB49 respectivamente. La actividad angiogénica (densidad de vasos) fue disminuida por 1400W únicamente en los tumores invasores (p<0,05). Los niveles de NO en orina fueron mayores en los ratones MB49-I que en los MB49 y en los ratones sin tumor (p<0,05). La administración de 1400W reduce solamente la producción de NO en la orina de ratones MB49-I (p<0,001). **Conclusión:** El NO producido por células de cáncer de vejiga sería en parte un factor necesario para el crecimiento tumoral y para la neovascularización. La presencia de NO en orina es indicador de presencia de tumor vesical y de respuesta al tratamiento. Planteamos la hipótesis de que la inhibición de iNOS podría ser un posible blanco terapéutico favorable para pacientes con CaV cuyos tumores expresen iNOS.

666. (616) EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CLUSTERINA EN NEOPLASIAS DE MAMA INDUCIDAS POR EL VIRUS POLIOMA MURINO Y EN LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL DEL RATÓN

Sabatté, J.; Simula, S.; Geffner, J.; Sanjuan, N.

Departamento de Microbiología Facultad de Medicina UBA

Los virus Polioma pueden inducir neoplasias múltiples en ratones, entre ellas adenocarcinomas de mama similares a los observados en la mujer. Es sabido que el oncogén viral expresa a la proteína mT que interactúa con reguladores del crecimiento celular llevando a la oncogénesis. No obstante, los eventuales mecanismos anti-apoptóticos que el virus pudiera expresar son desconocidos. La Clusterina es una proteína descubierta en el humano y ampliamente distribuida en fluidos corporales y expresada por tejidos normales y neoplásicos de próstata, mama, colon, ovario, cerebro, etc. Una de sus isoformas tiene localización nuclear y se la considera pro-apoptótica. Otras dos tienen ubicación citoplasmática, están glicosiladas e intervienen en la anti-apoptosis. La hipótesis de este trabajo es que los tumores de mama inducidos por Polioma podrían involucrar a Clusterina como un mecanismo anti-apoptótico. Se procesaron cortes parafinados de neoplasias de mama inducidas por Polioma en ratones C3H BiDa con técnicas histológicas y de inmunoperoxidasa contra Clusterina y otros cortes adyacentes con un suero que detecta la totalidad de los antígenos del virus. Se observó que las neoplasias eran carcinomas intraductales, del tipo comedocarcinoma. La marcación fue positiva para Clusterina en forma citoplásmica en todas las neoplasias, especialmente en las células proliferantes mientras que fue nuclear en el tejido mamario normal adyacente. Por Western blots realizados con extractos tumorales y de tejido mamario normal se detectó una mayor expresión de las formas secretorias de Clusterina en las neoplasias que en los tejidos normales. Se concluye que en la glándula mamaria normal del ratón la Clusterina probablemente interviene en la pro-apoptosis de los ductos, mientras que el virus es capaz de inducir la expresión de las isoformas anti-apoptóticas de la proteína en las neoplasias de mama.

667. (620) ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO QUE SOBREENPRESAN CATALASA

Ibáñez, I.; Bracalente, C.²; Durán, H.^{2,3}; Chernomoretz, A.¹
Fundación Instituto Leloir - FCEN-UBA - IFIBA-CONICET¹ CNEA-CONICET² UNSAM³

La catalasa (CAT) disipa el H₂O₂ y ha sido descripta en la reversión del fenotipo tumoral maligno. Se realizó el análisis bioinformático de microarrays de expresión de genoma completo (GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array, Affymetrix) para caracterizar la expresión génica del clon estable A7 de células A375 de melanoma humano amelanótico que sobreexpresan CAT. El análisis mediante R y paquetes de Bioconductor (parámetros: lfc=1 y

$p < 0.001$), mostró 44 genes subexpresados y 156 sobreexpresados de 33297 en A7 con respecto al promedio de los controles (A375 transfectadas con el plásmido pcDNA3 vacío o no transfectadas, que mostraron sólo un gen diferencialmente expresado entre sí). Además se evaluaron células A375 incubadas en presencia de CAT en el medio de cultivo (A375-CAT) y se encontraron 10 genes subexpresados y 60 sobreexpresados con respecto al control. Los genes diferenciales se clasificaron funcionalmente mediante DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) siendo involucrados en adhesión celular, apoptosis, migración, melanogénesis y diferenciación. Se seleccionaron 150 grupos de genes de Gene Ontology y de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) asociados a estos procesos biológicos de interés, así como también genes de firmas pronósticas bibliográficas de melanomas agresivos para evaluar el perfil de expresión conjunta de nuestros genes diferenciales experimentales en estos procesos mediante GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). A7 a diferencia de los controles presentó grupos de genes sobreexpresados en conjunto para procesos relacionados con melanogénesis, adhesión celular y apoptosis. En A7 y A375-CAT, a diferencia de los controles, los genes MELANA, TYR y OCA2, asociados a la diferenciación melanocítica, se encontraron sobreexpresados, mientras que fueron descriptos bibliográficamente disminuidos en melanomas agresivos. Estos resultados sugieren que el secuestro de H_2O_2 participaría en la diferenciación melanocítica.

- 668. (644) INTERACCIONES ENTRE LAS VÍAS DE JNK, P38, AKT Y WNT CANÓNICA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO QUE REEXPRESAN GPC3**
Castillo, L.; Tascon, R.; Bal De Kier Joffe, E.; Peters, M.
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"

Previamente transfectamos células del adenocarcinoma mamario murino LM3 con el gen de GPC3, demostrándose que este proteoglicano actúa como un **supresor metastásico**. GPC3 inhibe las vías Wnt canónica y Akt, mientras que estimula las señalizaciones Wnt no canónica (JNK) y p38. El objetivo de este trabajo fue estudiar las interacciones entre las vías moduladas por GPC3. Para ello, los clones fueron tratados con los inhibidores de p38 (SB239063) o JNK (SP600125), o infectados con virus codificando CA Akt, evaluándose posteriormente la actividad de las otras vías mediante WB. El SP600125 indujo un aumento de 2 a 5 veces en los niveles de B-Catenina citoplasmática, así como una reducción de 2 a 6 veces en los niveles de E-Cadherina, blanco *downregulado* por la vía Wnt canónica. Por lo tanto, la activación de JNK sería necesaria para la inhibición de la vía Wnt canónica inducida por GPC3. El SP600125 no tuvo efectos sobre Akt, sugiriendo que la inhibición de Akt inducida por GPC3 sería independiente de JNK. El SB239063 no moduló la B-Catenina citoplasmática de las células LM3-GPC3. Esto sugiere que p38 no participaría en la inhibición de la vía Wnt canónica inducida por GPC3. Por otro lado, aunque sin alcanzar a las células LM3-vector, el SB239063 provocó un aumento de 2 veces en los niveles de fosfo-Akt de los clones LM3-GPC3. Por lo tanto, la vía p38 sería capaz de inhibir la señalización de Akt en las células que reexpresan GPC3. Establecimos que las células LM3-GPC3 forzadas a expresar una variante CA Akt, presentan de 2 a 4 veces más B-Catenina citoplasmática. Así, la inhibición de la vía Akt inducida por GPC3 sería necesaria para que este glipicano pueda reducir la señalización canónica de Wnt. Sin embargo, CA Akt no tuvo efectos sobre la fosforilación de JNK, indicando la independencia de ambas vías. En resumen, confirmamos que las vías moduladas por GPC3 están interactuando de manera funcional, donde cada una de ellas sería capaz de regular a otra.

- 669. (654) NIVELES DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR A ESTRÓGENOS α (RE α) Y EXPRESIÓN DEL COMPLEJO AP-1 EN MAMAS DE RATAS DIABÉTICAS DURANTE EL DESARROLLO DEL CÁNCER MAMARIO**
Gutiérrez, A.¹; Bergoc, R.¹; Sambuco, L.³; Crocci, M.³; Cricco, G.¹; Rivera, E.¹; Alvarez, L.⁴; Martín, G.¹; Randi, A.⁴
Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA¹ Fundación Barceló, IUCS² Instituto de Inmunooncología Crescent³ Lab

de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Facultad de Medicina, UBA⁴

Los estrógenos y factores de crecimiento inducen expresión y actividad de AP-1, que funciona modulando el crecimiento celular y la invasión en cáncer de mama. Los estrógenos actúan como factores de crecimiento, desencadenando acciones rápidas a nivel de membrana, activando las vías de MAPK y Akt. El RE α se fosforila en Tyr537 por c-Src y esta activación es necesaria para la síntesis de ADN y crecimiento tumoral. Hemos desarrollado un Modelo Experimental de Cáncer Mamario y Diabetes en rata, induciendo tumores malignos con 3 inyecciones ip de NMU (50 mg/kg) y Diabetes con una inyección ip de estreptozotocina (90 mg/kg). Demostramos que los animales con Diabetes desarrollan tumores mamarios más diferenciados, con mayor período de latencia y menor velocidad de crecimiento, que los Control. **Objetivo:** Estudiar la activación del RE α , así como la expresión de AP-1 en el desarrollo de tumores mamarios en ratas Diabéticas (NMU-Diabéticas) y Control (NMU). Las mamas de ratas Control, Diabéticas, NMU y NMU-Diabéticas fueron extraídas a los 60, 120 y 150 días, obteniéndose citosoles y núcleos para inmunoprecipitación de p-c-Jun e inmunoblot de p-c-Jun y c-Fos, así como de pTyr537-RE α y RE α total. **Resultados:** Los niveles de p-c-Jun aumentaron 39% $p < 0.05$ en NMU mientras que en NMU-Diabéticas disminuyeron un 21% $p < 0.05$ de 60 a 150 días. Los niveles de c-Fos asociados a c-Jun, aumentaron 11% $p < 0.05$ en NMU pero en NMU-Diabéticas disminuyeron 65% $p < 0.05$. La activación de Tyr537-RE α citosólico en función del tiempo de desarrollo tumoral aumentó en NMU 35% y disminuyó en NMU-Diabéticas 22% $p < 0.05$, mientras que los niveles de RE α totales no variaron. En cambio, en ambos grupos la activación de Tyr537-RE α nuclear disminuyó 9% NMU y 36% $p < 0.05$ NMU-Diabéticas. **Conclusión:** El aumento de AP-1 y de actividad de Tyr537-RE α se puede asociar con el desarrollo tumoral en el grupo NMU, mientras que la disminución en NMU-Diabéticas se correlacionaría con el retraso en la carcinogénesis observada.

- 670. (663) LA SOBREENPRESIÓN DEL COACTIVADOR RAC3 FAVORECE EL PROCESO METASTÁSICO**
Panelo, L.¹; Fernández Larrosa Pablo Nicolas,¹; Rubio Mara Fernanda¹; Alvarado Cecilia¹; Ruiz Grecco Marina¹; Díaz Bessone Mara Ines²; Urtreger Alejandro²; Costas Monica Alejandra¹
Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, IDIM, CONICET¹ Área de investigación, Instituto de Oncología Angel Roffo²

Demostramos previamente que el coactivador RAC3 es un oncogén cuya sola sobreexpresión favorece el crecimiento tumoral, la resistencia a apoptosis y tiene un efecto transformante. Sin embargo, poco se sabe sobre el rol de RAC3 en procesos como metástasis y angiogénesis. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de RAC3 sobre la migración/invasión celular, la expresión de proteínas involucradas en la transición epitelio-mesenchimática (TEM) así como la actividad de metaloproteinasas (MMP). Células HEK293 (no tumorales) transfectadas o no con un vector de expresión para RAC3 y células T47D (tumorales) transfectadas o no con un RNAi para RAC3 fueron seleccionadas para generar clones estables con alto o bajo RAC3. Se realizaron ensayos de migración/invasión en células HEK293 (RAC3 o control) y T47D (RNAi o control) mediante la técnica de Transwell, observándose un aumento del 100% en la migración y 300% en la invasión de células con alto RAC3 vs control, mientras que en células T47D con bajo RAC3 muestran una disminución del 55% de la capacidad invasiva. Estos resultados correlacionan con un aumento del 100% en la actividad MMP2 en células HEK293 (RAC3 vs control) y una disminución del 76% en células T47D (RNAi vs control). Como demostramos previamente la sobreexpresión de RAC3 en células no tumorales induce un aumento en los niveles de Vimentina. Dichos resultados fueron confirmados por qPCR e IF para Vimentina y E-cadherina donde observamos que las células que sobreexpresan RAC3 tienen aumentados los niveles de Vimentina y disminuidos los niveles de E-cadherina, lo cual favorece la TEM; mientras que

en las células tumorales que tienen silenciados los niveles de RAC3 se observa una disminución de Vimentina y un aumento de Ecadherina. A partir de estos resultados podemos concluir que la sobreexpresión de RAC3 favorece la migración e invasión de células tumorales contribuyendo al proceso metastásico.

671. (669) EL HEXACLOROBENCENO INCREMENTA EL CRECIMIENTO TUMORAL Y LA METÁSTASIS EN MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE MAMA

Pontillo, C.¹; Rojas, P.²; Chiappini, F.¹; Sequeira, G.²; Coca, C.³; Crocci, M.⁴; Colombo, L.⁵; Lanari, C.²; Kleiman De Piarev, D.¹; Randi, A.¹

Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales. Facultad de Medicina. UBA¹ Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET² Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³ Instituto de Inmunología Crescenti⁴ Instituto de Oncología Angel Roffo⁵

El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado considerado como probable carcinógeno humano. Es un compuesto "tipo-dioxina" y un ligando débil del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (RHA), un factor de transcripción que modula procesos como proliferación y migración. Demostramos que el HCB induce las vías de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1-2, la migración e invasión, así como la expresión de metaloproteasas (MMPs) 2 y 9 en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Nuestro objetivo fue estudiar la acción del HCB en el crecimiento tumoral, expresión de MMP2 y 9, activación de la vía c-Src/HER1 y metástasis en tres modelos *in vivo*: a) Modelo de xenotrasplante con MDA-MB-231 en ratones atímicos; b) Modelo singénico con tumores C4-HI en ratones BALB-c y c) Modelo experimental singénico con LM3 en ratones BALB-c. Los animales fueron tratados con HCB (0.3, 3 y 30 mg/kg p.c.) ó vehículo (aceite de maíz) durante 4 semanas. En el modelo de xenotrasplante, el HCB estimuló el crecimiento tumoral (0.3 y 3 mg/kg p.c.) ($p < 0.001$), la activación de c-Src, HER1, ERK1-2 y STAT5b, así como los niveles proteicos de MMP2 (95 %, $p < 0.05$) y MMP9 (178 %, $p < 0.01$) en tumores mamaros en todas las dosis. En el modelo de C4-HI, el HCB (0.3 y 3 mg/kg p.c.) incrementa el tamaño tumoral ($p < 0.001$) y el número de metástasis en pulmón (0.3 HCB:190%, $p < 0.05$ y 3 HCB:230% $p < 0.001$) y en hígado (0.3 HCB:200%, $p < 0.05$). A su vez, el pesticida (30 mg/kg p.c.) incrementa el tamaño de los focos metastásicos en pulmón en el modelo de LM3 (185%, $p < 0.05$). En conclusión, nuestro trabajo demuestra que el HCB promueve el crecimiento tumoral y la metástasis en pulmón en diferentes modelos de cáncer de mama *in vivo*. En el modelo de xenotrasplante, este incremento correlaciona con la activación de las vías c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1-2 y un aumento en los niveles de MMPs en los tumores. Estos hallazgos sugieren que el HCB puede ser un factor de riesgo para la progresión en cáncer de mama.

672. (697) LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR NOTCH, PI3K/AKT Y MAPK Y SU POSIBLE INTERACCIÓN EN UNA LÍNEA OVÁRICA TUMORAL DE GRANULOSA HUMANA

Pazos, C.; Accialini, P.; Irusta, G.; Tesone, M.
Instituto de Biología y Medicina Experimental

En diversos sistemas tumorales se ha demostrado que el sistema Notch se encuentra involucrado en la supervivencia de células tumorales de diversos orígenes, y además que interactúa con diferentes vías de transducción de señales. Anteriormente hemos observado que la inhibición de este sistema afecta la proliferación, esteroidogénesis y parámetros apoptóticos de una línea ovárica tumoral de granulosa humana (KGN). En el presente trabajo, nuestro objetivo es estudiar el rol de las vías de señalización intracelulares PI3K/AKT, MAPK y el sistema NOTCH sobre la viabilidad y migración de la línea celular KGN. Asimismo, investigamos la posible interacción entre estas vías. Para ello, realizamos ensayos de viabilidad y migración celular en células KGN en presencia de distintas concentraciones de los inhibidores LY294002, UO126 y DAPT. Además, realizamos

western blot de AKT, ERK1/2 y sus estados fosforilados, y de la proteína PTEN en presencia de DAPT. Observamos una inhibición de la viabilidad celular de manera concentración-dependiente al incubar células KGN en presencia de los inhibidores de las tres vías mencionadas comparado al control, LY294002 ($p < 0.01$), UO126 ($p < 0.001$) y DAPT ($p < 0.01$). La migración celular también disminuyó significativamente en presencia de cada uno de los inhibidores mencionados, LY294002 ($p < 0.01$); UO126 ($p < 0.05$) y DAPT ($p < 0.05$). Al inhibir el sistema Notch, observamos una disminución significativa en la fosforilación de la proteína AKT (control vs DAPT, $p < 0.05$) y un aumento de la proteína PTEN (control vs DAPT, $p < 0.05$). Sin embargo, no observamos cambios en la fosforilación de la proteína ERK. Con estos resultados sugerimos que las vías analizadas afectan la viabilidad y migración de las células KGN, y que el sistema Notch interactúa con la vía de transducción PI3K/AKT en este tipo celular.

673. (735) CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO HER2+ RESISTEN AL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB EN CONDICIONES DE HIPOXIA

Moverer, L.; Rodríguez, C.; Reidel, S.; Bal De Kier Joffé, E.; Jasnis, M.; Fiszman, G.
Instituto de Oncología A.H. Roffo, UBA

Los tumores hipóxicos están asociados a un pronóstico desfavorable. El receptor HER2 se sobreexpresa en un 25% de tumores de mama invasivos. Un gran número de pacientes tratados con Trastuzumab (Tz), anticuerpo monoclonal anti-HER2, desarrollan resistencia. Estudiaremos la influencia de la hipoxia sobre la actividad antitumoral del Tz. Se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma mamario humano BT-474 y SKBR-3 (ambas HER2+) y MDA-MB231 (HER2-). Las condiciones hipóxicas se generaron con Cl_2Co (100 μM) o con una cámara de hipoxia (1% O_2). Las células cultivadas en normoxia e hipoxia se trataron con Tz (0,0006-50 $\mu g/ml$), se cuantificó la proliferación celular por MTS (control: IgG humana) y la viabilidad por azul Trypan y clonogenicidad. En normoxia, el Tz fue citotóxico en forma dosis dependiente sobre las líneas HER2+ (viabilidad 60% vs control, $p < 0.05$) pero no en la HER2-; en cambio no se detectó actividad antitumoral en condiciones de hipoxia. Se detectó una disminución del 50% en la clonogenicidad de las células en hipoxia ($p < 0.05$ vs células en normoxia) Determinamos que la citotoxicidad del Tz en normoxia se asocia a un aumento significativo de dependiente de óxido nítrico (ensayo de Griess), el cual también es liberado en condiciones de hipoxia aún en ausencia de Tz ($p < 0.05$), por lo cual disminuye la sensibilidad. Se analizó la expresión del factor inducible por hipoxia-1a (HIF-1a) en células BT-474 y MDA-MB231 (IF y western blot). Las células cultivadas en hipoxia tratadas con Tz mostraron un aumento de HIF-1a en el citoplasma, sólo en BT-474, demostrando la posible participación de HIF-1 en los mecanismos de resistencia a la inmunoterapia con Tz. Se detectó localización nuclear de VEGF inducido por Tz sólo en condiciones de hipoxia. En conclusión, la hipoxia considerada como un componente fundamental del microambiente tumoral, estaría involucrada en los mecanismos de resistencia de las células tumorales de mama HER2+ al Tz.

674. (780) RADIOSENSIBILIZACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER COLORRECTAL MEDIANTE EL SILENCIAMIENTO DE KU80 EMPLEANDO ARNI ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Cerda, M.²; Batalla, M.¹; Catalano, P.¹²; Mykhaylyk, O.⁴; Plank, C.⁴; Duran, H.¹²³; Policastro, L.¹²
CNEA¹ CONICET² UNSAM³ Instituto de Experimental Oncology and Therapy Research of the Technische Uniuersitat Munchen⁴

La radiorresistencia es una de las principales causas del fracaso de los tratamientos del cáncer. La proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) es uno de los principales complejos asociados a la reparación del daño en el ADN causado por la radiación ionizante. Está formado por un componente catalítico y una proteína heterodimérica formada por ku70 y ku80. Previamente

se determinó que los niveles de ku80 aumentan en función del aumento de la radiorresistencia en células de cáncer colorrectal (HT-29>Caco2>T84>LoVo). A partir de estos resultados, el objetivo de este trabajo fue silenciar la expresión de ku80 mediante el uso de ARN de interferencia (ARNi) y analizar su posible efecto radiosensibilizador mediante ensayos clonogénicos y obtención de curvas de sobrevida ajustadas al modelo lineal cuadrático ($S = \exp(-\alpha D + \beta D^2)$). La capacidad de radiosensibilización se cuantificó mediante el parámetro SER (sensitizer enhancement ratio, ARNi control / ARNi contra Ku80): SER0.1 como la relación de dosis necesaria para obtener una fracción de sobrevida de 0,1 y SER α como la relación entre los parámetros α . Para la línea T84 se obtuvo un SER α =1.68 y SER0.1 =1.20; y para la línea Caco-2 SER α =1.64 y SER0.1 =1.36. A fin de optimizar el silenciamiento de la línea HT-29 que es totalmente refractaria a la transfección con los métodos lipídicos tradicionales, empleamos nanopartículas magnéticas para acomplejar el ARNi. Se formaron complejos con distintas relaciones de nanopartículas magnéticas/ ARNi (0.5, 1 y 1.5) y distintas concentraciones finales de ARNi (40, 20 y 10 nM). Se evaluó la capacidad de transfección y silenciamiento de los diferentes complejos en una línea de Caco-2 que expresa constitutivamente el gen de la luciferasa, empleando un ARNi contra luciferasa. A partir de estos experimentos se eligió la condición óptima para el silenciamiento de ku80, obteniéndose niveles de radiosensibilización comparables a los obtenidos con el método estándar (Lipofectamina).

675. (781) PAPEL PREPONDERANTE DE GALECTINA-1 EN LA ANGIOGÉNESIS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Gentilini, L.¹; Giribaldi, L.¹; Jaworski, F.¹; Nugnes, L.¹⁵; Crenas Delgado, V.³; Croci, D.²; Al Nakouzi, N.³; Rodig, S.⁵; Kutok, J.⁶; Mazza, O.⁴; Vazquez, E.¹; Elola, M.⁵; Chauchereau, A.³; Rabinovich, G.¹²; Laderach, D.¹; Compagno, D.¹ *IQUIBICEN-CONICET / Depto. Química Biológica, FCEyN, UBA, Buenos Aires, Argentina*¹ *Laboratorio de Inmunopatología (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina*² *INSERM U981, Villejuif, France*³ *Hospital Nacional de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, Argentina*⁴ *Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica*⁵ *Dep. of Pathology, HARVARD Medical School, Boston (MA), USA*⁶

El cáncer de próstata (CaP) constituye un problema importante de Salud Pública; si bien la mortalidad por este tipo de cáncer ha disminuido considerablemente en los últimos años, aún es responsable de aproximadamente el 15% de las muertes de hombres por cáncer. Tratamientos hormonales permiten controlar la evolución del CaP en sus fases precoces, pero un 15-20% de los pacientes progresan hacia estadios de metástasis óseas refractarias a la privación hormonal. La implementación de métodos tanto diagnósticos capaces de detectar la enfermedad en fases incipientes como pronósticos y/o terapéuticos en fases tardías son, por consiguiente, desafíos mayores en el estudio de esta enfermedad. Resultados previos de nuestro grupo han descrito un importante papel de Galectina-1 (Gal-1) en CaP, siendo el único miembro de esta familia de galectinas con expresión regulada positivamente durante la progresión de la enfermedad. En contraposición, las Gals-3, -4, -9 y -12 son reguladas negativamente, mientras que Gal-8 es expresada a niveles importantes sin evidente modulación durante la progresión de la enfermedad. Ensayos de tubulogénesis *in vitro* y estudios de angiogénesis *in vivo* permitieron demostrar que Gal-1 posee un rol preponderante en la vascularización en CaP. El cultivo de células de CaP humanas bajo condiciones de hipoxia mostró que Gal-1 es la única galectina inducida bajo estas condiciones; si bien de manera moderada ($x1.3$; $p=0.015$). El análisis por la expresión diferencial de genes asociados a angiogénesis reveló que el silenciamiento de Gal-1 en células tumorales prostáticas no altera la expresión de estos genes ni en el compartimento tumoral ni en células del microambiente asociado. El conjunto de estos hallazgos posiciona a Gal-1 como un mediador clave de la vascularización tumoral en CaP capaz de regular en sí misma estos procesos. El control de la expresión o actividad de esta

galectina plantea un nuevo y prometedor blanco terapéutico en este tipo de cáncer.

676. (788) QUIMIOSENSIBILIZACIÓN DE CELULAS TUMORALES MEDIANTE EL USO DE DADORES DE OXIDO NITRICO. POTENCIAL USO DE LIPOSOMAS TERMOSENSIBLES

Batalla, M.¹; Cerda, M.¹³; Duran, H.¹³⁴; Podhajcer, O.²³; Policastro, L.¹²³
*Comision Nacional de Energia Atomica*¹ *Fundacion Instituto Lelorr*² *CONICET*³ *UNSAM*⁴

Una forma ampliamente utilizada en el tratamiento de cáncer colorrectal es la radio-quimioterapia pre-quirúrgica como complemento de la cirugía. Esta práctica disminuye el volumen tumoral, facilita la resección quirúrgica, disminuye la probabilidad de recurrencia, y aumenta la sobrevida de los pacientes. Sin embargo, la respuesta de los pacientes con estado avanzado de la enfermedad tratados con drogas quimioterapéuticas tales como 5-fluorouracilo (5-FU), la droga más utilizada en cáncer colorrectal, es solo del 15%. En combinación con otras drogas como el oxaliplatino (OXA) mejora la respuesta en 40-50%. Hay evidencias del óxido nítrico como agente quimiosensibilizador sobre células cancerosas. En este trabajo se trataron células de cáncer colorrectal (LoVo, Caco-2, T84 y HT-29) con distintas drogas quimioterapéuticas (5-FU, OXA, doxorubicina) combinadas un dador de óxido nítrico (DETA). Se realizaron distintas combinaciones de las drogas quimioterapéutica (10^{-3} a 10^{-8} M) con distintas concentraciones de DETA (10^{-2} a 10^{-7}) (isobologramas). Se realizaron ensayos de evaluación de la proliferación luego de 48hs de incubación con las drogas. Se obtuvo efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación para varias combinaciones de drogas (combination index <1). Por otro lado, se encapsuló el dador de óxido nítrico en liposomas termosensibles, formados por DPPC/Colesterol (5:1) cuya temperatura de transición de fase (T_m) es de 39°C. Se encapsuló DETA durante la extrusión, que se determinó de manera indirecta mediante la determinación de nitritos (ensayo de Griess). Estos liposomas tuvieron efecto inhibitorio sobre la proliferación en células de cáncer colorrectal en ensayos *in vitro*. Se espera realizar futuros estudios de liberación de controlada de DETA combinada con drogas quimioterapéuticas en modelos *in vivo*.

NEFROLOGÍA

677. (83) EXPRESIÓN DE ACUAPORINA-2 EN EL MODELO DE HIPERTENSIÓN DE GOLDBLATT UN RIÑÓN - 1 CLIP

Albertoni Borghese, M.¹; Hoppe, S.²; Lavagna, A.¹; Filipuzzi, A.¹; Ortiz, M.¹; Balonga, S.¹; Catanzariti, A.²; Vatta, M.²; Majowicz, M.¹
*Cátedra de Biología celular y Molecular - FFYB - UBA*¹
*Cátedra de Fisiología - FFYB - UBA*²

La expresión de acuaporina 2 (AQP2) está alterada en algunos modelos de hipertensión arterial (HA), ya sea contribuyendo al desarrollo de la patología o bien compensando para atenuar la HA. Al momento no hay datos sobre la expresión de AQP2 en el modelo de Goldblatt de 1-riñón, 1-clip (1K-1C). El objetivo fue analizar la expresión de AQP2 en la médula renal de animales 1K-1C, evaluando tanto la proteína AQP2 como su ARNm. Se midieron además parámetros de función renal. Se trabajó con tres grupos de animales: (1) control Sham (2K-NC): en los que se simuló la intervención quirúrgica pero no se realizó la nefrectomía ni se colocó el clip en la arteria renal; (2) control nefrectomizado (1K-NC): con nefrectomía unilateral pero sin clip en la arteria renal contralateral (3) Goldblatt o hipertenso (1K-1C): sometido a nefrectomía unilateral y a la colocación de un clip en la arteria renal contralateral. Los animales se estudiaron a las 4 semanas de la cirugía. La presión arterial sistólica (PAS) se monitoreó semanalmente por el método indirecto. Se usó ANOVA + Bonferroni para la estadística; $n=7$; * $p<0.05$; *** $p<0.001$. La PAS aumentó en 1K-1C vs 2K-NC y 1K-NC (203.3 ± 10.4 , 130.5 ± 0.5 y 118.0 ± 0.4 respectivamente)***. La expresión de AQP2 por Real Time PCR

(unidades arbitrarias, expresada por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$) disminuyó en 1K-1C (0.5575 ± 0.03694)* vs 2K-NC (1.014 ± 0.2000) y vs 1K-NC (1.097 ± 0.2671). La expresión de AQP2 por Western Blot (unidades arbitrarias, normalizadas contra β -tubulina) disminuyó en 1K-1C (0.6221 ± 0.06962)* vs 2K-NC (1.000 ± 0.0) y vs 1K-NC (0.8925 ± 0.3334). Estos resultados se correlacionan con un mayor volumen urinario en 1K-1C vs 2K-NC. No hubo diferencias con respecto a 1K-NC. La excreción de Na disminuyó en 1K-1C vs 2K-NC. No hubo diferencias en el clearance de creatinina, la proteinuria, el Na y el K plasmático. La disminución de la expresión de AQP2 en este modelo de HA podría ser un mecanismo compensatorio como consecuencia de la elevación de la PAS.

678. (121) COMPARACIÓN DEL DESARROLLO DE CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE CÉLULAS EPITELIALES TUBULARES DE RIÑÓN HUMANO Y TÚBULOS MICRO-DISECADOS DE RIÑÓN DE RATA

Marquez, L.¹; Di Ciano, L.²; Ibarra, F.¹²; Silberstein, C.¹
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA¹
Laboratorio Riñón Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, UBA²

La capacidad de recuperar la función renal luego de un daño depende de la habilidad de los túbulos renales de regenerarse. Con el fin de estudiar la proliferación y regeneración tubular, previamente desarrollamos cultivos primarios y tridimensionales (3D) de células epiteliales tubulares de corteza renal humana (CERH). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la tubulogénesis de cultivos 3D de CERH y comparar los resultados con los de cultivos 3D de túbulos proximales de riñón de rata. Los cultivos primarios de CERH se obtuvieron a partir de fragmentos renales de pacientes sometidos a nefrectomías en el Hospital Nacional Prof. A. Posadas. Por otro lado, se microdisecaron túbulos proximales a partir de riñones de ratas Wistar. Para obtener cultivos 3D, las CERH y los túbulos renales de rata fueron sembrados en una matriz extracelular (matrigel), en presencia o no del factor de crecimiento endotelial. Las CERH sembradas en matrigel presentaron cambios morfológicos con elongación celular seguida de migración celular. Posteriormente, se formaron agregados celulares que dieron lugar a estructuras tubulares (tubulogénesis). En ausencia del factor de crecimiento endotelial las CERH migraron, se agregaron, pero no se observó o se redujo la tubulogénesis. Las estructuras tubulares formadas por las CERH 3D presentaron morfología y tamaño similares a los cultivos 3D de túbulos proximales microdisecados de riñón de rata. Ambos cultivos se mantuvieron morfológicamente hasta 2 semanas y expresaron la acuaporina 1, como en las células de los tejidos originales. Las células epiteliales renales de la línea celular Vero, también migraron en matrigel pero no desarrollaron tubulogénesis ni aún en presencia de factores de crecimiento. Los cultivos 3D de CERH y túbulos renales de rata pueden utilizarse como modelos *in vitro* para estudiar mecanismos de proliferación y regeneración tubular renal.

679. 181) CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA TOXINA SUBTILASA ASOCIADA AL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

Seyahian, A.¹; Oltra, G.¹; Ochoa, F.¹; Melendi, S.¹; Araoz, A.¹; Nacher, S.²; Bellusci, A.²; Hermes, R.²; Ibarra, C.¹; Lago, N.³; Zotta, E.¹
Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA¹ División Laboratorio Central, Hospital Juan A Fernández² Centro de Patología Experimental y Aplicada, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA³

Introducción: En Argentina, el SUH es la primera causa de falla renal aguda en niños inducido por *E. coli* O157:H7, productor de toxina Shiga tipo 2 (Stx2). Recientemente se ha informado que otros serotipos como O113:H21, producen además la citotoxina subtilasa (SubAB) de la que aún no se conocen sus efectos. El **objetivo** de este trabajo fue determinar los efectos sistémicos de SubAB independientemente de los efectos de Stx2. **Métodos:** Ratas machos, Sprague Dawley de 200 gramos fueron inoculadas por vía intraperitoneal con 15 ug de SubAB, (cepa 98NK2, aislada

de pacientes con SUH, provista por el Dr.J.Paton Universidad de Adelaida, Australia). El grupo control se inoculó con el mismo volumen de solución salina. Se realizaron estudios inmunohistoquímicos, funcionales y moleculares a 48 horas y 20 días en diferentes órganos. **Resultados:** Macroscópicamente se observó a los 20 días el desarrollo de ascitis y derrame pericárdico de aspecto quiloso de muy rápida coagulación, hipertrofia concéntrica cardíaca, y congestión visceral generalizada. Se detectaron alteraciones en el hepatograma, desarrollo de proteinuria y se evaluó los constituyentes del líquido ascítico. Detectamos la presencia de la toxina en túbulos distales y asas de Henle renales, neumonocitos y sector superficial del epitelio intestinal. Histológicamente el efecto de la toxina se caracterizó por el desarrollo de extensas áreas de necrosis tubular, acinar pancreática y cardíaca. A nivel hepático se destacó la presencia de vacuolas grasas en los hepatocitos, así como también en túbulos proximales renales. A nivel glomerular se detectaron depósitos de inmunocomplejos. En colon se observó marcado infiltrado mononuclear. En cerebro destacó la presencia de marcada congestión vascular y edema subcortical, perivascular y perineuronal. **Conclusión:** SubAB desarrolla un cuadro clínico e histopatológico con un patrón de expresión diferente a Stx2

680. (187) SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: ESTUDIO EN UN MODELO EN RATA DE LA PROGRESIÓN DE LA LESIÓN RENAL A LA CRONICIDAD

Ochoa, F.¹; Melendi, S.¹; Oltra, G.¹; Seyahian, A.¹; Araoz, A.¹; Ibarra, C.¹; Lago, N.²; Zotta, E.¹
Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA¹ Centro de Patología Experimental y Aplicada, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA²

Introducción: En la Argentina, el SUH constituye la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en los niños. El 30% puede presentar secuelas renales con evolución a la cronicidad. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la evolución a la cronicidad, en un modelo experimental de SUH en ratas. **Métodos:** Ratas Sprague-Dawley (150-200 g) fueron inyectadas por vía intraperitoneal. El grupo experimental se inoculó con 0.25 mL de sobrenadante de cultivo bacteriano de *E-coli* recombinante que expresa Stx2 (sStx2) cada 200 g de peso (1, 6 ng/g, dosis subletal). El grupo control recibió el mismo volumen de solución salina. Se realizaron estudios funcionales, histológicos, e inmunohistoquímicos a diferentes tiempos luego de la inoculación (1 semana y 3 meses). **Resultados:** Los estudios funcionales mostraron una disminución del filtrado glomerular a la semana e hiperfiltración a los tres meses. A este tiempo, los animales presentaron microalbuminuria, proteinuria, e histológicamente una glomerulosclerosis focal y segmentaria (GEFS) y desarrollo de fibrosis túbulo intersticial. Por inmunohistoquímica observamos un aumento de la expresión de TGF- β 1 en corteza a la semana y en médula a los 3 meses. El FSP1 (proteína específica de fibroblastos) solo se expresó a la semana en corteza y en medula recién a los tres meses. La Angiotensina II presentó un aumento en túbulos corticales a la semana y periglomerular a los tres meses con respecto al grupo control. **Conclusión:** Nuestros resultados indican que la respuesta tubular a los efectos de sStx2 en el tiempo, se relaciona con una transformación epitelio mesenquimática de las células tubulares con desarrollo fibrosis intersticial y GEFS, secundarios a los efectos de angiotensina II y TGF beta a nivel renal

681. (234) LA GSTP1, UN GEN BLANCO DE LA IRA POR DEFICIENCIA DE COLINA

Ossani, G.¹; Uceda, A.¹; Rugnone, M.²; Fernández, E.³; Fresno, C.³; González, G.³; Daz, M.⁴; Avagnina, A.⁵; Elsner, B.⁵; Monserrat, A.¹; Denninghoff, V.¹⁵
CPEA, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA¹ Fundación Instituto Leloir, IIB, CONICET² Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de Córdoba³ Medicina Nuclear, Hospital Británico⁴ CEMIC⁵

Introducción: Ratas macho recién destetadas alimentadas con una dieta colina-deficiente (CD) con aceites vegetales (AV) como

lípidos desarrollan injuria renal aguda que se previene con el agregado de aceite de pescado (AP). **Objetivo:** Investigar el potencial efecto protector del AP sobre la base del transcriptoma renal en este modelo experimental nutricional. **Diseño del estudio:** La exploración funcional de los conjuntos de genes diferenciales se realizó mediante *Multi-Reference Contrast Method* (MRCM), utilizando la plataforma *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* para el cálculo de enriquecimiento de términos biológicos. El análisis se realizó sobre *Gene Ontology*, que estructura el conocimiento en tres grafos dirigidos acíclicos (DAGs). Se dosaron ácido fólico, vitamina B12 y homocisteína en plasma. **Resultados:** Utilizando el MRCM para la comparación colina-suplementada (CSAV) vs. CSAP no se identificaron términos/nodos enriquecidos dada la cantidad reducida de genes involucrados. Esto estaría indicando similitud funcional entre ambas dietas. Debido a esta observación profundizamos la exploración sobre estos escasos genes involucrados, donde la *Gstp1* parecería ser un interesante blanco molecular. En CSAV la *Gstp1* tiene valores bajos, aumenta en dieta CD y sorprendentemente aumenta más en presencia de AP aun con o sin colina en la dieta. En CDAV se observó un marcado aumento de vitamina B12 en plasma, atribuible a la liberación desde el riñón necrosado. **Conclusiones:** El análisis de la expresión génica confirmó que el AP tiene un efecto protector sobre este modelo experimental nutricional. El glutatión es antioxidante. En la CD el estrés oxidativo y la lipoperoxidación renal preceden a la necrosis. La *Gstp1* podría considerarse un gen blanco de la terapia génica de la IRA ya que una *up-regulation* del gen podría contribuir a proteger el riñón del daño renal inducido por el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica.

682. (263) PERFIL LIPÍDICO EN LA IRA POR DEFICIENCIA DE COLINA

Ossani, G.¹; Uceda, A.¹; Díaz, M.²; Denninghoff, V.¹; Uicich, R.³; Monserrat, A.¹
CPEA. Depto Patología. Facultad de Medicina. UBA¹ Medicina Nuclear. Htal. Británico² Laboratorio de Nutrición. Htal. Garrahan³

INTRODUCCION: Ratas macho recién destetadas alimentadas con una dieta colina-deficiente (CD) con aceites vegetales (AV) como lípidos desarrollan IRA que se previene con el reemplazo de los lípidos por aceite de pescado (AP). **OBJETIVO:** Investigar el rol protector del AP a través de los cambios del perfil lipídico en ratas alimentadas con AV o AP como lípidos. **DISEÑO DEL ESTUDIO:** Las ratas fueron divididas en 4 grupos: CDAV, colina suplementada (CS) AV, CDAP y CSAP. Fueron sacrificadas a los 7 días de recibida la dieta. El riñón izquierdo se preservó para histopatología y el derecho para perfil lipídico. Se determinó homocisteína, folatos y vitamina B₁₂ en plasma. Los datos de los diferentes lípidos y sustancias dosadas en plasma se compararon con el test de Kruskal-Wallis y el análisis posterior entre los grupos mediante el test de Mann-Whitney. **RESULTADOS:** La media del peso de los riñones de las ratas CDAV fue 0,56 g mientras que la de los otros tres grupos fue 0,33 (CSAV); 0,34 (CDAP); 0,31 (CSAP). En el análisis histopatológico de los riñones se observó necrosis tubular o cortical en ratas CDAV, mientras que en los otros grupos no se observaron alteraciones evidentes. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre varios lípidos entre los grupos. El ácido mirístico, el docosahexaenoico y el eicosapentaenoico están más altos ($p < 0,05$) en ratas CDAP con respecto a las ratas CDAV y CSAV. Los ácidos dihomogamma-linoléico, oleico y linoleico son más bajos ($p < 0,05$) en ratas CDAP con respecto a las ratas CDAV y CSAV. La vitamina B12 esta más alta en las ratas del grupo CDAV. **CONCLUSIONES:** Los resultados muestran profundas modificaciones en el perfil lipídico en ratas alimentadas con AV o AP. El AP podría ejercer su efecto protector a través de cambios en la respuesta de las membranas celulares frente a la injuria, o modificando la generación de diferentes eicosanoides, favoreciendo la relación entre vasodilatadores y vasoconstrictores.

683. (284) EFECTOS RENALES DE UNA NUEVA TOXINA ASOCIADA AL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

Ultra, G.¹; Seyahian, A.¹; Ochoa, F.¹; Melendi, S.¹; Araoz, A.¹; Nacher, S.²; Bellusci, A.²; Ibarra, C.¹; Lago, N.³; Zotta, E.¹
Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA¹ División Laboratorio Central. Hospital Juan A Fernández² Centro de Patología Experimental y Aplicada. Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA³

Introducción: En Argentina, el SUH es la primera causa de falla renal aguda en niños inducido por *E. coli* O157:H7, productor de toxina Shiga tipo 2 (Stx2). Recientemente se ha informado que otros serotipos como O113:H21, producen además la citotoxina subtilasa (SubAB) de la que aún no se conocen sus efectos. El **objetivo** de este trabajo fue determinar los efectos renales de SubAB independientemente de los efectos de Stx2. **Métodos:** Ratas machos, Sprague Dawley de 200 gramos fueron inoculadas por vía intraperitoneal con 15ug de SubAB, proveniente de la cepa 98NK2, aislada de pacientes con SUH, provista por el Dr.J.Paton (Universidad de Adelaida, Australia). El grupo control se inoculó con solución salina. Se realizaron estudios funcionales, histológicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular en ambos grupos a 48 horas y 20 días. **Resultados:** Los animales presentaron proteinuria, alteración en el manejo renal del sodio sin modificación del filtrado glomerular. La histología demostró necrosis tubular a 48 horas, fibrosis glomerular segmentaria y depósitos de inmunocomplejos en membrana basal, especialmente a los 20 días. Los túbulos renales mostraron marcación para SubAB preferentemente a nivel de túbulos distales y asas de Henle, que coincidió con la expresión de TGF beta-1. **Conclusión:** Nuestros resultados indican que la respuesta tubular a los efectos SubAB se relacionan con un aumento en la expresión de TGF beta 1, que podría estar involucrado en un cambio inmunofenotípico de las células tubulares como previamente describimos para Stx2¹, pero en sitios diferentes de la nefrona. Además el depósito de inmunocomplejos en membrana basal glomerular, estaría relacionado con la proteinuria detectada en estos animales a diferencia las ratas inoculadas con Stx2².

¹Am J Nephrol. 2032 (4):340-346 2010 ² Int J Nephrol and Renovasc Dis 5: 29-36. 2012

684. (367) TOLERANCIA A LA SAL DE RATAS ADULTAS TRATADAS CON BOSENTAN DURANTE EL PERÍODO POSTNATAL

Balanga, S.; Lavagna, A.; Filipuzzi, A.; Albertoni Borghese, M.; Ortiz, M.; Majowicz, M.
Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Endotelina (ET), un péptido que se expresa a nivel renal, modula la homeostasis de agua y sodio y participa además en la aparición y en el mantenimiento de las funciones del riñón durante el desarrollo postnatal. El objetivo del trabajo fue evaluar la función renal de ratas Sprague-Dawley machos (M) y hembras (H) de 60 días que habían sido 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. En particular se evaluó la tolerancia a la sal luego de someter los animales a una dieta hipersódica (HS; 8% ClNa) durante 8 días. Para ello, los animales se dividieron en 8 grupos: controles, M y H con dieta normal (CM[DN]; CH[DN] respectivamente); controles M y H con dieta HS (CM[HS]; CH[HS]); M y H tratados con B con dieta normal (BM[DN]; BH[DN]); M y H tratados con B con dieta HS (BM[HS]; BH[HS]). Se midió el consumo diario de agua y alimento y la presión arterial sistólica (PAS) antes y después de la dieta. Se obtuvieron muestras de orina de jaulas metabólicas y muestras de sangre. Se usó ANOVA + Bonferroni para las comparaciones estadísticas; n=3. El consumo de alimento fue mayor en los M que en las H sometidas a los mismos tratamientos (*** $p < 0,001$), no varió entre los machos de los distintos grupos y fue mayor en BH[HS] que en BH[DN] (* $p < 0,05$). El consumo de agua aumentó en todos los grupos con dieta HS, siendo mayor en los M que en las H (*** $p < 0,001$). La proteinuria aumentó en los animales con dieta HS vs DN, tanto en M como H; siendo mayor en BM[HS]

que en CM[HS] (5.11 ± 0.41 vs 4.32 ± 0.25 mg/24hs/100g; * $p < 0.05$). Tanto la excreción de sodio como la diuresis tienden a disminuir en BM[HS] vs CM[HS]. La PAS aumentó sólo en BM[HS] luego de la dieta HS (130 ± 1 vs 111 ± 1 mmHg) vs la PAS basal; * $p < 0.05$. Los resultados sugieren que la inhibición de ET con B durante el período postnatal predispone a un aumento de la sensibilidad a la sal en los M, pudiendo llevar al desarrollo de hipertensión en la vida adulta.

685. (412) INTERACCIÓN ENTRE EL ENDOTELIO Y EPITELIO RENALES EN LA ACCIÓN DE TOXINA SHIGA-2 RESPONSABLE DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

Amaral, M.¹; Repetto, H.²; Zotta, E.¹; Ibarra, C.¹

Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA¹ Servicio de Pediatría. Hospital Nacional Alejandro Posadas.²

Las células epiteliales y endoteliales renales forman una red de interacciones compleja que coopera en la reabsorción de agua y solutos, secreción e inflamación por lo cual la modificación funcional del epitelio podría influir sobre el endotelio y viceversa. La toxina Shiga (Stx) produce edema de las células endoteliales glomerulares, desprendimiento de la membrana basal y subsecuente microangiopatía trombótica. En este trabajo estudiamos la acción de Stx2 en mono-cultivo primario de endotelio glomerular humano (HGEC) y de la línea celular HK-2 (ATCC) y co-cultivos de HGEC/HK-2. Las células se crecieron sobre una cara (monocapa) o ambas caras (bicapa) del soporte permeable. La formación de la mono y bicapa se evaluó por microscopía óptica y la integridad de la barrera epitelio y/o endotelio por la resistencia eléctrica transcelular. La funcionalidad se analizó como absorción de agua (Jw) a través de los mono-cultivos HGEC y HK2 y de co-cultivos HGEC/HK-2 montados en una cámara de Ussing conectada a un dispositivo electro-óptico. La viabilidad celular de los cultivos tratados o no con Stx2 (1ng/ml) durante 72 hs se analizó por incorporación de rojo neutro. Los mono-cultivos HK-2 y los co-cultivos HGEC/HK-2 presentaron un Jw sensible a la acción de 1ng/ml de Stx2 mientras que los mono-cultivos de HGEC no mostraron cambios del Jw. La inhibición del Jw puede estar relacionada con alteraciones en la viabilidad celular ya que Stx2 redujo significativamente la viabilidad de HGEC/HK-2 ($68 \pm 2,6\%$ $p < 0,05$ $n=4$) como consecuencia de una inhibición de la viabilidad de las HGEC y HK-2 ($67,0 \pm 0,7\%$ y $73,7\% \pm 2,0$ respectivamente $p < 0,05$ $n=4$). El hecho de que los cambios en la viabilidad por Stx2 no inhiban el Jw de HGEC evidenciaría la diferencia en los mecanismos de transporte de agua entre el epitelio y el endotelio renal. Estos resultados indican que la interacción epitelio-endotelio es un modelo fisiológicamente aceptable para estudiar la acción de Stx2 en el riñón.

686. (453) ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE LA MAP QUINASA FOSFATASA-1 (MKP-1) Y DEL MARCADOR DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO GRP78 EN CÉLULAS DE TÚBULO PROXIMAL RENAL DE ZARIGÜEYA (OK) EXPUESTAS A ALBÚMINA

Gorostizaga, A.¹; Gmez, N.¹; Acquier, A.¹²; Mori Sequeiros Garca, M.¹; Bekier, F.¹; Mndez, C.¹²; Paz, C.¹

INBIOMED¹ Cátedra de Farmacología. Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires.²

La sobrecarga de albúmina produce estrés de retículo endoplásmico (ER) y desencadena la activación de las MAPK quinastas (MAPKs) ERK1/2, JNK y p38. Las MAPK fosfatasas (MKPs) son enzimas que inactivan a las MAPKs e inducibles por los mismos estímulos que activan las MAPKs. MKP-1 se localiza mayormente en el núcleo y desfosforila a todas las MAPKs. Previamente describimos que en células de túbulo proximal renal de zarigüeya (OK), la exposición a albúmina sérica bovina (BSA) incrementa transitoriamente los niveles de ERK1/2 fosforilada y de MKP-1. Nuestro objetivo fue avanzar en la caracterización molecular y funcional de MKP-1 en células OK expuestas a BSA (20 mg/ml). Dado que no se conoce la secuencia del genoma de zarigüeya (*Didelphis virginiana*), utilizamos la secuencia de MKP-1 de una

especie altamente emparentada (*Monodelphis sp*) para el diseño de oligonucleótidos que se usaron en ensayos de RT-PCR usando como templado ARN de células OK. El fragmento de ADNc aislado resultó ser 98% homólogo a MKP-1 de *Monodelphis sp*. En base a esta secuencia se diseñaron oligonucleótidos para evaluar el efecto de la BSA sobre los niveles del ARNm de MKP-1, por RT-PCR semicuantitativa. La BSA incrementó en forma transitoria los niveles del ARNm (2 veces vs. control luego de 1h). Dado que ActD bloqueó este efecto, se deduce que la BSA activa la transcripción de MKP-1. Este efecto contribuiría al aumento de MKP-1 previamente detectado por Western blot, y particularmente en el núcleo como demostramos aquí por inmunocitoquímica. La BSA aumentó el ARNm correspondiente a GRP78, proteína marcadora de ER y un inhibidor de la activación de ERK1/2 (PD98059, 50 μ M) evitó este efecto. En conjunto nuestros datos indican que MKP-1 es inducida por BSA no solo a nivel post-traducciona como ya demostramos, sino también a nivel transcripcional, y sugieren que podría contribuir al "apagado" de aquellos eventos dependientes de ERK1/2 que son disparados por BSA, como la inducción de GRP78.

687. (595) EFECTO DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 EN LA LÍNEA CELULAR HK-2, MODELO DE EPITELIO TUBULAR PROXIMAL RENAL HUMANO. ACCIÓN DE UN INHIBIDOR DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA

Rivera, F.; Amaral, M.; Zotta, E.; Ibarra, C.

Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

La forma típica de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) asociada a *E. coli* productor de toxina Shiga tipo 2 (Stx2) constituye la principal causa pediátrica de insuficiencia renal aguda en Argentina. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de Stx2 en la línea celular HK-2, modelo de túbulo proximal renal humano; y el uso del Miglustat (MG, Zavesca), inhibidor de la glucosilceramida sintasa que cataliza la primera etapa de la síntesis del receptor globotriaosilceramida (Gb3) de Stx2 como estrategia de intervención. La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de incorporación de rojo neutro en HK-2 incubada con 0.001 a 100 ng/ml de Stx2 durante 24-72 hs. Asimismo, se evaluó el efecto citotóxico de Stx2 (10 ng/ml) a 72 hs en HK-2 previamente incubada por 24 y 48 hs con distintas concentraciones de MG (50 a 500 μ M). La morfología celular de HK-2 en presencia de 500 μ M de MG durante 48 hs y 10 ng/ml de Stx2 por 72 hs se evaluó por microscopía óptica luego de la tinción con hematoxilina eosina. Los resultados muestran que Stx2 produjo una inhibición de la viabilidad de HK-2 de manera dosis y tiempo dependiente. La DC_{50} fue de 10 ng/ml de Stx2 y causó una inhibición de $52,2 \pm 1,4\%$ ($n=3$) a las 72 hs de incubación. Esta inhibición fue significativamente menor ($p < 0,01$, $n=3$) cuando HK-2 fue previamente incubada con 500 μ M MG por 24 hs ($40,2 \pm 1,5\%$) y por 48 hs ($18,9 \pm 1,9\%$). El MG no afectó la viabilidad de HK-2 en las distintas concentraciones ensayadas ($98,4 \pm 1,8\%$, 500 μ M MG). Por otra parte, las alteraciones de la morfología celular causada por Stx2 fueron menores en presencia de MG. Nuestros resultados muestran que Stx2 tiene un efecto citotóxico en la línea celular HK-2 dependiente del receptor Gb3 y que MG fue capaz de neutralizar parcialmente los efectos citotóxicos de Stx2.

688. (614) ESTRUCTURA Y FUNCIÓN RENAL EN RATAS TRATADAS CON BOSENTAN DURANTE EL PERÍODO POSTNATAL

Ortiz, M.; Filipuzzi, A.; Lavagna, A.; Balonga, S.; Albertoni Borghese, M.; Majowicz, M.

Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Endotelina (ET) regula el tono vascular, la excreción renal de sodio y agua, el crecimiento, la proliferación celular, la acumulación de matriz extracelular y participa en la aparición y el mantenimiento de las funciones del riñón durante el desarrollo perinatal. El objetivo fue evaluar si la inhibición de ET en el período postnatal afecta la estructura y la función renal. Para ello se usaron ratas Sprague Dawley machos

(Ma) y hembras (He) de 21 días, 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 estudió la estructura renal mediante cortes teñidos con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para detectar la expresión de α -actina (α -SMA), medida como área inmunoreactiva. Se midieron parámetros de función renal. Se usó ANOVA + Tukey para la estadística; $n=4$. La estructura renal no se modificó ni en Ma ni en He tratadas con B (MaB; HeB) al analizar la estructura histológica respecto de sus controles. Sin embargo, el tratamiento con B modificó la expresión de α -SMA tanto en Ma como en He en corteza (Co), médula (M) y papila (P). En Co: la expresión de α -SMA disminuyó en HeB vs su C (12630 \pm 3042 vs 25639 \pm 3410)* y vs MaB (28275 \pm 2133)*. En Me: la expresión de α -SMA disminuyó en HeB vs su C (73354 \pm 6778 vs 180328 \pm 22806)** y en Ma B vs su C (49479 \pm 5672 vs 70479 \pm 6087)*. En P: la expresión de α -SMA disminuyó en HeB vs su C (48815 \pm 8763 vs 101296 \pm 6749)*** y aumentó en MaB vs su C (119682 \pm 14838 vs 27251 \pm 5028)***; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.01$. El clearance de creatinina no se modificó significativamente en ninguno de los grupos; la diuresis aumentó en HeB vs su C (5.1 \pm 0.5 vs 3.1 \pm 0.3 ml/24 hs/100g)* y mostró una tendencia al aumento en MaB; la natriuresis aumentó en HeB vs su C (0.73 \pm 0.13 vs 0.37 \pm 0.04 meq/24 hs/100g)*. La inhibición del sistema de ET durante el período postnatal modifica la expresión de α -SMA y algunos parámetros de función renal, siendo estos efectos más notorios en las He que en los Ma.

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

689. (29) MODULACIÓN DEL GLUTATIÓN FRENTE AL INCREMENTO DE ANIÓN SUPERÓXIDO INTRACELULAR Y SU ROL EN LA RESISTENCIA AL ARSÉNICO 3+ EN LÍNEAS MIELOIDES Y LINFÓIDES

Lombardo, T.^{1,2}, Cavaliere, V.², Papademetrio, D.², Costantino, S.², Anaya, L.¹, Alvarez, L.², Blanco, G.¹
LAITO-IDEHU-CONICET-FFYB-H. de Clínicas Jose de San Martín¹ IDEHU-CONICET-FFYB-UBA²

El Arsénico 3+ (TOA) ejerce citotoxicidad mediante la generación de especies reactivas del Oxígeno (EROs), siendo el anión superóxido (O_2^-) una de las más relevantes. El glutatión (GSH) neutraliza las EROs actuando como antioxidante. Las líneas Raji (linfoma de Burkitt) y U937 (leucemia promonocítica) son resistentes a TOA. Previamente demostramos en ensayos de citotoxicidad a 72hs, que TOA combinado con MG-132 (inhibidor del proteasoma) presenta sinergismo en la línea U937 y revierte la resistencia, pero en Raji presenta antagonismo. Nos propusimos estudiar las variaciones de O_2^- y GSH intracelular inducidas por TOA y TOA+MG-132 a 6 y 24 horas, hipotetizando que el aumento del O_2^- y la reducción del GSH serían los determinantes del sinergismo. Para esto, evaluamos los niveles de O_2^- y GSH por citometría de flujo con Hidroetidina (HE) y 5-clorometil-fluoresceína (5-CMF) respectivamente. Resultados: TOA: incrementó los niveles de O_2^- a 6 y 24hs ($p<0.05$ y $p<0.01$) respectivamente en ambas líneas. El GSH en U937 se redujo significativamente a las 6 hs ($p<0.05$) para luego aumentar a las 24hs ($p<0.01$). En la línea Raji se registró una disminución de GSH en ambos tiempos ($p<0.01$). TOA+MG-132: Solo se registró un aumento significativo de O_2^- en la línea U937 a 24hs de tratamiento ($p<0.05$) sin observarse cambios en los demás casos. En U937 se observó una disminución de GSH a las 6hs ($p<0.01$). En Raji los niveles de GSH se redujeron a 6 y 24 hs ($p<0.01$). Concluimos que un posible mecanismo de resistencia a TOA en U937 sería aumentar el GSH en respuesta al incremento de O_2^- inducido por TOA y que la disminución de GSH generada por combinación con MG132 en esta línea, aumentaría su sensibilidad al TOA. Asimismo, un aumento del O_2^- y una disminución del GSH no implican una mayor sensibilidad al TOA en cualquier tipo celular, sino que la respuesta variará según la capacidad de cada célula de modular sus niveles de GSH frente al aumento de O_2^- .

690. (79) LIGANDOS DE CD44 BLOQUEAN LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA Y SENSIBILIZAN A LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR GEMCITABINA EN TUMORES DE PÁNCREAS

Simunovich, T., Papademetrio, D., Lomparda, S., Costantino, S., Lombardo, T., Cavaliere, V., Alvarez, L.
Cátedra de Inmunología - FFyB - UBA

Los tumores de páncreas son altamente agresivos y resistentes a la quimioterapia. La gemcitabina (Gem), actual agente terapéutico, no logra incrementar la sobrevida. CD44 es el principal receptor del ácido hialurónico (AH), componente mayoritario de la matriz extracelular, y de sus productos de degradación (oAH). En tumores sólidos se ha asociado la expresión de CD44 a un fenotipo agresivo con capacidad de progresión y metástasis. El objetivo fue evaluar la respuesta de la línea celular MIAPaCa-2 a los efectos de AH y oAH en relación con sobrevida celular, inducción de autofagia y sensibilización a la muerte inducida por Gem. Por CF se verificó la expresión basal de CD44 siendo de 75,9 \pm 3,1%. Por incorporación de 3H -T se evaluó la proliferación celular inducida por AH a 24 y 48h, encontrándose un incremento de 30 y 37% (300 μ g/ml) y 40 y 47% (500 μ g/ml) ($p<0,05$). Dicho efecto fue anulado por bloqueo con un mAb anti-CD44 ($p<0,01$). oAH no mostró efecto significativo sobre la proliferación. Por WB se encontró que el AH incrementó la relación pAkt/Akt y la expresión de ciclina D1 ($p<0,01$), mientras oAH generó disminución en ambos casos ($p<0,05$). AH y oAH inhibieron la autofagia, observándose una disminución de LC3-II ($p<0,01$) y de la relación Beclin/Bcl-xl ($p<0,05$). Estos resultados se correlacionaron con las imágenes post transfección con RFP-LC3. Dado que los ligandos de CD44 inhiben la autofagia, se decidió evaluar si al combinarlos con Gem se sensibilizaba la muerte celular. Se evaluó por CF la inducción de muerte (FDA/IP) a 48 y 72 h; MIAPaCa-2 al ser tratada con Gem 1000 μ g/ml presentó 31 y 44% de muerte (IP+) ($p<0,001$). El pretratamiento de las células con AH 300 μ g/ml, mostró un 50 y 58% de muerte respectivamente ($p<0,01$) y con oAH 300 μ g/ml, 50 y 64% ($p<0,01$). Resultados similares se obtuvieron por la técnica de TUNEL. Se concluye que la inhibición de la autofagia por HA o por oHA sensibiliza a las células a la acción citotóxica de la Gem.

691. (97) ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS FRENTE AL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DEL CICLO CELULAR

Videla Richardson, G., Bluguermann, C., Questa, M., Romorini, L., Sevlever, G., Scassa, M., Miriuka, S.
FLENI

Las células madre embrionarias humanas (CMEH) se definen por dos características fundamentales: auto renovación y pluripotencia. Las CMEH, presentan un ciclo celular particular donde la fase G1 se encuentra abreviada y el punto de restricción ausente. Células somáticas que han sido reprogramadas (iPs) exhiben también estas particularidades, sugiriendo que esta estructura del ciclo celular es necesaria para el mantenimiento de la auto-renovación y de la pluripotencia. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de inhibidores del ciclo celular frecuentemente usados para arrestar células somáticas en las fases S o G2/M, en la línea de CMEH WA-09 con el propósito de establecer una metodología que facilite el aislamiento de subpoblaciones celulares específicas de cada fase. Para ello, utilizamos nocodazol y timidina. Mediante ensayos de citometría de flujo determinamos que el nocodazol es efectivo para lograr el arresto de las CMEH en G2/M. Sin embargo, el número de células viables decreció significativamente conforme se aumentó la concentración del inhibidor (desde 50ng/ml hasta 500ng/ml), a juzgar por la observación microscópica y ensayos de viabilidad celular (XTT). El tratamiento con exceso de timidina conlleva a una disminución en la síntesis de ADN y ensayos de citometría de flujo realizados a distintos tiempos con timidina (5mM y 10mM) revelaron un aumento en la población de células atravesando las fases G1 y S temprana, que si bien resultó dosis dependiente, no permitió una sincronización eficiente. La presencia de timidina no produjo alteraciones morfológicas ni de viabilidad en las CMEH, a las dosis y tiempos ensayados. Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo que ocurre con distintas células somáticas, el tratamiento con nocodazol no es apto para realizar ensayos de

sincronización y posterior liberación en CMEH debido a su alta citotoxicidad y que el bloqueo con timidina no permite obtener una sincronización efectiva.

692. 260) MITOCONDRIA: UNA RUTA COMÚN EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR MANGANESO EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE GLIOMA

Miglietta, E.¹, Alaimo, A.¹, Gorojod, R.¹, Villarreal, A.², Ramos, A.², Kotler, M.¹

Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso / Nano-Oncología. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQUIBICEN-CONICET¹ Laboratorio de Neuropatología Molecular, IBCN, UBA-CONICET. Facultad de Medicina, UBA²

La exposición crónica a manganeso (Mn) genera un síndrome denominado Manganismo que posee características neurodegenerativas similares al Parkinson Idiopático. Esta patología se origina en parte, por acumulación del Mn en las mitocondrias de las células gliales de los ganglios basales. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar los mecanismos de muerte celular inducidos por Mn en la línea Gli36 de glioma humano y compararlos con los ya descritos para la línea C6 de glioma de rata. La caracterización mediante inmunocitoquímica de las células Gli36 mostró expresión de los marcadores astrocitarios S-100B y GFAP. El tratamiento con MnCl₂ 350µM durante 24hs redujo la viabilidad celular en un 23% (p<0,01; MTT) y 38% (p<0,01; Neutral Red). El análisis mediante microscopía de contraste de fase mostró reducción del volumen celular, acortamiento de los procesos y burbujeo de la membrana plasmática, eventos que sugieren la ocurrencia de apoptosis. Este proceso de muerte fue confirmado por un aumento del 475% en la actividad de las caspasas ejecutoras 3/7 y del 87% (p<0,05) en el clivaje de su sustrato PARP-1 medido por WB. La pre-incubación con el inhibidor de caspasa 9 (Ac-LEHD-CMK 10µM, 1h) previno totalmente la muerte celular (p<0,01) mientras que mediante WB se detectó un aumento del 223% en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax. A su vez, el aumento en los niveles de expresión de la proteína de fisión mitocondrial Drp-1 (282%) y la disminución de los de la proteína de fusión Opa-1 (63%) indican un desbalance en la dinámica mitocondrial hacia la fisión, en concordancia con lo reportado previamente en nuestro laboratorio, en células C6. En conclusión, estos resultados sugieren la participación de la vía mitocondrial en la cascada de señalización apoptótica y la probable desregulación de la dinámica mitocondrial. La comparación con nuestros antecedentes previos en células C6 indica que las Gli36 son más susceptibles al daño citotóxico.

693. (369) EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Klf4 EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIA EPITELIAL

Alvarez, R., Abrigo, M., Bal De Kier Joffé, E. Raimondi, A. *Instituto de Oncología Ángel H. Roffo*

El factor de transcripción Klf4 se expresa en células epiteliales de la piel, la lengua, el esófago y el colon donde ejerce un rol crítico en el control de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Su expresión está ausente en cáncer de estómago y esófago entre otros. Previamente hemos estudiado el efecto de la ablación de Klf4 luego de la activación de K-Ras en la carcinogénesis bucal en ratones transgénicos, donde Klf4 ejercería un rol supresor de tumor. **Objetivo:** analizar el efecto del silenciamiento de Klf4 sobre la proliferación celular y la expresión de distintos reguladores del ciclo celular, en líneas celulares de estirpe epitelial normal y de cáncer oral. Para ello evaluamos el silenciamiento de Klf4 en las líneas celulares HEK293, HaCaT, HN12 y 13, utilizando distintos siRNA a distintas concentraciones (5, 10, 25, 50nM). Las líneas HEK293 y HaCaT presentaron un silenciamiento significativo respecto de las mismas células transfectadas con un control scramble. Las células HaCaT revelaron un silenciamiento mayor al 50% con 2 siRNA independientes, a partir de allí se trabajó con las células HaCaT con una reducción de la expresión proteica

de Klf4 del 90% (72hs) (Klf4/actina: 0.42 y 0.09 a 48 y 72hs). Estas células no presentaron cambios morfológicos respecto de sus controles sin silenciamiento. Se evaluó la proliferación celular mediante recuento celular, a las 24, 48 y 72hs post-transfección, no encontrando diferencia significativa entre las células con Klf4 silenciado respecto de las células sin tratar y el control scramble (ANOVA, tratamiento p=0.6). En esta misma línea determinamos la expresión de p21, inhibidor del ciclo celular inducido por Klf4 para producir arresto en G1, encontrando una disminución del 32% por western blot, no observando expresión proteica de CCDN1. Al analizar la expresión de KLF5 encontramos incremento de su expresión (siRNA 50nM). No se observó expresión de Bax y se evidenció expresión de p53 anómala. Concluimos que los queratinocitos normales inmortalizados, HaCaT, no presentaron cambios en su patrón de proliferación celular ante el silenciamiento de Klf4, aunque disminuyó la expresión de p21 y aumento la de KLF5. Se podría especular que la función anómala de p53 mutado independiza la regulación del ciclo celular del efecto que ejercería Klf4 y p21 sobre el mismo en células HaCaT.

694. (433) EL TRATAMIENTO CON TIROXINA (T4) REGULA EL CICLO CELULAR DEL LINFOMA T EL-4, MODIFICANDO EL BALANCE ENTRE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS

Sterle, H.¹, Paulazo, M.¹, Valli, E.¹, Cremaschi, G.¹², Barreiro Arcos, M.¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas - UCA¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA²

Es sabido que las hormonas tiroideas (HTs) ejercen acciones en el desarrollo, crecimiento y diferenciación celular. En trabajos previos hemos observado que el tratamiento con T4 induce un incremento en la proliferación de células del linfoma T murino EL-4. El objetivo de este trabajo fue analizar si este efecto está mediado por la regulación del ciclo celular. Para ello, analizamos, por qRT-PCR, la expresión de ciclinas, inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs) y genes supresores tumorales en las células EL-4 mantenidas en cultivo con T4 (1x10⁷M). Encontramos que el tratamiento por 12hs con T4 induce un incremento en la expresión de la ciclina D2 (p<0,001) y que el cultivo con la hormona por 24hs lleva además al aumento de las ciclinas A2 (p<0,01) y B1 (p<0,05), indicando que las HT son capaces de activar el ciclo celular. Encontramos además que esto fue acompañado del incremento significativo de los CDKIs p16, p21 y p27 (p<0,05) y de los genes supresores tumorales p53, Rb y PTEN (p<0,05). Dado que esto podría estar funcionando como un mecanismo control para contrarrestar la aceleración de la división celular, pero a su vez podría conducir a la apoptosis, analizamos la acción de T4 sobre las células de linfoma luego de 3, 5, 7 y 15 días de cultivo. Evidenciamos un aumento en el número de células apoptóticas a partir del día 5 de cultivo con T4 (1x10⁷M) por tinción con Hoechst 33342 y marcación con Anexina V-FITC/IP (p<0,05). También encontramos un incremento en la expresión genómica de la proteína pro-apoptótica Bax (p<0,05). Estos resultados indican que el tratamiento con HTs activa el ciclo celular, llevando a la proliferación de las células de linfoma T, activando a su vez genes involucrados en el control de dicho ciclo y conduciría a tiempos más largos a la apoptosis celular.

695. (443) PROPIEDADES CITOTÓXICAS DE PROSOPIS STROMBULIFERA SOBRE LA LÍNEA CELULAR HCT116 DE CÁNCER COLORRECTAL HUMANO

Hapon, M.¹, Hapon, M.², Oberti, R.³, Jahn, G.⁴, Pizzuolo, P.⁵, Gamarra Luques, C.⁶

ICB-UNCuyo/IMBECU-CCT MENDOZA-CONICET¹ ICB-UNCuyo/FCAgrarias-UNCuyo/IBAM-CCT Mendoza-CO-NICET² FCMédicas-UNCuyo³ IMBECU-CCT Mendoza-CONICET⁴ FCAgrarias-UNCuyo⁵ FCMédicas-UNCuyo/IHEM-CCT Mendoza-CONICET⁶

Prosopis strombulifera (PS), vulgarmente conocida como "retortuño", es una planta autóctona de Mendoza. Popularmente, se conoce por sus efectos antiinflamatorios, analgésicos y diuréticos; recientemente, se han descrito científicamente sus

propiedades antinociceptivas *in vivo*; así como su capacidad *in vitro* de inhibir la producción de NO. El objetivo del presente trabajo es describir la capacidad de extractos acuosos de *PS* de afectar la proliferación y viabilidad de la línea celular de cáncer colorrectal humano, HCT116. Los efectos fueron evaluados mediante el uso de extractos acuosos de hojas de *PS in vitro*. A las 48 hs de tratamiento, se determinó que $2,25 \pm 0,11 \mu\text{l/ml}$ (extracto acuoso/medio de cultivo) inhibe la proliferación celular al 50% (IC_{50}), mientras que $5,04 \pm 0,09 \mu\text{l/ml}$ produce muerte en el 50% de las células (DL_{50}). El tiempo de duplicación en las células tratadas con la dosis IC_{50} resultó significativamente mayor respecto del grupo control (Co) no tratado ($\text{Co}=20\text{hs}$ vs $\text{IC}_{50}=58\text{hs}$, $p<0,001$), sin diferencias en la viabilidad. Cuando las células son tratadas con la DL_{50} , la determinación de lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo es significativamente mayor que en los Co ($p<0,05$), sugiriendo que necrosis es el mecanismo de muerte involucrado. Para determinar la capacidad del tratamiento de inducir daño crónico se realizaron estudios de clonogenicidad; el número de colonias positivas resultó significativamente menor en DL_{50} respecto de IC_{50} ($p<0,001$). En este último caso, se observó una mayor frecuencia de patrones morfológicos compatibles con células senescentes. Como conclusión podemos afirmar que sobre cultivos de células de cáncer colorrectal, los extractos acuosos de *PS* resultan citostáticos a bajas concentraciones, induciendo muerte por necrosis a concentraciones mayores de $5 \mu\text{l/ml}$. Consideramos a estos estudios alentadores y con perspectivas farmacológicas siendo los primeros en reportar efectos citotóxicos relacionados a extractos de *PS*.

696. (469) EFECTO DE DISTINTAS DOSIS DEL NANOINSECTICIDA A BASE DE ALÚMINA NANOESTRUCTURADA (NSA) SOBRE CULTIVOS DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE LA LÍNEA CELULAR THP-1

Pochettino, A.¹, Datillio, L.², Bongiovanni, B.², Teodoro, S.¹, Maria Luisa, B.²
IMBECU¹ Instituto de Inmunología de Rosario. Facultad de Cs Médicas. UNR²

El descubrimiento del nanoinsecticida a base de alúmina nanoestructurada (NSA) abre nuevas fronteras en el manejo de plagas con polvos inorgánicos. Sin embargo, existe evidencia de que diferentes nanomoléculas poseen propiedades inmunomoduladoras y si bien es un campo poco explorado, es lógico suponer que aquellos macrófagos alveolares que fagociten las nanopartículas presenten una capacidad de respuesta alterada frente a diferentes patógenos. Es así que, en una primera instancia, nos propusimos evaluar el efecto de la NSA en cultivos de macrófagos derivados de la línea celular THP-1, expuestos a diferentes tiempos (6hs y 24hs) y concentraciones de la NSA (5, 25, 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$), a fin de evaluar: viabilidad celular (Test MTT), capacidad proliferativa (incorporación de ^3H timidina), citotoxicidad (LDH), producción de IL-1 β (ELISA) y actividad de catalasa (CAT). En los cultivos de 6hs de exposición, se observó que las dos concentraciones menores de la NSA indujeron incremento en los niveles de IL-1 β ($5\mu\text{g/ml}=4\text{veces}$, $p<0,03$ y $25\mu\text{g/ml}=11\text{veces}$, $p<0,02$) y una disminución de la CAT ($5\mu\text{g/ml}=18\%$, $p<0,03$ y $25\mu\text{g/ml}=32\%$, $p<0,02$) respecto del cultivo sin tratar con NSA. Con las 2 concentraciones más elevadas se constató disminución de la viabilidad celular ($p<0,002$), e incremento en la liberación de LDH (ej. $250\mu\text{g/ml}=60\text{veces}$, $p<0,001$) y de IL-1 β (ej. $250\mu\text{g/ml}=200\text{veces}$, $p<0,002$) y disminución de la actividad CAT (ej. $250\mu\text{g/ml}=60\%$, $p<0,001$). El comportamiento de los cultivos luego de 24 hs de exposición fue similar a lo observado a las 6 hs. Si bien la exposición a concentraciones elevadas de la NSA provoca gran liberación de IL-1 β , también induce muerte celular. Sin embargo, las concentraciones menores incrementan los niveles de IL-1 β sin observarse citotoxicidad celular, hecho que motiva profundizar los mecanismos que subyacen en los efectos observados a fin de evaluar su eventual aplicación como modulador de la respuesta inmune.

697. (564) EFECTO MODULADOR DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE UNA LÍNEA DE LINFOMA MURINO

Martino, R., Anesini, C.
IQUIMEFA- CONICET- FFyB- Universidad de Buenos Aires

Las especies reactivas del oxígeno (EROS), especialmente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) participan en la modulación de la progresión del ciclo celular, motilidad celular, crecimiento y muerte celular. El aumento excesivo de EROS, por aumento o deficiencia de los sistemas antioxidantes puede conducir a estrés oxidativo, estado observado en alteraciones hematopoyéticas como las leucemias. Las ROS derivadas de las células tumorales parecerían participar en la supervivencia, proliferación, migración y metástasis y aún en la resistencia a los quimioterápicos. Las células EL-4 corresponden a un linfoma T murino inducido químicamente, del cual no se conoce como las EROS intervienen en la modulación de la proliferación celular. Se propuso para este trabajo estudiar la participación, específicamente del H_2O_2 , en el balance proliferación/muerte celular. Se evaluó la producción de EROS y la actividad de peroxidasa (Px), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) por técnicas espectrofotométricas y la proliferación celular por la técnica del MTT en presencia de inhibidores de las vías involucradas en la síntesis y degradación del H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ y de las señales intracelulares relacionadas con la proliferación y muerte celular. La proliferación de las células EL-4 estaría modulada por el H_2O_2 , que presentó un efecto bifásico, aumentando la proliferación a concentraciones bajas (10^{-8}M) e inhibiéndola a concentraciones altas (10^{-5}M) ($p<0,01$ de acuerdo a prueba T Student). El efecto estimulador estaría relacionado con la activación de la vía de ERK1/2 y AP-1, mientras la disminución de la proliferación estaría relacionada con la vía del P38 y NF- κB a través de la producción de óxido nítrico.

698. (612) EL HEXACLOROBENCENO ALTERA LOS NIVELES DE PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR E INDUCE SU ARRESTO

Chiappini, F., Pontillo, C., Lvarez, L., Randi, A., Kleiman De Pisarev, D.
Lab. de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental persistente que produce efectos deletéreos sobre la salud. Su administración crónica a animales de laboratorio genera disfunciones tiroideas y reproductivas. Demostramos que el HCB aumenta la expresión de TGF- β 1 y la apoptosis en células foliculares tiroideas, FRTL-5. El TGF- β 1, inhibe la función y la proliferación de células epiteliales tiroideas, y regula la expresión de proteínas del ciclo celular (p15, p16, p21 y p27) induciendo arresto y apoptosis, dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS). Objetivos: evaluar en células FRTL-5: a) la progresión del ciclo celular por citometría de flujo (tinción con yoduro de propidio) y los niveles proteicos nucleares de p27 y ciclina D1 por western blot; b) el rol de TGF- β 1 en la inducción de apoptosis mediada por la vía de los SMAD, evaluando la viabilidad celular (ensayo de MTT), en presencia SB431542, un inhibidor del receptor tipo I de TGF- β 1; c) la funcionalidad celular por los niveles proteicos de tiroglobulina (TG) por western blot. Las células fueron expuestas al HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) o vehículo, durante distintos tiempos (2, 4, 6, 8, 24, 30 y 72h). Resultados: Los niveles nucleares de p27 aumentaron significativamente a las 2, 4 y 6h (165, 114 y 96%), mientras que los de ciclina D1 disminuyeron a las 4, 6, 24 y 30h con HCB (5 μM) (40, 50, 60 y 80%) en relación con las células control. El ciclo celular se arrestó en G1 (72h) y G2/M (HCB 5 μM , 24h). El TGF- β 1 no está involucrado en la apoptosis inducida por el HCB por la vía de los SMAD. La exposición al HCB (5 μM , 24h) disminuye los niveles de TG (50%), afectando la funcionalidad celular. Nuestros resultados demuestran que el HCB altera funciones tiroideas, y produce un desbalance en la homeostasis del crecimiento de células FRTL-5 induciendo apoptosis independientemente de TGF- β 1, y el arresto del ciclo celular.

699. (622) EFECTO DIFERENCIAL DE ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN EL CAMINO

DE SEÑALIZACIÓN DE PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS ERITROIDES

Chamorro, M., Vota, D., Wenker, S., Vittori, D., Nesse, A.
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. IQUIBICEN-CONICET

Ha sido demostrado que la eritropoyetina carbamilada (cEpo) tiene acción neuroprotectora, al igual que Epo, pero carece de efecto eritropoyético. Existen controversias debido a la acción diferencial de ambas y a la posible interacción, en diferentes tipos celulares, con el homoreceptor (REpo)₂, o el heteroreceptor (REpo-Rβc), el cual incluye la subunidad βcommon, relacionada también con el receptor de GM-CSF. Inicialmente, observamos interferencia de cEpo con la acción de GM-CSF como factor de crecimiento de cél. TF-1 con capacidad de diferenciación eritroide, mientras que GM-CSF interfirió la acción neuroprotectora de cEpo frente a la apoptosis de cél. SH-SY5Y. Además, cEpo indujo la fosforilación de Jak2 en cél. UT-7 y TF-1, a pesar de la incapacidad para estimular su proliferación. Con el fin de identificar la causa de la acción diferencial entre Epo y cEpo, estudiamos las vías de señalización involucradas. Ensayos de inhibición en cél. SH-SY5Y mostraron pérdida total de la acción antiapoptótica de cEpo en presencia de anti-βc. El estudio del ciclo celular de cél. UT-7 (citometría de flujo) demostró un aumento de la fase S y G2/M en presencia de Epo a la vez que un arresto en la fase G1 en cultivos con cEpo. Coincidentemente, Epo, pero no cEpo, indujo fosforilación de FOXO3a (WB) y, la consecuente disminución de la transcripción de la proteína reguladora del ciclo celular p27^{Kip1}. En presencia de cEpo la expresión de p27^{Kip1} se mantuvo aumentada lo que explicaría el arresto del ciclo celular. Podemos concluir que cEpo interacciona con el heteroreceptor REpo-Rβc en células neuronales o eritroides. Sin embargo, en éstas últimas, la unión a dicho receptor generaría la fosforilación de Jak2 desencadenando una vía de señalización que se encontraría bloqueada en algún paso, que resta aún dilucidar, lo que impediría la regulación del ciclo celular mediada por activación de FOXO3a y por la expresión del factor inhibitorio de la proliferación p27^{Kip1}.

700. (625) ROL DEL ANÁLOGO DE LA HORMONA PARATIROIDEA (PTHrP) EN LA APOPTOSIS Y SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS CACO-2

Lezcano, V., Gentili, C., Russo De Boland, A.
Universidad Nacional del Sur

Previamente se demostró que la hormona paratiroidea (PTH) induce apoptosis en las células Caco-2 derivadas de cáncer de colon humano, sin embargo, hasta el presente se desconoce el rol de su análogo tumoral PTHrP en estas células intestinales. Para evaluar si PTHrP (10⁻⁸ M) induce apoptosis, las células Caco-2 fueron tratadas con la hormona por 24 y 72 horas en ausencia de suero, incubadas con Anexina V FITC/Ioduro de Propidio y luego analizadas por citometría de flujo. Adicionalmente, se estudió la integridad nuclear y mitocondrial por microscopía de fluorescencia. Se observó que ni la privación de suero ni PTHrP inducen apoptosis o necrosis. Para estudiar si PTHrP presenta un rol protector cuando se induce apoptosis, las células Caco-2 fueron incubadas con el análogo por 24 horas seguido de tratamiento con H₂O₂ (0,5 M por 4,5 horas). Luego, se evaluó la viabilidad celular por el método colorimétrico MTS y paralelamente, se estudió la activación de la proteína de supervivencia Akt y de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) ERK 1/2, JNK y p38 mediante la técnica de Western blot. Se observó que el agente inductor de apoptosis H₂O₂ disminuye la viabilidad celular en un 50% y activa las MAPKs y Akt, sugiriendo que en situación de estrés estas vías de señalización son activadas para mediar respuestas de supervivencia celular. Empleando inhibidores específicos, se obtuvo evidencia que las MAPKs no participan en la respuesta de las células Caco-2 al H₂O₂. Se comprobó que PTHrP no es capaz de prevenir la muerte celular inducida por el estrés oxidativo en células Caco-2. En conjunto estos resultados sugieren que, contrariamente al efecto pro-apoptótico de PTH en las células Caco-2, su análogo tumoral no es capaz de inducir apoptosis ni

tendría, bajo las condiciones experimentales estudiadas, un efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por H₂O₂.

701. (659) EL ANÁLOGO TUMORAL DE PTH FAVORECE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO

Calvo, N., Martín, M., Russo De Boland, A., Gentili, C.
Universidad Nacional del Sur - Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia

En trabajos previos observamos que en la línea celular Caco-2 derivada de adenocarcinoma de colon humano el análogo tumoral de PTH (PTHrP) incrementa la proliferación de estas células intestinales a través de la vía de señalización de las MAP quinasas ERK 1 y ERK 2. El objetivo del presente trabajo es investigar si PTHrP modula la progresión del ciclo celular en las células Caco-2 evaluando los efectos de este péptido sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. Las células cultivadas con 5% de suero fetal bovino fueron tratadas con PTHrP (10⁻⁸ M) por 1-24 horas seguido de análisis por Western blot usando anticuerpos específicos. Se observó que PTHrP aumentó la expresión de la ciclina D1 y de la quinasa Cdk6, que son responsables de la progresión del ciclo celular en la fase G1 temprana, mientras que los niveles de la quinasa Cdk4 y de la ciclina D3 no fueron afectados por el tratamiento hormonal. Además el tratamiento con PTHrP disminuyó la expresión de p53, un regulador negativo del ciclo celular y de los inhibidores específicos de Cdk p15INK4B, p27Kip1 y p21Cip1. PD 98059, inhibidor específico de ERK1/2, revirtió los cambios inducidos por PTHrP en la expresión de las proteínas del ciclo estudiadas. Estos resultados sugieren que PTHrP induce la proliferación de las células intestinales Caco-2 y favorece la progresión del ciclo celular modulando la expresión de proteínas reguladoras del ciclo a través de la vía de señalización de las MAPquinasas ERK1/2.

702. (694) MIOFIBROBLASTOS INDUCIDOS POR LPS A PARTIR DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS AUMENTAN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

Leimgruber, C., Peinetti, N., Quintar, A., Maldonado, C.
Centro de Microscopía Electrónica. Fac. Cs. Médicas. UNC

Las células musculares lisas prostáticas (CMLp) establecen interacciones andrógeno-dependientes con el epitelio para mantener la homeostasis glandular. Recientemente demostramos que las CMLp responden a LPS adquiriendo un fenotipo miofibroblástico secretor de citoquinas proinflamatorias, y que testosterona (T) atenúa estos cambios. Considerando que los miofibroblastos son importantes componentes de la estroma reactiva de tumores prostáticos, nuestro objetivo fue evaluar la influencia de estas células sobre la proliferación/apoptosis de células tumorales prostáticas y el efecto de testosterona. Cultivos primarios de CMLp de ratas Wistar fueron estimuladas con LPS (1 y 10 µg/ml) por 48 h en presencia de testosterona o no (CML-LPS+T y CML-LPS). Luego, células tumorales de rata de la línea andrógeno-independiente Mat-lu se incubaron con el medio condicionado de CML-LPS, CML-LPS+T ó con el de CMLp sin estimular (CML-CTRL) por 24h. Controles adicionales incluyeron medio incubado por 24 hs con T (10⁻⁷M) o con LPS 10 µg/ml. Finalizado el tratamiento, las células tumorales fueron procesadas para evaluar proliferación por incorporación de BrdU y análisis de apoptosis por citometría de flujo con Anexina/IP y técnica de TUNEL. El medio condicionado de CML-LPS aumentó la proliferación de las células tumorales (p<0,01 vs. CML-CTRL); a la vez que disminuyó el número células apoptóticas evaluadas por citometría de flujo respecto al CML-CTRL, efecto que fue confirmado por TUNEL. Al tratar con el medio condicionado CMLp-LPS+T, el efecto sobre la proliferación fue menor (p<0,01 vs. CML-LPS). Estos resultados indican que miofibroblastos inducidos por estímulo inflamatorio, producen sustancias que estimulan la proliferación de células epiteliales tumorales, y que alterarían las interacciones epitelio/estromales. El mantenimiento del perfil normal de la célula muscular por testosterona

ya demostrado, contribuyó a controlar la proliferación tumoral realizando su rol homeostático.

703. (819) TOXICITY DETERMINATION OF AG NANOPARTICLES BY MONITORING FIBROBLAST ATTACHMENT ON GOLD INTERDIGITATED ELECTRODES

Bonetto, M.¹, Sticker, D.², Charwat, V.², Corton, E.¹, Ertl, P.²
Laboratorio de biosensores y bioanálisis, dto. Química Biológica, FCEN, UBA. IQUBICEN-CONICET¹ Department of Health & Environment, Austrian Institute of Technology GmbH (AIT), Viena, Austria²

Clinical applications of nanoparticles (NPs) have improved detection sensitivity in medical imaging, raised therapeutic effectiveness through targeted drug delivery and decreased the associated side effects of drugs. But NPs can potentially cause adverse effects on organ, tissue, cellular, sub cellular, and protein levels leading to reactive oxygen species generation, the initiation of an inflammatory response and perturbation and destruction of the mitochondria causing apoptosis or necrosis. In vitro studies to determine toxicity in cultured cells have several advantages, including rapid results with low cost

and decreasing the need for animal use. However, it has been shown that NPs may produce in vitro toxicity in some cell-based assays, but not in others. The dielectric properties of biological materials allow the development of a wide variety of assays based on electrochemical measurements of cell cultures for applications in medicine and biology. For instance, if cells are placed on photolithographic electrodes, the cellular impedance signal resulting from the cell membranes' insulation can be measured using a potentiostat. Impedance measurements with interdigitated electrodes (IDES) have already been used to study NP toxicity, but the measurements have always been run only after preincubating the cells for 22-24 hours with or without NPs. In an attempt to speed up the bioassay, we present here preliminary impedance measurements of fibroblast (NHDF) cell attachment after incubation for 20 or 60 minutes in the presence and absence of Ag NPs under shaking conditions. We wanted to study if the NPs produced some effect on NHDF cells after a short exposure time in order to design a faster bioassay. We could observe differences in impedance measurements between NHDF cells incubated with or without Ag NPs either after 20 minutes or 60 minutes. We could also observe less cells attached on the IDES if they were incubated with NPs.