

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

ENDOCRINOLOGÍA 1

001. (55) EFECTO DE LA INHIBICIÓN ANGIOGÉNICA SOBRE EL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSITO VISCERAL

Fariña J.¹; García M.¹; Zubiría G.²; Giovambattista A.²; Spinedi E.¹; Gagliardino J.¹
Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET¹; Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), La Plata².

El desarrollo y el funcionamiento del tejido adiposo (TA) requieren de una apropiada actividad angiogénica y parte de los progenitores adipocitarios se localizan en la zona perivascular del TA. **Objetivo:** Analizar el efecto de un inhibidor angiogénico (SURAMINA, S), sobre diferentes parámetros plasmáticos y tisulares, así como también sobre la diferenciación de células de la Fracción Estroma Vascular (FEV) correspondiente. **Métodos:** Ratas Wistar macho adultas de 210-230 g de peso, alimentadas con dieta comercial estándar y agua de bebida *ad libitum* recibieron una inyección única de S (i.p. 100 mg/kg en solución fisiológica) o igual volumen de solución fisiológica (grupo control; C). Los animales se sacrificaron a los 15 días post-tratamiento obteniéndose muestras de sangre para determinar la concentración plasmática de glucosa (G), triglicéridos (TG), insulina (I) y leptina (LP). Se disecó pesó y fijó TA Visceral (TAV) para medir: área vascular (AV), diámetro adipocitario (DA) y área adipocitaria (AA). Finalmente, se determinó el porcentaje de diferenciación (%D) final de células de la FEV (diferenciación *ex vivo*). **Resultados:** Los niveles circulantes de los parámetros dosados (G, TG, I y LP) y la masa de TAV fueron similares en ambos grupos. Las ratas S variaron significativamente en: a) TAV: AV (S vs. C: 0,221±0,051 vs. 0,473±0,103%, p<0,05), DA (S vs. C: 57,4±1,4 vs. 48,2±1,7 µm, p<0,01) y AA (S vs. C: 3045±212 vs 2101±124 µm², p<0,01); y b) células FEV al final de la diferenciación: disminución del %D (S vs. C: 22,5±5,4 vs 42,3±4,5%, p<0,02). **Conclusión:** estos resultados sugieren que la inhibición de la angiogénesis inducida por S promovió hipertrofia adipocitaria. Esta se debería, al menos en parte, a una disminución de la capacidad adipogénica de los progenitores adipocitarios presentes en la FEV, con la consecuente disminución de adipocitos maduros.

002. (63) EXPRESIÓN DE GENES HEPÁTICOS DEPENDIENTES DE GH Y SEXUALMENTE DIMÓRFICOS EN TRES MODELOS DE RATONES TRANSGÉNICOS PARA EL RD2

Ramírez M.¹; Ornstein A.¹; Luque G.¹; Pérez Millán M.¹; Rubinstein M.²; Becú-Villalobos D.¹.
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)-CONICET².

La hormona de crecimiento (GH) regula de manera sexo-específica la expresión de numerosos genes hepáticos, en particular los citocromos P450 (Cyps). Poco se sabe del impacto de la prolactina (PRL) sobre expresión génica hepática. Previamente demostramos que la dopamina a través del receptor D2 (RD2) regula la secreción de GH y PRL. En este trabajo analizamos el patrón de expresión génica sexo-específico y dependiente de GH, en tres modelos de animales transgénicos para el RD2 con diferentes entornos de GH y PRL. Los ratones deficientes del RD2 en todo el organismo, *Drd2*^{-/-}, presentan hiperpro-

lactinemia y el eje de GH disminuido, los ratones deficientes del RD2 específicamente en neuronas, *neuroDrd2KO*, tienen niveles normales de PRL y el eje de GH disminuido; mientras que los ratones deficientes del RD2 en lactotrofos (*lacDrd2KO*) tienen hiperprolactinemia y GH normal. Encontramos que en los hígados de los machos *neuroDrd2KO* la expresión de los genes predominantes masculinos (*Cyp2d9*, *Cyp7b1*, *Mup 1/2/6/8*) estaba disminuida, y aumentada la expresión de los genes predominantes femeninos (*Cyp2b9*, *Cyp2a4*, *Adh1* y *PrIR*) en comparación con los machos *Drd2*^{loxP/loxP}, indicando una demasculinización y feminización de la expresión génica hepática. Por otro lado, en hembras *lacDrd2KO* hubo una fuerte inducción de los genes femeninos *Cyp3a16* y *Cyp3a44*, sugiriendo una novel regulación por PRL, sin modificación de la expresión GH dependiente o del dimorfismo sexual de la mayoría de los genes. En el *knockout* global el fenotipo fue intermedio, con inducción de genes por PRL, y demasculinización de genes dependientes de GH. Concluimos que el RD2 central a través de GH modifica el patrón de expresión sexo-específico de enzimas hepáticas, y el RD2 hipofisario a través del aumento de PRL induce la expresión de Cyps femeninos. Estos resultados deben ser considerados en tratamientos prolongados con antidopaminérgicos que podrían alterar la actividad metabólica sexo-específica del hígado.

003. (99) CARACTERIZACIÓN UTERINA EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (SOP)

Ferreira S.; Heber M.; Vélez L.; Motta A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET.

El útero es uno de los órganos reproductivos de mayor importancia el cual juega un rol fundamental durante la preñez. Las mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) tienen bajas tasas de implantación aún cuando la funcionalidad ovárica es normal. Aunque la etiología del SOP es aún desconocida actualmente se propone que se debe a una reprogramación fetal debido a hiperandrogenismo (HA) intrauterino durante la gestación. **Objetivo:** Caracterizar la patología en útero durante la etapa puberal (60 días) y establecer el estado inflamatorio, los niveles de estrés oxidativo y la regulación lipídica, en ratas HA prenatalmente. **Materiales y Métodos:** Se inyectaron con testosterona libre 2 mg/ 0,1 ml de aceite (HA) ó aceite (control: C) entre los días 16 a 19 de gestación ratas preñadas Sprague-Dawley cuyas crías hembras (N= 10 animales/grupo) fueron sacrificadas a los 60 días de edad. El estado inflamatorio se analizó por cuantificación de: Prostaglandina E (PGE) y ciclooxigenasa 2 (COX2). El estrés oxidativo fue evaluado a través de la peroxidación lipídica (LP) y concentración de glutatión total (GSH). La regulación lipídica se estudió a través de los niveles circulantes de PPAR γ . **Resultados:** El HA indujo un ambiente intrauterino desfavorable que se compensó luego del nacimiento ya que la pendiente de crecimiento de HA fue mayor (3,98±0,01; P<0,05) que la C (3,72±0,01). En el grupo HA se indujo un estado pro-inflamatorio caracterizado por aumento de PGE (1,20±0,50 pg/mg tejido) con respecto a C (0,54±0,08 pg/mg tejido) p<0,007 y de la expresión proteica de COX2 (2,69±0,96) con respecto a C (0,64±0,82) UA, p<0,05. El estrés oxidativo del tejido uterino a través de LP no mostró diferencias entre C e HA como así tampoco GSH. No se observaron diferencias en los niveles de PPAR γ entre los grupos. **Conclusión:** Durante la etapa estudiada las alteraciones observadas inducidas

por HA han generado un estado pro-inflamatorio, el cual podría condicionar la funcionalidad del útero.

004. (115) EFECTOS ACTIVACIONALES SOBRE LA REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DE LA INGESTA PRODUCIDOS POR LA ELIMINACIÓN DE FITOESTRÓGENOS DE LA DIETA

Andreoli M.^{1,2}; Stoker C.^{1,2}; Zanon M.^{1,2}; Alzamendi A.³; Castrogiovanni D.³; Luque E.²; Ramos J.^{1,2}

Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral²; Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), La Plata.³

Se ha demostrado que la presencia de fitoestrógenos (F) en la dieta juega un rol beneficioso en la reducción de obesidad y diabetes. Nuestro objetivo fue determinar si la eliminación de F de la dieta modifica el peso corporal, parámetros metabólicos y señales hipotalámicas que regulan la ingesta. Ratas macho Wistar adultas fueron alimentadas con dieta control con F (CF), dieta grasa con F (GF, referente de inducción de obesidad) o dieta sin F (SF) por 15 semanas. Se evaluó ingesta energética (IE), peso corporal, test de tolerancia a la glucosa (TTG), peso de los parches adiposos y expresión hipotalámica de los mRNA de neuropéptidos orexígenos (NPY, AgRP) y anorexígenos (POMC, CART), receptores de leptina, insulina y estrógenos (RL, RI y RE). Los animales GF incrementaron la IE en un 55% ($p < 0,001$), mientras que los SF lo hicieron en un 82% ($p < 0,001$). Esto se reflejó en un incremento del 10% del peso corporal ($p < 0,05$) y del 50% en los parches adiposos en ambos casos ($p < 0,001$). El aumento en IE en SF se relacionó a una respuesta orexígena mediada por un incremento en la expresión de AgRP y una disminución de POMC ($p < 0,001$), mientras que el grupo GF indujo una respuesta similar sólo mediada por la disminución de POMC ($p < 0,001$). La expresión de RL no se vio alterada, la de RI disminuyó en los animales GF ($p < 0,05$). La expresión de RE se redujo al 45% en GF y SF ($p < 0,05$), lo que podría relacionarse con el incremento de peso y adiposidad observados. A través del TTG se observó que el consumo de grasa en los animales GF, incrementó el área bajo la curva en un 33% ($p < 0,05$) sin alterar la glucosa basal, mientras que la ingesta de SF aumentó ambos parámetros ($p < 0,05$). Estos resultados muestran que la eliminación de F dietarios en animales adultos induce efectos activacionales sobre la regulación hipotalámica de la ingesta que resultan en la inducción de obesidad y diabetes involucrando mecanismos y alteraciones distintas a las inducidas por la dieta grasa.

005. (158) ROL DE LOS MICRORNAS (MIRS) EN LA AUTORREGULACIÓN TIROIDEA

Salvarredi L.¹; Thomasz L.^{1,3}; Rossich L.¹; Pisarev M.^{2,3}; Fusco A.⁴; Juvenal G.^{1,3}

Comisión Nacional de Energía Atómica¹; Universidad de Buenos Aires²; CONICET³ Instituto de Endocrinología ed Oncología Sperimentale-CNR⁴.

Introducción: El yodo es utilizado por la tiroides para sintetizar hormonas tiroideas pero además cumple un rol regulatorio a través de la síntesis de lípidos iodados como el 2-iodohexadecanoil (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:** La línea de tiroides FRTL-5 se trató con 2-IHDA y se validó la expresión de los miRs por qPCR. De acuerdo a la predicción bioinformática los miRs let-7f, 138 y 211, regulados positivamente por el IHDA, contienen sitios de unión a las regiones 3' UTR de las ciclinas D1, D3, y CREB1 respectivamente, y a la región 3' UTR de la fosfatasa cdc25a. La sobreexpresión de los miRs let-7f, 138 en las FRTL-5 redujo significativamente la expresión a nivel de mRNA y de proteínas de las ciclinas D1 (28%) y D3 (15%) ($p < 0,05$) respectivamente.

El ensayo de luciferasa mostró una unión específica del miR-let-7f a la región 3' UTR de la ciclina D1. Para CREB1 y Cdc25a se observó una reducción a nivel de proteína ($p < 0,05$). La inhibición de los miRs let-7f y 138 restauró los niveles de expresión de las ciclinas en células tratadas con el iodolípido ($p < 0,05$). Únicamente el miR let-7f produjo una inhibición significativa de la proliferación celular inducida por TSH a través de PKA ($p < 0,05$). Por el contrario en células tumorales en las cuales está estimulada la vía de las tirosinas quinasas, sólo el 138 tiene un efecto inhibitorio.

Conclusiones: La inhibición de la expresión de las ciclinas D1 y D3 por parte del IHDA, estaría mediada por los miRs let-7f y 138. Sin embargo el efecto inhibitorio del IHDA sobre la proliferación inducida por TSH estaría mediado por let-7f mientras que el 138 participaría regulando la vía de tirosinas quinasas.

006. (186) PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS STEM/PROGENITORAS HIPOFISARIAS EN ESTADIOS REPRODUCTIVOS DE ALTA DEMANDA HORMONAL: PREÑEZ Y LACTANCIA ACTIVA

Vaca A.¹; Guido C.¹; Sosa L.¹; Petiti J.¹; Alvarez-Villamarin C.²; Torres A.¹

Centro de Microscopía Electrónica-INICSA-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba¹; Escuela de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España.²

Las células adenohipofisarias manifiestan un recambio celular durante la preñez y lactancia en respuesta a demandas hormonales, en el que se produciría reclutamiento y diferenciación de células stem/progenitoras (CS). El objetivo fue evaluar la expresión de marcadores asociados a células: stem: Sox2, Oct-4, klf4 y GFRa2; progenitoras: Sox9 y diferenciadas: PROP1 y Pit-1 en preñez (P) y lactancia activa (LA). Se utilizaron hipófisis de ratas Wistar en: cópula (COP) considerado tiempo de referencia, P: día 5 de gestación (d5G), día 15 de gestación (d15G), a término de la preñez (AT) y LA: día 0 de lactancia (D0L) y día 4 de lactancia (D4L). Los resultados fueron analizados por ANOVA-Tuckey y T-test. Los niveles de ARNm de klf4 y Sox2 fueron similares durante P, aumentaron significativamente en D0L y disminuyeron en D4L. El ARNm de GFRa2 exhibió un marcado incremento en AT, disminuyendo luego en LA. La expresión de Oct-4 evaluada por inmunocitoquímica ultraestructural en la zona marginal (ZM), no presentó fluctuaciones durante P, mostrando un importante incremento en D4L vs AT. La expresión de Sox2 disminuyó en d5G y AT vs COP, aumentando en D4L vs AT y D0L. GFRa2 no presentó cambios en d5G vs COP, observándose una marcada disminución a mitad de la P (d15G), un incremento significativo en AT y posterior disminución en LA vs AT. Los niveles de ARNm de Sox9 aumentaron en AT vs COP siendo este aumento progresivo en D0L y D4L. En relación a su expresión en ZM no presentó cambios en P, aumentando en D0L y disminuyendo luego en D4L. Los factores de transcripción PROP1 y Pit-1 presentaron niveles aumentados de ARNm en AT, observándose un incremento de PROP1 en D0L, mientras que los niveles de Pit-1 fueron máximos en D4L. Las variaciones de los marcadores analizados serían indicativas de movilización de CS en la ZM. Estas células darían origen a poblaciones celulares en distintos estadios de diferenciación, participando en el recambio dinámico de adenohipófisis.

007. (190) DIME COMO VIVES Y TE DIRÉ COMO ENVEJECES: EL AMBIENTE SENSORIALMENTE ENRIQUECIDO COMO MODULADOR DE LA ESTEROIDOGENESIS 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, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral².

La exposición de animales de laboratorio a una variedad de estímulos sensoriales parece contribuir a un mejoramiento de la

memoria y el aprendizaje, incluso en situaciones tales como el envejecimiento. Se ha demostrado que los esteroides sintetizados *de novo* en el hipocampo poseen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras, sin embargo disminuyen en la adultez-mayor. En este contexto, ¿Será la estimulación sensorial capaz de revertir la caída de la neuroesteroidogénesis asociada a la edad? Si así fuera, ¿Podrá esto deberse a mecanismos de metilación diferencial en las regiones promotoras de las enzimas implicadas? Para responder estas preguntas, trabajamos con ratas hembras Wistar de 15 meses de edad (adultas) expuestas a un ambiente sensorialmente enriquecido durante 10 días (*Short term*, AE.St) y durante 105 días (*Long Term*, AE.Lt). Para ello, se utilizaron juguetes y túneles de diferentes formas y tamaños. Como grupo control se utilizaron animales mantenidos en condiciones estándares (AS). Los hipocampos se disecaron y almacenaron a -80°C para posterior 1) extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real y 2) análisis de metilación utilizando enzimas de restricción sensibles a metilación y posterior PCR en tiempo real (MSRE-PCR). La estimulación sensorial prolongada fue capaz de producir un aumento en la expresión del ARNm de las enzimas StAR, 3 α -HSD, 5 α -reductasa y P450(17 α) (AE.Lt vs AS, $p < 0.05$) y una disminución en la metilación de uno de los sitios estudiados correspondientes al promotor de la enzima 5 α -reductasa (AE.Lt vs AS, $p < 0.05$). En conclusión, el ambiente sensorialmente enriquecido es capaz de revertir la caída de la neuroesteroidogénesis asociada a la edad disminuyendo el estado de metilación de los promotores, específicamente del promotor de la enzima 5 α -reductasa. Según nuestra hipótesis, la estimulación sensorial contribuiría a mantener niveles adecuados de síntesis de neuroesteroides durante la adultez, favoreciendo la plasticidad hipocampal.

008. (207) PAPEL DE LA L-DOPA EN LOS PROCESOS DE APOPTOSIS Y PROLIFERACIÓN EN LA ADENOHIPÓFISIS

Ogando M.; Zarate S.; Gottardo F.; Jaita G.; Eijo G.; Seilicovich A.; Ferraris M.; Pisera D.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (IMBIOMED)-UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) es un precursor en la biosíntesis de dopamina (DA), y es liberada por neuronas hipotálamicas. A pesar de que la L-DOPA es la droga de elección para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson, no existen estudios sistemáticos acerca de sus efectos neuroendocrinos. Nuestra hipótesis es que la L-DOPA produce efectos directos sobre la adenohipofisis, que incluyen la modulación de los procesos de apoptosis y proliferación. La administración de L-DOPA a ratas hembras ovariectomizadas (OVX) (50 mg/kg i.p., 6h) aumentó el porcentaje de células hipodiploides en la adenohipofisis (evaluado por FACS) (% Sub G0-G1, media \pm SEM. Control (C): 9.72 \pm 0.65; L-DOPA: 12.94 \pm 0.56, $p < 0.01$, test de Student), mientras que no se observaron cambios significativos en el ciclo celular. Además, evaluamos los efectos *in vitro* de la L-DOPA sobre células adenohipofisarias, y sobre la línea celular GH3. Dado que previamente se observó que la DA induce apoptosis en lactotropos por un mecanismo dependiente de 17 β -estradiol (E2), evaluamos el efecto de la L-DOPA en presencia de E2 (10⁻⁹ M) o vehículo (etanol 1 μ l/l; VEH). La L-DOPA (10⁻⁵ M, 6h) disminuyó el porcentaje de células adenohipofisarias apoptóticas (evaluado por TUNEL.% de células apoptóticas, C: 22.34; L-DOPA: 12.82, $p < 0.01$ χ^2). Este efecto no se observó en presencia de E2 (C: 25.74; L-DOPA: 30.30, χ^2). En la línea celular GH3, mientras que la L-DOPA tuvo un efecto antiapoptótico en ausencia de E2 (C: 1.90; L-DOPA: 0.83, $p < 0.01$ χ^2), en presencia de E2 el efecto observado fue proapoptótico (C: 1.17; L-DOPA: 2.47, $p < 0.01$ χ^2). Estos resultados indican que la L-DOPA modifica la tasa de apoptosis de células adenohipofisarias, y sugieren que los estrógenos modulan los efectos de esta droga. El tratamiento con L-DOPA podría alterar las funciones de la adenohipofisis en pacientes con Enfermedad de Parkinson.

009 (220) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INSULINA SOBRE LOS NIVELES DEL MICROARN-122 (MIR122) Y LA PROLIFERACIÓN HEPATOCITARIA EN RATONES DIABÉTICOS.

Francés D.¹; Ronco M.¹; Monti J.¹; Toledo F.¹; Pisani G.²; Parody J.¹; Ceballos Mancini M.¹; Carrillo M.¹; Carnovale C.¹
Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET¹; Área Morfología, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe².

La Diabetes Mellitus (DM) es considerada como una patología inflamatoria con un incrementado riesgo para el desarrollo del carcinoma hepatocelular (HCC). Los pacientes con DM tipo 1 reciben, desde el inicio de la patología, insulina en dosis farmacológicas. Evaluamos el efecto de la administración de insulina sobre la proliferación hepatocitaria y sobre los niveles hepáticos de mir122 en animales diabéticos. Se utilizaron ratones C57BL/6, divididos en: Control (vehículo), diabéticos (Estreptozotocina, 200mg/kg p.c., DBT) y diabéticos tratados con insulina por 14 (DBT+I₁₄) ó 21 días (DBT+I₂₁) ($n = 4$ c/u). Se adecuaron las dosis de insulina de manera de mantener la glicemia en el rango 6-9 mM. El tratamiento con insulina normalizó: glicemia, GOT, GPT y niveles plasmáticos de fructosaminas. DBT+I₁₄ mostró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en: Relación Peso Hígado/Peso Corporal (+15%), índice de marcación (+140%, hepatocitos en fase S) y en índice de proliferación (+245%, hepatocitos en fase G1, S, G2 y M) en comparación con Control. Se evaluaron por Western blot marcadores de proliferación: ciclina D1 (CycD1), PCNA y VEGF. El tratamiento con insulina condujo a un aumento del 50%, del 37% y del 30% respectivamente ($p < 0.05$), asimismo normalizó el aumento del 200% en p53 con respecto a DBT. El mir122 representa el 70% de los miRNA hepáticos, se ha postulado como marcador de daño hepático y se encuentra alterado en patologías como el HCC. El grupo DBT+I₂₁ mostró una disminución del 40% en los niveles de mir122 con respecto a Control, que se correlacionaron con un aumento de la ciclina G1 (30% vs DBT), uno de sus *targets* involucrados en proliferación. El tratamiento con insulina provocó un desbalance entre los marcadores de sobrevida y muerte celular, entre ellos, los niveles de mir122 que conducen a un aumento de las señales pro-proliferativas, pudiendo ser uno de los marcadores tempranos del inicio del HCC en el estado diabético.

010. (224) MODIFICACIONES METABOLICAS EN RATAS MACHO ADULTAS INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DURANTE LA GESTACION, LACTANCIA Y POSTLACTANCIA DEL DISRUPTOR ENDOCRINO NON-YPHENOL

Samaniego Y.¹; Fornari M.²; Giovambattista A.³; Carbone S.¹; Reynoso R.¹; Soutelo M.¹; Ponzo O.¹

Laboratorio de Endocrinología, Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Análisis Clínicos Bioalpha-Fornari²; Unidad de Neuroendocrinología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), La Plata³.

El Nonylphenol (NP), utilizado en productos como conservas de alimentos y productos de higiene, tiene acción estrogénica y antiandrogénica. Objetivo: estudiar si la administración crónica de Nonylphenol, en distintos momentos de la maduración, provoca cambios en la homeostasis metabólica. Se administró diariamente NP en dosis de 50 (NP50) y 100 (NP 100) mg/kg/d (v.o.) a ratas Wistar macho ($n = 10-15$ /grupo) en dos esquemas experimentales: a) durante la postlactancia (desde día 21 de edad), b) durante gestación y lactancia (día 1 de preñez hasta día 21 de edad de las crías). Ambos grupos fueron sacrificados a los 70 días de edad. Los controles solo recibieron el vehículo oleoso. Se analizaron las concentraciones plasmáticas de glucemia (G), ácido úrico (AU), colesterol total (CT) y sus fracciones, triglicéridos (TAG), leptina, insulina (por RIA) y TNF alfa (por ELISA). Se consideró significativo $p < 0.05$. El tratamiento durante la postlactancia produjo con ambas dosis, aumento significativo de AU (C: 0.48 \pm 0.04, NP50: 1.01 \pm 0.08, NP100: 0.91 \pm 0.05 mg%) y TNF-alfa (C: 27 \pm 1, NP50: 39.75 \pm 2.67, NP100: 49.70 \pm 8.85 pg/ml) y de LDL-c con NP50 (C: 11.99 \pm 2.10, NP50: 17.81 \pm 1.32 mg%). Los TAG disminuyeron con ambas dosis (C: 82.88 \pm 5.27, NP50 65.20 \pm 3.24, NP100: 67.89 \pm 3.16 mg%) y la G solamente con NP100 (C.

88,82 ± 2,77, NP100: 77,03 ± 1,95 mg%). El tratamiento durante gestación y lactancia provocó aumento de G con NP100 (C: 95,19 ± 1,38, NP100: 106,52 ± 1,58) y TNF-alfa con NP50 (C: 27,5 ± 0,5, NP50: 63 ± 7,72). Los TAG descendieron con NP100 (C: 66,67 ± 4,49, NP100: 51,62 ± 2,07), mientras que con ambas dosis se vio descenso de CT (C: 63,42 ± 2,27, NP 100: 52,85 ± 2,37, NP50: 54,13 ± 1,29) y HDL-c (C: 29,3 ± 1,07, NP100: 24,33 ± 0,58, NP50: 24,94 ± 0,49). No se observaron cambios significativos en las demás determinaciones realizadas en ambos esquemas experimentales. La exposición crónica a NP produce modificaciones metabólicas diferentes según los momentos madurativos en los que los animales son expuestos, siendo evidente el aumento de la adipokina proinflamatoria TNF-alfa en ambos tratamientos.

011. (389) LA AUSENCIA DE RGABAB EN RATONAS ADULTAS ALTERA PARÁMETROS HIPOFISARIOS Y LA OVULACIÓN

Di Giorgio N.¹; López P.¹; Bettler B.²; Libertun C.^{1,3}; Lux-Lantos V.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Universidad de Basilea, Suiza²; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³.

En trabajos previos hemos demostrado que la ausencia del receptor GABAB funcional (ratones GABAB1KO) altera la expresión y pulsatilidad de GnRH y el ciclo estral en las hembras adultas. Sin embargo esta alteración es independiente de la expresión de *Kiss1* en AVPV/PeN y ARC. Aquí nos propusimos evaluar cómo esta alteración en la fisiología del eje gonadotrófico en las hembras GABAB1KO (KO) impacta a nivel hipofisario y gonadal. Para ello, determinamos: 1) la expresión del receptor de GnRH (*Gnrh1r*) en hipófisis (HF), qPCR; 2) los niveles séricos de FSH, RIA; 3) el porcentaje de ovulación; 4) el número de ovocitos, microscopio óptico; 5) el número de estructuras ováricas, HE; 6) el peso ovárico y uterino y 7) los niveles séricos de estradiol (E2, ELISA) y progesterona (P4, RIA), en hembras adultas, WT y KO, sacrificadas en estro.

La expresión de *Gnrh1r* en HF se encontró aumentada en la hembra KO ($p < 0,05$), coincidente con el aumento de la pulsatilidad de GnRH. Tanto los niveles séricos de FSH en primer estro (pico de FSH que recluta la nueva cohorte folicular, $p < 0,001$) como el porcentaje de ovulación se vio disminuido en las hembras KO (WT: 77,8%; KO: 14,3%, $\chi^2 p < 0,01$), sin embargo aquellas que ovularon no presentaron diferencias en el número de ovocitos con las hembras WT. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en el número de estructuras ováricas, el peso ovárico y uterino ni en los niveles séricos de E2 y P4. El aumento de la pulsatilidad en las hembras KO adultas provoca un aumento en la expresión del *Gnrh1r* en HF y una falla ovulatoria. En consecuencia se observa una disminución en el segundo pico de FSH que recluta la cohorte folicular para el siguiente ciclo ovulatorio. Sin embargo los parámetros ováricos determinados hasta el momento no se encuentran alterados. CONICET-UBA-ANPCYT.

012. (427) ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO CELULAR DE RESPUESTA A LOS ANDRÓGENOS PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA ALOPECIA ANDROGENÉTICA

Castellanos M.; Kusinsky G.; Leirós G.; Balañá M.

Instituto de Ciencia y Tecnología "Dr. César Milstein" - CONICET.

La papila dérmica, de origen mesenquimal, se localiza en la base del folículo piloso y está implicada en la regulación del ciclo de crecimiento del pelo. Dichas células (DPC) envían señales a células madre epidérmicas multipotentes (HFSC) promoviendo su diferenciación a linajes de folículo piloso. En la alopecia androgenética (AGA) los andrógenos circulantes a través de las DPC, causan la miniaturización de los folículos pilosos sensibles debido a la alteración de estas señales. A falta de un modelo animal accesible, las DPC son un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares que conducen a la AGA, pero la expresión del receptor a andrógenos (AR) disminuye a los pocos pasajes. Para evitar esta

dificultad, se transfectó una línea de DPC humana con el AR. Por dilución límite se seleccionó un clon (DPC-AR) cuya expresión de AR se mantuvo estable por más de 50 pasajes, al que se caracterizó. En respuesta a los andrógenos, dickkopf-1 se sobre-expresa exclusivamente en DPC alopecicas, DPC-AR aumentó 30 veces los niveles de ARNm en respuesta a DHT. Asimismo, se verificó que DPC-AR mantuviera a lo largo de los sucesivos pasajes, la expresión de actina de musculo liso (marcador de las DPC primarias), así como la actividad de fosfatasa alcalina, indicadora de capacidad inductora a pelo y presente en pasajes tempranos de DPC primarias. Para comprobar esta capacidad inductora, se realizaron ensayos de diferenciación de HFSC mediante co-cultivo con DPC-AR, evidenciándose el aumento del marcador de pelo K6hf. Tal como fue publicado por nuestro laboratorio para las DPC primarias, la presencia de andrógenos en el medio abolió dicha diferenciación. Por lo tanto, la línea DPC-AR evidenció un comportamiento análogo al de las DPC alopecicas en pasajes tempranos en respuesta a andrógenos, lo que nos permitirá comparar los mecanismos de interacción epitelio-mesenquima entre folículos pilosos sanos y miniaturizados por la progresión de la AGA.

013. (467) EL ESTADO TIROIDEO MODULA IN VIVO LA RESPUESTA ANTITUMORAL FRENTE A CÉLULAS DE LINFOMA T

Sterle H.¹; Barreiro Arcos M.¹; Valli E.¹; Paulazo M.¹; Colombo L.²; Rabinovich G.³; Cremaschi G.^{1,4}

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-Universidad Católica Argentina-CONICET¹; Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"²; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET³; Facultad de Farmacia y Bioquímica; Universidad de Buenos Aires⁴.

Hemos demostrado previamente la regulación de las respuestas inmunes inducidas por el estado tiroideo, pero se conoce muy poco acerca de cómo las fluctuaciones de los niveles de hormonas tiroideas (HT) pueden influenciar las respuestas antitumorales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune antitumoral en ratones C57Bl/6J hiper- (r-hiper) e hipotiroideos (r-hipo), que desarrollan tumores sólidos y metástasis por inoculación con el linfoma T EL-4. Los r-hiper presentaron un mayor crecimiento tumoral, mientras que los r-hipo mostraron un mayor número de metástasis en comparación con los otros dos grupos ($p < 0,05$ a partir del día 10 post-inoculación, pi). En los tumores sólidos de r-hiper se encontró una expresión incrementada de las ciclinas D1, D3 y E, mientras que los tumores de r-hipo presentaron niveles incrementados de p16, p27 y p53 ($p < 0,05$). Al día 10 pi, los r-hiper mostraron un mayor número de células en los ganglios linfáticos y bazo. No se observaron diferencias significativas en la distribución de subpoblaciones linfocitarias en ganglios, sin embargo, se observó un mayor infiltrado linfocitario en tumores de r-hiper, con menor porcentaje de linfocitos CD8+ y mayor porcentaje de linfocitos B. En bazo, por otra parte, observamos un menor porcentaje de células supresoras de origen mielode y linfocitos B junto con un aumentado porcentaje de células NK en r-hiper. Estos efectos se vieron acompañados de una aumentada actividad citotóxica de células NK ($p < 0,05$). Por otra parte, los r-hipo mostraron una reducción en la actividad citotóxica específica contra células tumorales ($p < 0,05$). Nuestros resultados sugieren que el estado tiroideo es capaz de modular el crecimiento tumoral a través de mecanismos que involucran la regulación de proteínas relacionadas con la progresión y/o arresto del ciclo celular, y a través del control de la respuesta inmune antitumoral que puede limitar su diseminación.

014. (471) MODULACIÓN NEGATIVA DEL EJE ECA2/ANG-(1-7)/MAS EN EL CORAZON Y RIÑON DEL MODELO DE ACROMEGALIA DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA

Banegas R.; Burghi V.; Miquet J.; Mazziota L.; Rando M.; Dominici F.; Munoz M.

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La acromegalia es una enfermedad que se presenta durante la adultez como consecuencia de la hipersecreción crónica de la hormona de crecimiento (GH). Esta entidad clínica está asociada a alteraciones cardiovasculares y/o metabólicas dando como resultado una alta tasa de morbilidad y mortalidad. La disfunción cardiovascular y renal está relacionada con alteraciones del eje GH/IGF-1 e involucra un desbalance en el sistema renina-angiotensina (SRA). Sin embargo, se desconoce de qué manera las alteraciones en el eje GH/IGF-1 afectan la expresión de los principales componentes del SRA *in vivo*. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre la sobreexpresión de GH y la abundancia de diferentes componentes del SRA en el corazón y el riñón de ratones transgénicos que sobreexpresan GH (ratones PEPCK-bGH). Para ello, se determinó la abundancia proteica de los receptores AT1, AT2 y Mas como también de las enzimas convertidoras de angiotensinas: ECA y ECA2 mediante inmunohistoquímica y Western Blot. En ambos tejidos de los ratones PEPCK-bGH, se detectó una disminución en la expresión del receptor Mas ($p < 0,01$) y de la ECA 2 ($p < 0,01$) con respecto a sus controles normales. Sorprendentemente, se detectó una disminución en la expresión del receptor AT1 en ambos tejidos de los ratones transgénicos ($p < 0,01$). La expresión del receptor AT2 en el riñón de los ratones PEPCK-bGH disminuyó significativamente ($p < 0,01$) mientras que su abundancia en el corazón no se modificó. No se hallaron modificaciones en la expresión de la ECA en ambos tejidos de los ratones PEPCK-bGH con respecto a sus controles normales. La disminución en la expresión de los componentes del eje ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas observada en los ratones PEPCK-bGH podría contribuir al desarrollo de la disfunción cardiovascular y renal que presenta este modelo animal de acromegalia.

015. (518) PERFIL TIROIDEO Y EMBARAZO

Melillo C.^{1,2}; Prener P.^{1,3}; Cabral A.^{1,4}; Suescun M.^{1,4}
Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata¹; Instituto Médico Mater Dei, La Plata²; Laboratorio Central Hospital San Juan de Dios, La Plata³; Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), La Plata⁴.

Las alteraciones en el eje Hipotálamo-Hipofiso-Tiroideo en la mujer embarazada conllevan a incrementos en muerte intrauterina, aborto espontáneo y nacimiento prematuro así como problemas en desarrollo fetal, mayor riesgo de malformaciones y una disminución en el cociente intelectual de la progenie. El objetivo de este estudio fue establecer la prevalencia de alteraciones tiroideas en una población de embarazadas con un método de *screening* bioquímico (con valores de referencia poblacionales) comparado con un *screening* por factores de riesgo. Se reclutaron 580 mujeres entre 20 y 35 años (E), cursando el primer trimestre de embarazo (E1, n=200), el segundo (E2, n=200) ó el tercero (E3, n=180). Se las comparó con un grupo control de 250 mujeres no embarazadas (C) con similar distribución etaria. Ambos grupos de mujeres (E y C) sin diagnóstico de patología tiroidea al momento del estudio. Se realizaron dosajes de Tirotrófina (TSH), Triiodotironina (T3), Tiroxina total y libre (T4 y T4L) y anticuerpos anti-tiroperoxidasa tiroidea (a-TPO) por Fluorescencia. En el grupo E, el 11% de las mujeres presentó alguna alteración bioquímica en el perfil tiroideo (n= 64); 34 en E1, 25 en E2 y 5 en E3. De las 64 mujeres, el 75% presentó Hipotiroidismo subclínico (TSH > 2.5 mUI/L en el primer trimestre y >3.0 mUI/L en el segundo/tercer trimestre con T4L en el intervalo de referencia), el 15% Hipotiroidismo clínico (TSH > 2 DS de la media correspondiente a cada trimestre), el 5% valores compatibles con hipertiroidismo y el 5% restante sólo a-TPO positivos. Únicamente el 7% de las mujeres en E (n=40) evidenció algún factor de riesgo que justifique la evaluación del perfil tiroideo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las mujeres de los grupos E y C en la prevalencia de disfunción tiroidea. Nuestros estudios avalan el *screening* bioquímico en mujeres embarazadas y la utilización de valores de referencia con la finalidad de disminuir los posibles riesgos en la gestante y eventuales alteraciones en el crecimiento y desarrollo neurológico en el recién nacido.

016. (584) IMPLICANCIA DE LA PALMITOILACIÓN EN EL EFECTO DEL 17 β -ESTRADIOL SOBRE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE CÉLULAS LACTOTROPAS

Valle Sosa L.¹; Gutierrez S.¹; Petiti J.¹; Vaca A.¹; De Paul A.¹; Valdez Taubas J.²; Torres A.¹
Centro de Microscopía Electrónica-INICSA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba².

Modificaciones post-traduccionales del receptor estrogénico α ($RE\alpha$) entre las que se incluyen la adición de un ácido graso (S-acilación, denominada palmitoilación), promueven la interacción del RE con la membrana plasmática en diferentes tipos celulares. Previamente identificamos en lactotropas un pool del $RE\alpha$ en la membrana plasmática ($RE\alpha_m$) demostrando que su expresión es incrementada por 17 β -estradiol (E2). En este trabajo nos propusimos analizar la implicancia de la palmitoilación en los efectos rápidos del E2 y genómicos en interacción con FGF2, mediados por los $RE\alpha_m$. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata Wistar hembra fueron tratados con: E2 (10nM) por 5,15, 30 min solo o co-incubados con FGF2 (10ng/ml). Además, se utilizó el inhibidor de la palmitoilación: 2bromo palmitato (2BP, 10 nM). Los efectos rápidos del E2 fueron evaluados por determinación de PRL secretada y los iniciados en la membrana que desencadenan acciones genómicas, por valoración de la proliferación de lactotropas, 24hs posterior a la incorporación de BrdU (ICQ PRL/BrdU). El $RE\alpha_m$ y caveolina-1(cav-1) fueron identificados por ICQ al microscopio electrónico (ME) y confocal (MC). La expresión de ERK total y fosforilada fue analizada por WB. Estadística: ANOVA-Tukey. Mediante MC el $RE\alpha$ fue observado en núcleo y citoplasma de células controles y posterior al estímulo con E2 fue detectado además en la membrana plasmática co-localizando con cav-1. La interacción del $RE\alpha$ y cav-1 fue confirmada por ME. La secreción de PRL incrementó luego del estímulo con E2 siendo inhibida por 2BP, la cual se correlacionó con una disminución de ERK1/2 fosforilada. La actividad mitogénica de lactotropas aumentó por estimulación con E2/FGF2, observándose que la inhibición de la palmitoilación suprimió la proliferación y fosforilación de ERK1/2. Estos resultados sugieren que la palmitoilación podrían regular los efectos del E2 mediados por los $RE\alpha_m$ sobre la actividad funcional de las células lactotropas.

017. (693) PREVENCIÓN DE LA APARICIÓN DE CATARATAS DIABÉTICAS POR INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO TUBULINA/ALDOSA REDUCTASA

Rivelli Antonelli J.¹; Santander V.¹; Monesterolo N.¹; Nigra A.¹; Previtali G.¹; Amaiden M.¹; Arce C.²; Pie J.³; Casale C.¹
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina¹; Universidad Nacional de Córdoba, Argentina²; Universidad de Zaragoza, España³.

La principal vía patogénica en la diabetes mellitus a través de la cual la hiperglucemia causa las complicaciones típicas de esta enfermedad es la activación de la enzima aldosa reductasa (AR). Por esta razón es muy intensa la búsqueda de inhibidores de la AR para ser aplicados en terapéutica humana. A pesar de ello, luego de décadas de investigación no se ha hallado un inhibidor que combine selectividad, eficacia y seguridad para ser aplicado en humanos. Nosotros demostramos previamente que la tubulina y la AR son capaces de interactuar y como consecuencia de esta interacción la actividad AR se incrementa. El objetivo del presente estudio fue tratar de elucidar el mecanismo a través del cual la interacción tubulina/AR es capaz de regular la actividad AR. Para ello se realizaron estudios *in vivo* en cultivos de células, de cristalinus *ex vivo*, en ratas diabéticas, y estudios *in vitro* con tubulina y AR en estado puro. Los resultados obtenidos indican que: i) las dos proteínas interactúan en forma directa, ii) el isotipo de tubulina que preferentemente interactúa con la AR es el nitrorosinado, iii) la actividad AR aumenta cuando interactúa con tubulina bajo condiciones polimerizantes de microtubulos y iv) tirosina y

3-nitro-L-tyrosina son capaces de impedir la asociación tubulina/AR y prevenir la activación de la AR. La exposición de células a elevada glucosa induce la polimerización de tubulina y la inhibición de la NKA, efectos que son bloqueados por tirosina o 3-nitro-L-tyrosina. El tratamiento de ratas diabéticas con 3-nitro-L-tyrosina o su adición a cristalinios cultivados *ex vivo* en altas concentraciones de glucosa previenen la aparición de cataratas. Con los resultados obtenidos proponemos un nuevo mecanismo de regulación de la actividad AR y NKA por tubulina y demostramos que la actividad AR puede ser regulada por drogas que impidan la formación del complejo tubulina/AR y que la aparición de cataratas diabéticas involucra la asociación tubulina/AR.

018. (712) EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE LA VÍA HIPOTALÁMICA DE SEÑALIZACIÓN DE PRL DURANTE LA TRANSICIÓN ENTRE GESTACIÓN Y LACTANCIA TEMPRANA

Pennacchio G.¹; Ayala C.¹; Soaje M.^{1,3}; Jahn G.¹; Valdez S.^{1,2}

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET¹; Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Cuyo²; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza³.

El hipotiroidismo (HipoT) altera la secreción de PRL retrasando el parto y crecimiento de las crías. Las hormonas tiroideas podrían actuar sobre las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (TIDA), modulando la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de dopamina. PRL regula su secreción actuando sobre las TIDA que al final de la gestación disminuyen su sensibilidad a PRL inhibiendo la activación de STAT5b y estimulando la expresión de SOCS y CIS. Estudiamos el efecto del HipoT en estos mecanismos determinando la expresión del ARNm por PCR en tiempo real respecto al gen S16, de receptores de hormonas tiroideas (RTs) y de PRL (RPRL), de TH, STAT5b y de SOCS y CIS en hipotálamo medio basal. Se utilizaron ratas Wistar controles (Co) e HipoT en los días 19, 20, 21 de gestación (G19, G20 y G21) y 2 de lactancia (L2) sacrificadas a las 12 hs (n=6-8). El HipoT se indujo con 0.1 g/L de propiltiouracilo en agua de bebida (8 días antes de preñar las ratas hasta el sacrificio). Los resultados se correlacionaron con PRL, TSH y P₄ séricas (medidas por RIA). Se detectaron las isoformas de los RTs en Co e HipoT. En las Co, la expresión de RPRL (p<0.01), STAT5b (p<0.001), SOCS1 (p<0.01), 3 (p<0.01) y CIS (p<0.01) mostraron patrones similares disminuyendo en G20 y 21 respecto a G19. El HipoT, previno la caída de RPRL, disminuyó la expresión de STAT5b y SOCS1 en G19 (p<0.01 vs G19 Co) y las aumentó en G20 y 21 (p<0.05). La expresión de CIS, estuvo siempre aumentada (p<0.05 en G19 y p<0.01 en G20 y 21), sin afectar la expresión de SOCS3. TH disminuyó en Co en G21 (p< 0.001 vs G19 Co), en las HipoT cayó en G19 (p<0.05) pero aumentó en G21 y L2 (p<0.05). En conclusión, el HipoT disminuye la expresión de la vía de señalización de PRL y de TH en G19, pero aumenta después sugiriendo que atenúa la desensibilización del sistema neuroendocrino hipotalámico regulador de la secreción de PRL al final de la gestación, comprometiendo la eficiencia de la lactancia.

REPRODUCCIÓN 1

019. (12) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA NHERF1 (SODIUM-HYDROGEN EXCHANGER REGULATORY FACTOR 1) EN EL EPITELIO UTERINO DE RATA EN UN MODELO DE SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO O PCOS

Demacopulo B.¹; Rossich L.¹; Salvarredi L.¹; Cabrini R.^{1,2}; Juvenal G.¹; Kreimann E.¹

Comisión Nacional de Energía Atómica, Departamento de Radiobiología¹; Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires².

NHERF1 es una proteína adaptadora de membrana, expresada mayoritariamente en epitelios polarizados, que interactúa

con la proteína b-Catenina y estabiliza su unión con la proteína E-Caderina en las uniones adherentes de las células epiteliales. El gen que codifica para la proteína NHERF1 es regulado a nivel transcripcional por estrógenos y su expresión podría verse afectada por los cambios hormonales, tales los que como se observan en el síndrome de poliquistosis ovárica o PCOS. Estudios previos demostraron una alteración de la expresión de NHERF1 en tejido del epitelio uterino de ratas con PCOS. La proteína NHERF1 se acumuló en el aparato de Golgi con una clara disminución de su expresión fisiológica en zona cortical de la membrana celular. Estos análisis fueron realizados mediante la técnica de inmunohistoquímica, lo cual no permite una cuantificación exacta de la expresión del gen por tratarse de una técnica semicuantitativa. En este trabajo, se desarrolló un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa ó PCR en tiempo real para la detección de la expresión del gen de la proteína NHERF1 en células del epitelio uterino de ratas Wistar. Se establecieron las condiciones para la reacción de PCR en tiempo real para el gen de interés (NHERF1) y para gen de referencia o GADPH y se calculó la expresión relativa del gen NHERF1. Se analizaron úteros de ratas normales y ratas tratadas por 20 días con dehidroepiandrosterona (DHEA) como modelo de ovario poliquístico. En las condiciones establecidas, no se observaron diferencias en los niveles expresión de NHERF1 en las ratas tratadas con respecto a las ratas control (relación 1.03) lo que indicaría que la expresión de NHERF1 no se modifica por el tratamiento con DHEA. Los cambios observados en su localización podrían afectar claramente el rol de NHERF1 a nivel de membrana, lo cual se analizará en futuros estudios.

020. (76) RELACIÓN ENTRE LOCALIZACIÓN GONADAL Y EXPRESIÓN DE MARCADORES DE RIESGO TUMORAL EN PACIENTES PREPUBERALES CON DESORDEN DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL (DSD)

Aliberti P.¹; Berensztein E.¹; Costanzo M.¹; Guercio G.¹; Marino R.¹; Ramirez P.¹; Pérez Garrido N.¹; Maceiras M.¹; Bailez M.²; Rivarola M.¹; Belgorosky A.¹

Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"¹; Servicio de Cirugía, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires².

Se ha propuesto que la co-expresión de OCT3/4 y de la proteína específica del testículo codificada en el cromosoma Y (TSPY) en gónadas disgenéticas representa una herramienta útil para predecir el riesgo de tumor de células germinales testiculares (TCGT). El objetivo: analizar la inmunoexpresión de OCT3/4 y de TSPY en gónadas de pacientes pre-púberes (PP) con desordenes de la diferenciación sexual (DSD), en función de la localización gonadal, del fenotipo clínico (Score de Masculinización Externa, EMS), del diagnóstico etiológico y de la edad cronológica (EC) al momento de la gonadectomía. Se estudiaron 37 gónadas de 36 pacientes PP DSD (46, XY sin diagnóstico molecular (n=11); síndrome de insensibilidad a los andrógenos completo o parcial (5); mutaciones en SF1 (4); mutación en WT1 (2); mosaicismo 45,X0/46,XY (6); 46, XX SRY negativo (8)) y 10 testículos PP normales (GrC). De acuerdo a la localización gonadal, las muestras fueron divididas en 3 grupos: GrA (intraabdominal) (15), GrI (inguinal) (15), GrS (escrotal o labioescrotal) (7). EC de la gonadectomía (años(a), mediana y rango): GrA 1,0a (0,1-12,0), GrI 1,6a (0,3-14,0), GE 2,3a (0,04-12,3) y GrC 0,16a (0,003-15). La co-expresión de OCT3/4-TSPY fue significativamente mayor en GrA 54% vs GrI + GrS 13%, p = 0,038. Co-expresión de OCT3/4-TSPY para EMS ≥ 7, n = 11 (43%) fue mayor que para EMS ≤ 3, n = 9 (25%). No hubo diferencias significativas en la co-expresión de OCT3/4-TSPY en función del diagnóstico o de la EC de la gonadectomía. La histología mostró alta correlación entre la presencia de carcinoma-in-situ y co-expresión de OCT3/4-TSPY y en el GrC no se observó expresión de OCT3/4-TSPY. En conclusión, estos resultados sugieren que en pacientes DSD, la localización abdominal de la gónada implicaría mayor riesgo de desarrollar TCGT. La falta de asociación con el diagnóstico etiológico o con la edad podría sugerir que el riesgo de TCGT estaría relacionado con un trastorno en la morfogénesis gonadal fetal.

021. (130) EL TRATAMIENTO CON VIP AUMENTA LA FAGOCITOSIS DE CÉLULAS APOPTÓTICAS POR MACRÓFAGOS PERITONEALES Y MODIFICA PARÁMETROS DE LA GESTACIÓN TEMPRANA EN LA CRUZA DE RATONES CBAXDBA

Gallino L.; Calo G.; Grasso E.; Hauk V.; Ramhorst R.; Pérez-Leirós C.

Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUBICEN-CONICET.

En la generación de la interfase materno-placentaria tienen lugar procesos de remodelación vascular con una alta tasa de apoptosis de células trofoblásticas que, como contrapartida, requiere la rápida remoción de cuerpos apoptóticos por fagocitos profesionales en un entorno inmunosupresor. Defectos en la remodelación de arterias espiraladas con pérdida de mecanismos de control homeostático en la interfase temprana se asocian a complicaciones gestacionales como la pre-eclampsia. La cruce alogeneica CBAXDBA se ha propuesto para modelar algunos signos de esta enfermedad y para ensayar drogas con potencial aplicación clínica. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) tiene efecto vasodilatador, trófico en células trofoblásticas, anti-inflamatorio sobre macrófagos y se expresa en la interfase temprana. En este trabajo analizamos el efecto del tratamiento de hembras CBAXDBA preñadas (día 6) con VIP sobre distintos parámetros de evolución de la gestación y en particular en la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos peritoneales. El tratamiento con VIP (1 nmol/200 µl PBS ip) o PBS (control) aumentó el número de embriones viables al día 9 ($P < 0,05$), su distribución simétrica en los cuernos uterinos, y el peso de las crías medido entre los días 13-15. A su vez, este tratamiento aumentó la fagocitosis de timocitos apoptóticos por macrófagos (% fagocitosis timocitos apoptóticos: VIP: $67,2 \pm 8,2$; PBS: $18,1 \pm 3,5$, $n=8$) y de perlas marcadas con CFSE medida por citometría, con mayor expresión por RTPCR de marcadores de perfil M2 de activación alternativo en estas células. Concluimos que el tratamiento con VIP mejora la evolución de la gestación temprana en la cruce CBAXDBA y favorece procesos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en la interfase materno-placentaria.

022. (148) ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GONADAL EN LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (LAGOSTOMUS MAXIMUS) DURANTE LA GESTACIÓN.

Insera P.^{1,3}; Charif S.^{1,3}; Schmidt A.¹; Di Giorgio N.²; Lux-Lantos V.²; Vitullo A.^{1,3}; Dorfman V.^{1,3}

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides, CONICET¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET²; CONICET³.

El eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG) controla el funcionamiento ovárico a través de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) y las hormonas gonadotróficas Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH). Posteriormente a la ovulación, y durante la preñez, los esteroides ováricos, Estradiol (E_2) y Progesterona (Pg), ejercen retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis. *L. maximus* es un roedor poliovulador masivo, con preñez prolongada y un evento de pseudo-ovulación durante la gestación. Con el objetivo de estudiar la actividad del eje HHG en la vizcacha durante la preñez, se analizó la expresión de GnRH, LH, E_2 y Pg y sus receptores ($RE\alpha$, $RE\beta$ y RPg). Se utilizaron vizcachas hembras adultas no preñadas ovulando (NPO) y sin ovular (NPNO), y hembras con preñez temprana (Ptem), media (Pmed) y tardía (Ptar) ($n = 5$ /grupo). Se observó aumento significativo ($p < 0,05$) de GnRH hipotalámica y LH sérica (mediante RIA) y E_2 y Pg séricas (mediante ELISA) en NPO vs NPNO y en Pmed vs Ptem y Ptar. El $RE\alpha$ se inmunolocalizó en el núcleo de neuronas del Área Preóptica, Núcleo Supraóptico y Eminencia Media, mientras que el $RE\beta$ presentó localización nuclear y citoplasmática en las mismas regiones. Mediante Western-blot y PCR en tiempo real

se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la expresión de $RE\alpha$ y RPg en Pmed vs Ptem, mientras que el $RE\beta$ no mostró diferencias significativas entre los grupos. La secuenciación de los productos amplificados mostró alta homología con respecto a rata y ratón, confirmando su identidad. El aumento de GnRH, LH, E_2 y Pg, conjuntamente con el aumento en la expresión de $RE\alpha$ y RPg durante la preñez media, al igual que en NPO, sugiere que el eje HHG de la vizcacha se reactivaría en mitad de la preñez promoviendo el reclutamiento, desarrollo y luteinización de folículos ováricos. (PIP-CONICET 0225/2011).

023. (150) EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF-1) REGULA LA FUNCIONALIDAD DE LA CÉLULA DE SERTOLI (CS)

Galardo M.; Regueira M.; Riera M.; Pellizzari E.; Cigorraga S.; Meroni S.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas "Dr. César Bergadá" (CEDIE)-CONICET.

HIF-1 ha sido relacionado con el metabolismo glucolítico en distintos tipos celulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar en CS la participación de HIF-1 en la regulación de mecanismos moleculares involucrados en la producción de lactato, fuente energética de las células germinales. Con el objeto de incrementar los niveles de HIF-1 α , cultivos de CS de rata de 20 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o tratados por distintos periodos de tiempo con cloruro de cobalto ($CoCl_2$ 300 μ M), inhibidor de las prolihidroxilasas que aumenta la estabilidad del HIF-1 α . Se analizaron: niveles de HIF-1 α , entrada de glucosa a la célula, actividad de LDH, producción de lactato y niveles de ARNm de GLUT1, MCT4, LDHA y PDK1. El $CoCl_2$ incrementó, como se esperaba, los niveles de HIF-1 α analizados por Western blot ($CoCl_2$: $5,4 \pm 0,5$ veces con respecto a B). Se observó que el $CoCl_2$ produce un aumento de: la entrada de glucosa (B: 524 ± 92 ; $CoCl_2$: 1874 ± 55 dpm/ μ gADN), la actividad de LDH (B: $22,6 \pm 0,6$; $CoCl_2$: $30,2 \pm 0,2$ mU/ μ gADN) y la producción de lactato (B: $6,7 \pm 0,3$; $CoCl_2$: $22,8 \pm 2,9$ μ g/ μ gADN) ($X \pm DS$, $n=3$, $*p < 0,05$). Asimismo, el $CoCl_2$ aumentó la expresión de genes que contienen elementos respondedores a hipoxia en su promotor: (GLUT1: $4,0 \pm 0,2$; MCT4: $1,7 \pm 0,1$; LDHA: $3,0 \pm 0,5$; PDK1: $2,7 \pm 0,3$ veces con respecto a B). Considerando que FSH regula la producción de lactato y la expresión de los genes mencionados en CS, nos propusimos evaluar si esta hormona regula la expresión de HIF-1 α . Observamos que en condiciones de normoxia FSH incrementó los niveles de ARNm ($2,3 \pm 0,4$) y de proteína de HIF-1 α ($4,6 \pm 0,5$ veces con respecto a B). Estos resultados sugieren que HIF-1 podría participar en la regulación por FSH de la producción de lactato en la CS en condiciones de normoxia.

024. (151) FENOTIPO Y GENOTIPO DEL GRUPO ABO EN SEMEN Y SU APLICACIÓN EN INFERTILIDAD HUMANA

Bruno C.¹; García Rosasco M.²; Barone S.¹; Alfaro S.¹; Cordisco Gonzalez S.¹; Brufman A.¹

Departamento de Bioquímica Clínica, Universidad Nacional de Rosario¹; CIC-Universidad Nacional de Rosario².

La infertilidad afecta cerca del 15% de las parejas en edad reproductiva. Las glicosiltransferasas A y B son las responsables de la conversión del antígeno H en A y B. El gen secretor (*Se*) controla la expresión de los antígenos ABH (Ags) en fluidos orgánicos y tienen un importante rol en la fertilidad. En estudios previos se observó una pérdida significativa de la movilidad progresiva del espermatozoide en individuos no secretores en relación con los secretores, causada por anticuerpos específicos del moco cervical en parejas ABO-incompatibles. Los Ags solubles bloquean los anticuerpos del moco, evitando o disminuyendo el ataque de los anticuerpos a las células espermáticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de Ags ABO celulares y solubles en hombres pertenecientes a parejas Fértiles e infértiles. Se estudiaron 97 muestras de semen de pacientes, 53 infértiles y 44 controles Fértiles. Para distinguir entre los genes A, B y O se diseñó una PCR con dos sets de oligonucleótidos que permiten amplificar dos regiones diferentes de las transferasas, sin uso de

enzimas de restricción. El fenotipo secretor fue determinado en plasma seminal por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH). Por comparación de las bandas de los productos de PCR, se determinó el genotipo individual. El carácter Secretor fue analizado en todas las muestras. En el primer grupo, la frecuencia del fenotipo no-Secretor (75.8%) fue significativamente superior que en Fértiles (21.8%) ($p < 0.03$). A pesar de los avances en la tecnología reproductiva, la incidencia de infertilidad continúa aumentando. La estrategia desarrollada es precisa, simple, rápida y sensible. El fenotipo secretor en el hombre, puede facilitar el éxito reproductivo bloqueando los anticuerpos ABO cervicales. Se propone evaluar la expresión de los Ags ABH en la membrana de los espermatozoides y el plasma seminal para contribuir al estudio de la infertilidad humana.

025. (185) LA EDAD Y LA TERAPIA ESTROGÉNICA COMO FACTORES PREDISONENTES PARA EL DESARROLLO DE ANORMALIDADES UTERINAS EN LA RATA

Bosquiazzo V.^{1,2}; Vigezzi L.¹; Ramos J.^{1,2}; Muñoz-De-Toro M.¹; Luque E.¹

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes¹; Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral².

Los estrógenos (Eg) son utilizados en las terapias hormonales de reemplazo en mujeres post-menopáusicas. Nuestro primer objetivo fue estudiar la respuesta uterina a un tratamiento prolongado con Eg en ratas adultas. Hembras Wistar de 360 días de edad (DPN360) se dividieron en dos grupos. Un grupo de animales se sacrificó en estro (DPN360-estro), mientras que el otro se ovariectomizó y se trató con vehículo (aceite de maíz) o 17 β -estradiol (E2, 1mg/ml) por vía sc durante 3 meses (DPN460-OVX+vehículo y DPN460-OVX+E2, respectivamente). La histología uterina se analizó en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. En DPN360-estro se demostró una variedad de alteraciones glandulares: glándulas quísticas, hipertróficas, con atipias nucleares (núcleos hipocromáticos) y con metaplasias escamosas. La histología del útero en DPN460-OVX+vehículo exhibió signos de atrofia, escasa matriz extracelular del estroma y glándulas uterinas con un lumen estrecho y epitelio cúbico, sin anomalías glandulares. En las ratas DPN460-OVX+E2 se evidenciaron las mismas anomalías glandulares que se encontraron en DPN360-estro y, además, se observaron glándulas con glándulas hijas. Así, nuestro segundo objetivo fue investigar si el desarrollo de las glándulas con glándulas hija observadas en úteros de DPN460-OVX+E2 se debía al E2, la edad de los animales, o una combinación de ambos. Para responder a esta pregunta se desarrollaron 2 experimentos. Expto1: se usó el mismo modelo de OVX+E2 pero en ratas jóvenes (DPN90). Estos animales mostraron signos característicos de efecto estrogénico, pero sin anomalías glandulares. Expto2: ratas hembras se sacrificaron en PND460 en estro (sin tratamiento con E2). En este grupo de ratas se observaron glándulas con glándulas hija como en DPN460-OVX+E2. Los resultados demostraron que la edad de los animales es un factor predisponente para el desarrollo de anomalías glandulares en el útero de la rata y que el E2 actuaría como facilitador de este efecto.

026. (193) SUBFERTILIDAD Y EXPOSICIÓN POSTNATAL A ENDOSULFÁN: ALTERACIONES EN LA PROLIFERACIÓN ENDOMETRIAL Y EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ENDÓCRINA COMO POSIBLES MEDIADORES

Milesi M.; Varayoud J.; Muñoz-De-Toro M.; Luque E.
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

En un trabajo previo determinamos que ratas expuestas durante la primera semana de vida postnatal al pesticida Endosulfán (END), presentan una disminución en la fertilidad, evidenciada por un menor porcentaje de preñez y de embriones implantados. En el presente trabajo, nos propusimos determinar si esta subfertilidad

está asociada a fallas en los procesos de proliferación endometrial y su regulación endocrina en el período pre-implantatorio. Crías hembra de ratas fueron tratadas vía sc los días postnatales 1, 3, 5 y 7 con END (600 ug/kg/día) y aceite de maíz (grupo control). Cuando alcanzaron la adultez, se obtuvieron muestras de útero en día 5 de preñez (período pre-implantatorio), y se determinó por inmunohistoquímica la proliferación endometrial y la expresión de proteínas cruciales en el proceso de implantación: Hoxa10, receptores esteroides [receptor de estrógenos alfa (REa) y de progesterona (RP)], y sus coreguladores, SRC-1 (coactivador de receptor esteroide-1) y SMRT (mediador del silenciamiento para los receptores de ácido retinoico y tiroideos). Las hembras tratadas postnatalmente con END mostraron una disminución en la proliferación en el estroma subepitelial (C: 3.5 \pm 0.5; END: 1.7 \pm 0.2), asociada con un silenciamiento en la expresión de Hoxa10 en la misma región tisular (C: 2.6 \pm 0.2; END: 1.6 \pm 0.2) ($p < 0.05$). El tratamiento con END indujo un incremento en la expresión de REa (C: 2.7 \pm 0.2; END: 4.2 \pm 0.3) y RP (C: 2.5 \pm 0.3; END: 4.8 \pm 0.6), y una desregulación en la expresión de sus coreguladores en las células estromales. Se detectó un aumento en la expresión de SMRT (C: 0.4 \pm 0.2; END: 1.6 \pm 0.1) y una disminución en la expresión de SRC-1 (C: 1.1 \pm 0.2; END: 0.6 \pm 0.1) ($p < 0.05$) en los animales expuestos a END. Las alteraciones en la proliferación endometrial y en las vías de señalización endócrina mediadas por receptores esteroides y Hoxa10, durante el período previo a la implantación, podrían explicar la subfertilidad detectada por la exposición postnatal a END.

027. (198) ENTORNO PRO-INFLAMATORIO, ALTERADA REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y MENORES NIVELES DEL COACTIVADOR DE PPARGAMMA 1 EN LA PLACENTA DE PACIENTES CON DIABETES TIPO 2.

Fornes D.¹; Higa R.¹; Fernández Romero T.²; Di Marco I.³; Basualdo M.³; Faingold C.⁴; Capobianco E.¹; Jawerbaum A.¹
Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-UBA¹; Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria De Girón, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Cuba²; Hospital Ramón Sarda, CABA, Buenos Aires, Argentina³; Hospital César Milstein, CABA, Buenos Aires, Argentina⁴.

En la placenta de pacientes con diabetes tipo 2 se han evidenciado alteraciones de tipo pro-inflamatorias asociadas a una mayor actividad de metaloproteasas (MMPs), enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular y a menores niveles de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) α y γ , que ejercen efectos antioxidantes y anti-inflamatorios. Objetivo: Estudiar los niveles de componentes de la matriz extracelular y de reguladores de su deposición, niveles del coactivador de PPAR γ (PGC1) y la capacidad de agonistas de PPAR de regular la actividad de MMP9 en la placenta de pacientes con diabetes tipo 2. Métodos: Con protocolo aprobado y consentimiento informado de las pacientes sanas (C) y con diabetes tipo 2 (D), se obtuvo el tejido placentario en el alumbramiento. Se evaluaron por inmunohistoquímica los niveles de PGC1, factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), colágeno, fibronectina y mieloperoxidasa (marcador de infiltración de neutrófilos). Explantes placentarios fueron incubados en presencia de 15deoxydelta^{12,14}Prostaglandin na₂ (15dPGJ₂ 2 μ M, agonista de PPAR γ), y leucotrieno B₄ (LTB₄ 0.1 μ M, agonista de PPAR α) para determinar su efecto sobre la actividad de MMP9 en el medio de incubación mediante zimografía. Resultados: Los niveles de colágeno, CTGF y mieloperoxidasa están incrementados en placentas D (66%, 1780% y 238% respectivamente, $p < 0,01$), mientras que los niveles de fibronectina y PGC1 están reducidos en placentas D con respecto a C (79%, $p < 0,01$). Se observa ausencia de regulación de la actividad de MMP9 en presencia de agonistas de PPAR α y PPAR γ en las placentas D. Conclusiones: la diabetes tipo 2 conduce a un estado pro-inflamatorio en la placenta, posiblemente relacionado a anomalías en la vía de señalización de los PPAR, a una alterada regulación de los procesos de remoción y deposición de la matriz extracelular y a la infiltración de células del sistema inmune.

028. (204) LA ADHESIÓN DE ESPERMATOZOIDES A CÉLULAS OVIDUCTALES ES INFLUENCIADA POR LOS DOMINIOS RECEPTOR SCAVENGER RICOS EN CISTEÍNA (SRCR) PRESENTES EN DELETED IN MALIGNANT BRAIN TUMOR 1 (DMBT1) EN PORCINOS

Roldan L.^{1,2}; Marini P.^{1,2}

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET¹; Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario².

Como parte del proceso reproductivo algunos espermatozoides se unen al epitelio oviductal. DMBT1 se localiza en la superficie extracelular de las células epiteliales del oviducto (CEO) porcino y humano, mostrándose accesible a la interacción con los espermatozoides y se une *in vitro* a su región periacrosomal. DMBT1 posee dominios de receptor scavenger rico en cisteínas (SRCR), dominios interspaciadores de SRCR (SIDs) dominios C1r/C1s Uegf Bmp1 (CUB) y dominio zona pelúcida (ZP). Teniendo en cuenta la característica multidominio de DMBT1 es que nos propusimos evaluar cuál/es de ellos están involucrados en la unión espermatozoides-oviducto. Se realizaron co-incubaciones de cultivos primarios de CEO porcino con espermatozoides y con el agregado de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-dominios (2; 4 y 8 μ L a-CUB y 2; 4; 6; 8 y 12 μ L a-SRCR) o del suero pre-inmune de conejo correspondiente. El número de espermatozoides unidos en presencia de anticuerpo se relativizó con respecto al número de espermatozoides unidos en ausencia del mismo o del suero pre-inmune. Para el análisis estadístico se utilizó el test de ANOVA (software GradPad Prism 6.02). Se consideró que las diferencias eran significativas cuando $p < 0,05$. Se observó que hay una tendencia a disminuir el número de espermatozoides unidos dependiente de la concentración del anticuerpo a-SRCR. Por otra parte, el anticuerpo a-CUB no demostró tener un efecto significativo en la adhesión de los espermatozoides a CEO porcino. Estos resultados indican que los dominios SRCR intervienen en la unión espermatozoide-oviducto. Considerando que dicha interacción es mediada por glicanos presentes en las CEO y que tanto los dominios SRCR como los SIDs son sitios putativos de glicosilación, los anticuerpos a-SCRC podrían estar bloqueando el acceso a estos glicanos, impidiendo la unión de los espermatozoides, o bien los polipéptidos SRCR podrían ser sitios directos de unión.

029. (211) IMPACTO DE LA SOBRECARGA DE GRASAS SATURADAS EN LA DIETA MATERNA SOBRE LA PROGRAMACIÓN DE ALTERACIONES METABÓLICAS EN HÍGADO E INTESTINO DE LA DESCENDENCIA DE RATA

Mazzucco M.; Kurtz M.; Martínez N.; Jawerbaum A.; White V. *Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-UBA.*

Las anomalías metabólicas de la madre con sobrepeso promueven la acumulación de lípidos en el feto en desarrollo, induciendo alteraciones en el metabolismo fetal y neonatal, ligadas al estrés oxidativo e inflamación y vinculadas a la inducción de enfermedades metabólicas en el adulto. Las incretinas como el GIP (péptido inhibitorio gastrointestinal) son producidas por el intestino y modulan la homeostasis metabólica del organismo. **Objetivos:** Estudiar el impacto de la sobrecarga de grasas saturadas en la dieta materna sobre la triglicéridemia, la producción de óxido nítrico (NO) y la lipoperoxidación en el hígado e intestino fetal y de la cría y la expresión intestinal de GIP. **Metodología:** Ratas Wistar fueron alimentadas con dieta estándar (5% de lípidos) (grupo DS) o suplementada con un 25% de grasas saturadas (grupo DG) desde 7 semanas previas al apareo con machos DS y hasta finalizar la lactancia. Un grupo fue sacrificado el día 21 de gestación para la obtención de fetos y otro continuó con la preñez y sus crías fueron sacrificadas el día 21 post-natal. Se dosaron triglicéridos (TG) y colesterol en plasma mediante equipos comerciales. La producción de NO (dosaje de nitratos/nitritos) y niveles de TBARS se analizaron en hígado e intestino. La expresión de GIP se dosó por PCR. **Resultados:** El grupo DG mostró niveles

de TG elevados en fetos y crías (50-83%, $p < 0,01$), incrementos en la producción de NO en el hígado e intestino fetal y de la cría ($p < 0,05$), niveles elevados de TBARS en el hígado fetal y de la cría (29-148%, $p < 0,01$) y en el intestino de la cría (25%, $p < 0,05$) y disminución en la expresión de GIP fetal y de la cría (20-19%, $p < 0,05$) respecto del control. **Conclusiones:** La sobrecarga de grasa en la dieta materna altera la expresión de incretinas e induce un estado pro-oxidante y pro-inflamatorio en el hígado e intestino del feto, programando alteraciones metabólicas que persisten en la descendencia.

030. (251) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC) EN LA REABSORCIÓN EMBRIONARIA (RE) INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)

Wolfson M.¹; Correa F.¹; Cymeryng C.¹; Schander J.¹; Bradshaw H.²; Leishman E.²; Vercelli C.³; Franchi A.¹

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-UBA¹; Department of Psychological and Brain Sciences, Indiana University²; Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)-CONICET-Max Planck³.

Se ha demostrado una estrecha asociación entre el aborto y concentraciones plasmáticas elevadas del principal endocannabinoide (anandamida), así como con niveles disminuidos de su enzima metabolizante (hidrolasa de amidas de ácidos grasos, FAAH) en linfocitos periféricos. Previamente hemos desarrollado un modelo murino de RE inducida por LPS que produce un 100% de RE y cuya fisiopatología está asociada a la producción elevada de óxido nítrico y a una disminución de los niveles de progesterona (P). El objetivo central de este trabajo fue estudiar si el SEC participa en la inducción de la RE por LPS. En primer lugar observamos que los niveles plasmáticos de AEA (HPLC-Espectrometría de Masa) aumentaban luego del tratamiento con LPS ($p < 0,05$). Por otro lado encontramos que la RE inducida por LPS era mucho menor en ratones transgénicos deficientes en el receptor de cannabinoides tipo 1 ($p < 0,05$), como así también la disminución de los niveles séricos de P ($p < 0,05$). Durante la RE, la decidua es infiltrada por células del sistema inmune, sufre importantes daños y finalmente es expulsada. Investigamos el efecto de la infiltración leucocitaria sobre la actividad de FAAH en las deciduas mediante un sistema de cocultivo. Cuando las deciduas de animales controles se cultivan en presencia de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de animales tratados con LPS, la actividad de la FAAH decidual disminuye ($p < 0,05$), efecto que fue revertido por la P y por un inhibidor selectivo de la NOSi, aminoguanidina ($p < 0,05$). Asimismo observamos un aumento en la nitración de las proteínas deciduales y específicamente de la FAAH cuando se cocultivaban junto a las PBMC de animales tratados con LPS y que este efecto es revertido por la P ($p < 0,05$). Este trabajo demuestra el SEC participa en la RE inducida por LPS y que los cambios de este sistema en la decidua están influenciados tanto por las células inmunes infiltrantes como por alteraciones en el sistema endócrino.

031. (280) EL ENDOSULFAN AFECTA LA DESCONDENSACIÓN DE LA CROMATINA DEL NÚCLEO ESPERMÁTICO DE RATÓN

Sánchez M.¹; Lo Nostro F.²; Romanato M.¹; Julianelli V.¹; Calvo L.¹; Calvo J.^{1,2}; Fontana V.^{1,2}

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

La descondensación de la cromatina espermática es requisito para la singamia y requiere la tiorreducción de disulfuros de protaminas asociadas al ADN y el intercambio con histonas ovocitarias. Pesticidas como el endosulfán podrían alterar este proceso. **Objetivos:** Evaluar en sistema murino el efecto del endosulfán sobre la descondensación de la cromatina espermática. **Metodología:** Se obtuvieron espermatozoides epididimarios de ratones CF-1, y se incubaron con concentraciones crecientes de endosulfán puro o formulado (100 pM a 100 μ M), usando medio

o DMSO como controles. Para evaluar la descondensación, se incubaron 1-2 x10⁶ espermatozoides con Heparina y GSH durante distintos tiempos a 37 °C en 5% CO₂. Se fijaron con glutaraldehído al 2% y se determinó en microscopio con contraste de fase el porcentaje de espermatozoides descondensados. Se analizó el estado redox de las protaminas asociadas al DNA espermático incubando con endosulfán (100 µM) y medio o DMSO utilizando el reactivo monobromobimane (mBBR), observando con microscopio de fluorescencia y analizando con el programa Image J. Los experimentos se realizaron por duplicado evaluando 200 células en cada muestra. Resultados y conclusiones: El endosulfán puro produce un aumento significativo de la descondensación cuando los espermatozoides se incuban con una concentración de 1 µM y 100 µM (p<0.05 y p<0.001 respectivamente versus GSH + Heparina). Al utilizar endosulfán comercial solo se ve diferencia con la concentración más alta (100 µM) (p<0.001). Al evaluar el efecto de este pesticida sobre el estado redox de las protaminas no se obtuvieron diferencias significativas entre los controles y los tratamientos. Los resultados obtenidos descondensando in vitro espermatozoides previamente incubados con endosulfán, manifiestan que este modelo podría utilizarse como centinela para evaluar posibles efectos de tóxicos ambientales.

032. (328) EL BLOQUEO DE ANGIOPOYETINA1 (ANGPT1) EN FLUIDOS FOLICULARES (FF) DE PACIENTES JÓVENES CON BAJA RESPUESTA OVÁRICA A GONADOTROFINAS AFECTA EL DESARROLLO VASCULAR

Scotti L.¹; Pascuali N.¹; Abramovich D.¹; Durand L.¹; De Zúñiga I.²; Bisioli C.²; Tesone M.¹; Parborell F.¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Pregna Medicina Reproductiva².

Las pacientes que fallan en obtener un adecuado número de ovocitos luego de la estimulación con gonadotropinas en las técnicas de reproducción asistida (ART) son consideradas bajas respondedoras (BR). Actualmente, afecta a un 20-30% de las mujeres que se someten a ART. Dado que la angiogénesis es esencial para la funcionalidad ovárica, nuestro objetivo general fue estudiar los eventos que participan en el desarrollo vascular en pacientes BR. Se ha observado que pacientes BR poseen ovarios con características de luteinización temprana. Previamente observamos que los niveles de la angiopoietina1 (ANGPT1) se encuentran elevados en fluidos foliculares (FF) de pacientes BR comparado a pacientes controles (C). Los objetivos específicos fueron: a) Evaluar el efecto que produce inhibir ANGPT1 mediante un anticuerpo neutralizante en FF de pacientes BR (n=17; 0-5 ovocitos) y C (n=17; 0-5 ovocitos) sobre la migración celular, la tubulogénesis (Matrigel) y la expresión de claudina-5 (uniones estrechas) en una línea de células endoteliales (EA.hy926) y b) Analizar el efecto de estos FF preincubados con el Ac. ANGPT1 sobre un modelo de angiogénesis in vivo (membrana corioalantoidea de embrión de codorniz, CAM). Los resultados mostraron que la migración y la formación de túbulos (número de polígonos, ramificaciones vasculares y área tubular) en presencia de FF de BR fue mayor comparada a FF de C (p<0,05). El bloqueo de ANGPT1 en FF de BR disminuyó estos parámetros (p<0,05). Por western blot, no se observaron diferencias significativas en los niveles endoteliales de claudina-5 en los grupos experimentales. Mediante el ensayo CAM, se observó un aumento en las ramificaciones y en el calibre vascular en presencia de FF de BR (p<0,05). La inhibición de ANGPT1 lo revirtió (p<0,05). En conclusión, se sugiere que la inhibición de ANGPT1 en los FF de pacientes BR afecta la angiogénesis pero no altera las uniones estrechas entre células endoteliales.

033. (336) PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH Y PROGESTERONA EN LA PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS LUTEAL

Accialini P.¹; Hernández F.¹; Bas D.¹; Abramovich D.¹; Tesone M.^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

El sistema Notch comprende una familia de receptores transmembrana (Notch1-4) que interactúan con ligandos Delta-like y Jagged. Los receptores son clivados luego de su unión al ligando por dos proteasas, siendo la gamma secretasa la que libera el dominio intracelular que se transloca al núcleo regulando la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. En trabajos previos hemos demostrado que los receptores Notch1, 4 y el ligando DLL4 se expresan en el cuerpo lúteo (CL) de ratas preñadas, y que el bloqueo intraovárico del sistema Notch disminuyó los niveles de Progesterona (P4) sérica y aumentó la expresión de proteínas pro apoptóticas en el CL. La hipótesis del presente trabajo es que la P4 cumple un rol clave en la regulación de la vía de Notch y en la función luteal del CL de ratas superovuladas. En este estudio se aislaron CLs de ovario de ratas superovuladas con gonadotropinas y se cultivaron en presencia de P4 (500ng/ml), aminoglutetimida (AG, inhibidor del citocromo P450scc 0,15mM), DAPT (inhibidor de la gamma secretasa, 20µM) y los inhibidores del agregado de P4. La función luteal fue estudiada midiendo P4 en el medio de cultivo por RIA. El contenido proteico y la fosforilación de AKT fueron medidas en extractos de CLs por Western blots. El tratamiento de los CLs con cada inhibidor disminuyó la producción de P4 (P <0.05, n= 4). Los niveles del marcador de proliferación PCNA aumentaron significativamente (P <0.05, n= 4) con el agregado de P4 y el DAPT revirtió este efecto. Este resultado también fue corroborado por Inmuno HistoQuímica. La relación entre las proteínas pro y anti apoptóticas Bax/Bcl-X_L aumentó significativamente (P <0.05, n= 4) con el agregado de DAPT y la P4 revirtió el efecto. La fosforilación de AKT disminuyó con el agregado de DAPT (P <0.05, n= 4), efecto revertido por P4. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo regulatorio entre la vía de señalización de Notch y la P4 que afecta la proliferación y apoptosis luteal.

034. (383) CARACTERIZACIÓN BÁSICA DE ENTIDAD PROTEICA QUE REVIERTIENE LA CAPACITACIÓN EN EL PLASMA SEMINAL HUMANO

Puga Molina L.¹; Verstraeten S.²; Buffone M.¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

El espermatozoide eyaculado de mamíferos no es capaz de fertilizar al ovocito; debe adquirir capacidad fertilizante durante la migración por el tracto reproductor femenino en un proceso complejo y estrictamente regulado denominado capacitación. En este contexto, se sabe que el plasma seminal es capaz de mantener al espermatozoide en estado no capacitado antes de la migración al sitio de fertilización. El objetivo de este trabajo es caracterizar la capacidad inhibitoria del plasma seminal humano (PS) y la naturaleza química del principal componente inhibitorio. Para caracterizar el efecto del PS sobre eventos asociados a la capacitación, incubamos espermatozoides humanos en medio capacitante a distintos tiempos y luego los tratamos con PS al 50%v/v durante tres horas. Mediante la técnica de Western Blot determinamos los sustratos fosforilados de Proteína Kinasa A (pPKAs) y los de Tirosinas Kinasa (pY) en las diferentes condiciones. Como resultado, observamos que el PS tiene la capacidad de revertir estos eventos asociados a la capacitación a distintos tiempos. Con el fin de determinar la naturaleza química del compuesto inhibitorio, evaluamos si este efecto se debe principalmente a una entidad proteica. Para ello, precipitamos las proteínas del PS con sulfato de amonio y caracterizamos los mismos eventos en presencia del precipitado. A su vez, ensayamos si el efecto del PS prevalecía luego de someterlo a condiciones de desnaturalización proteica por calor o a la digestión por Tripsina. Como resultado, obtuvimos que el efecto inhibitorio permanece en la fracción proteica del PS, no así en el PS desnaturalizado por calor o degradado por Tripsina. En conclusión, proponemos que el PS revierte eventos asociados a la capacitación, que esa inhibición no depende del tiempo de incubación en medio capacitante, y que esta característica sería principalmente debida a una entidad proteica.

035. (454) INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE P-GLICOPROTEÍNA (P-GP) EN EL TÚBULO SEMINIFERO DE RATAS PREPÚBERES TRATADAS CON MONO-2-ETHILHEXIL FTALATO (MEHP)

Sobarzo C.¹; Denduchis B.¹; Lustig L.¹; Naito M.^{1,2}
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Department of Anatomy, Tokio Medical University, Tokio, Japan.².

El MEHP es un tóxico ambiental que induce daño en el epitelio germinal del tubo seminífero. Previamente detectamos en el testículo de ratas prepúberes tratadas con MEHP, alteraciones en la expresión de N-cadherina, cateninas y ZO-1 en las uniones intercelulares del epitelio seminífero. En la membrana plasmática de las células de Sertoli se expresa P-gp, glicoproteína miembro de la familia de las moléculas transportadoras ABC (ATP binding cassette), denominadas "bombas de flujo" que impiden el pasaje de sustancias nocivas al interior de la célula. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de P-gp en ratas tratadas con MEHP. Se intoxicaron ratas Sprague Dawley de 25 días de edad, con una única dosis de MEHP (1 g/kg de peso corporal) (E), vía "gavage". A las ratas controles se les administró aceite usado como vehículo (C). Ambos grupos fueron sacrificados 3, 6, 12 y 24 hr. post-tratamiento. Por técnica de TUNEL se detectó un aumento significativo ($p < 0.01$) de células germinales apoptóticas a partir de las 3 h, alcanzando un máximo a las 6 h en las ratas E vs C. El MEHP indujo un aumento en la permeabilidad de la barrera hemato-testicular, evidenciado por la presencia de biotina en el compartimiento adluminal. P-gp se localizó a nivel del epitelio seminífero con un patrón de inmunofluorescencia (IF) lineal y discontinuo en ratas E y C siendo la intensidad de la IF mayor en los testículos de las ratas E. Por microscopía confocal se detectó un aumento en la co-localización de Pgp y claudina-11 (marcador de unión inter-Sertoli) en el epitelio seminífero a las 6 h post-tratamiento en las ratas E vs C. Por Western blot se observó, un significativo aumento en la expresión de Pgp en las ratas E vs C ($p < 0.01$) a partir de las 3 h post-tratamiento y con un pico máximo a las 6h. El aumento en la expresión de Pgp respondería a un intento, no exitoso, de las células de Sertoli de proteger a las células germinales de la acción del tóxico MEHP.

036. (519) EFECTO DE LA LEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE HLA-G EN CÉLULAS TROFBLÁSTICAS

Barrientos G.¹; Toro A.¹; Garcia M.⁴; Maskin B.³; Blois S.²; Varone C.¹
Laboratorio De Fisiología Molecular Placentaria, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratory of Reproductive Medicine, Charité University of Medicine Berlin, Germany²; Hospital Nacional A. Posadas, Buenos Aires, Argentina³; Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Buenos Aires, Argentina⁴.

Uno de los mecanismos de inmunomodulación más importantes durante la gestación es la expresión diferencial en el trofoblasto del antígeno MHC no clásico HLA-G, con efectos inhibitorios sobre la inmunidad materna. La expresión de HLA-G es considerada una marca molecular del trofoblasto invasivo, pero los mecanismos que modulan este proceso de diferenciación son poco conocidos. Como citoquina placentaria, la leptina (Lep) modula diferentes procesos importantes para la gestación incluyendo la proliferación y la invasión trofoblástica, por lo cual el objetivo de este trabajo fue investigar sus efectos en la expresión de HLA-G en células placentarias. **Diseño:** Se utilizaron las líneas celulares JEG-3, BeWo y Swan 71 y explantos de placentas normales a término de la gestación, cultivados en presencia de Lep recombinante en dosis de 10-250 ng/ml por 48 o 24 h, respectivamente. La expresión de HLA-G fue analizada por RT-PCR cuantitativa, western blot, e inmunofluorescencia. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética Hospitalaria del Hospital Nacional Prof. A. Posadas. **Resultados:** Se observó un aumento significativo en los niveles de mRNA de HLA-G total en respuesta a 25 ng/ml

Lep ($p < 0.05$). En explantos de placenta, la estimulación con 250 ng/ml Lep aumentó significativamente la expresión de HLA-G, tanto a nivel de proteína como mRNA ($p < 0.01$). El tratamiento con Lep (25-50 ng/ml) incrementó los niveles de la isoforma HLA-G1 ($p < 0.05$), no observándose diferencias en los niveles de -G2/G4. Lep también incrementó significativamente la expresión citoplásmica de HLA-G1 en células JEG-3 ($p < 0.005$) analizada por inmunofluorescencia. **Conclusiones:** Leptina promueve la expresión de isoforma de HLA-G1 en células trofoblásticas, de acuerdo con su rol estimulador de la invasión durante el proceso de placentación. Los resultados posicionan a leptina como una citoquina placentaria capaz de estimular mecanismos de evasión inmune en las células del trofoblasto.

037. (543) EXPRESIÓN DE LAS CITOQUINAS ASOCIADAS A LA OVULACIÓN, IL6 E IL1 α , EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE VACAS CON ENFERMEDAD QUIÍSTICA OVÁRICA (COD)

Baravalle M.; Stassi A.; Velazquez M.; Belotti M.; Díaz P.; Peralta B.; Salvetti N.; Ortega H.
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVET)-Litoral-CONICET, Santa Fe.

La ovulación ha sido considerada como un proceso inflamatorio localizado y teniendo en cuenta los factores que intervienen en este proceso, la alteración de ellos podría contribuir a la patogenia de la enfermedad quística ovárica (COD), uno de los desórdenes reproductivos más frecuentes en el ganado bovino lechero. A nivel local, las citoquinas cumplen papeles fundamentales debido a que influyen sobre la producción de diversos mediadores inflamatorios. En el ovario, las citoquinas son secretadas tanto por células del sistema inmune como por células somáticas como las células de la granulosa y de la teca. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar los niveles de expresión de las interleuquinas-6 (IL-6) e IL-1 α , en ovarios de animales con COD de presentación espontánea y en controles en preestro. Se evaluó la expresión génica de IL-6 e IL-1 α mediante PCR en tiempo real, en muestras de células foliculares obtenidas mediante aspirado folicular en animales con COD y controles sincronizados; y la expresión de las proteínas mediante inmunohistoquímica indirecta en la pared de folículos quísticos y preovulatorios antrales. El ARNm de ambas ILs fue detectado en las células foliculares de todas las muestras de quistes, mientras que su expresión se limitó a solo el 20% de las muestras de folículos antrales, sin diferencias significativas. La evaluación de las proteínas mediante inmunohistoquímica mostró una mayor expresión para IL-1 α en células de granulosa de quistes respecto de las de folículos antrales ($p < 0.05$). Sin embargo la expresión en células de teca fue similar en ambos grupos. Para IL-6, se observó una mayor expresión en células de teca y granulosa de quistes, respecto de folículos provenientes de animales controles ($p < 0.05$). Estos resultados nos permiten sugerir que existe una alteración en los mecanismos asociados al proceso inflamatorio y que las interleuquinas, como factores intervinientes en este proceso podrían ser parte de la patogenia de esta enfermedad.

038. (694) EFECTOS DE LA OBESIDAD MATERNA PRODUCIDA POR UNA DIETA ALTA EN GRASAS SOBRE LA PREÑEZ Y EL DESARROLLO DE LAS CRIAS

Bariani M.; Domínguez Rubio A.; Aisemberg J.; Franchi A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET-UBA.

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial cuya prevalencia ha aumentado en las últimas décadas, siendo uno de los principales problemas de la salud pública. La obesidad materna aumenta el riesgo de complicaciones durante el embarazo ya que la salud de la madre afecta el medio ambiente intrauterino y por lo tanto el desarrollo fetal, la salud neonatal y, a largo plazo, la del adulto. Nuestro objetivo fue desarrollar un modelo de obesidad en ratón por ingesta de una dieta alta en grasas (DAG) para evaluar posibles efectos de la obesidad sobre la preñez y en el desarrollo de las crías. Hembras de la cepa CD1 de 1 mes de edad fueron alimentadas durante 6 meses con una dieta control (alimen-

to estándar) o con una dieta alta en grasas (alimento estándar + 30% grasa). Se determinaron distintos parámetros asociados al desarrollo de obesidad. Observamos un aumento en el peso ($p < 0,05$) de las hembras alimentadas con la DAG respecto al de las controles, a partir de los 3 meses de alimentación, sin encontrar diferencias ($p > 0,05$) en la ingesta promedio de kilocalorías/día entre ambos grupos. El peso del tejido adiposo abdominal fue mayor ($p < 0,05$) en las hembras alimentadas con la DAG. Además, observamos en estos animales un aumento ($p < 0,05$) en los niveles sanguíneos de colesterol y de colesterol de alta densidad y una menor tolerancia a la glucosa ($p < 0,05$). Evaluamos los niveles de triglicéridos y glucosa en sangre, sin encontrar diferencias entre ambos grupos. Luego de 3 meses de dieta las hembras se aparearon con machos CD1 controles. Se evaluó el porcentaje de preñez, la duración de la misma y el tamaño de la camada, sin encontrar diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, las crías nacidas de madres obesas presentaron un mayor peso durante la lactancia. Estos resultados nos sugieren que la obesidad materna produce consecuencias en el desarrollo de las crías.

039. (697) EL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) MODULA LOS NIVELES DE AMPc EN EL ÚTERO DE RATÓN PREÑADO A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES TIPO 2 (RCB2)

Salazar A.¹; Schiariti V.¹; Carozzo A.²; Davio C.²; Franchi A.¹
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET¹; Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Las infecciones intrauterinas pueden desencadenar la pérdida de la preñez. Bacterias Gram-negativas inducen parto prematuro y aborto temprano por la producción de moléculas inflamatorias. Para que ocurran con éxito los eventos normales de la preñez se necesita una regulación del sistema endocannabinoide (SEC) tanto en el embrión como en el útero receptivo. Se sabe que alteraciones en el SEC pueden impactar en el normal desarrollo de la gestación. El útero de ratón preñado expresa las enzimas que sintetizan y degradan la anandamida (AEA), el cannabinoide (CB) de mayor abundancia en éste órgano, como así también los RCB 1 y 2. Hemos observado que los CBs median el efecto deletéreo del LPS sobre el útero de ratón preñado, como así también el aumento del óxido nítrico y prostaglandinas inducido por la endotoxina. Evaluamos las vías de señalización que podrían estar involucradas en el desencadenamiento del aborto temprano inducido por LPS y la participación de los CBs en este evento. Se midieron los niveles de AMPc, un segundo mensajero que mantiene la quiescencia uterina durante la preñez. Al incubar fragmentos uterinos de día 7 de preñez de ratones Balb/C tanto con LPS (1ug/ml) como con distintas concentraciones de meta-AEA (un análogo no hidrolizable de la AEA), observamos una disminución en los niveles de AMPc con respecto al control ($p < 0,05$). Un antagonista del RCB2 revirtió totalmente el efecto del LPS sobre los niveles de AMPc ($p < 0,05$). Fragmentos uterinos de ratones de la cepa CD1, *wild type* y *knock-out* para RCB1 fueron tratados con LPS (1ug/ml) o con distintas concentraciones de meta-AEA. En ambos casos se observó una disminución de los niveles de AMPc con respecto al control ($p < 0,05$). Estos resultados muestran que hay una modulación del segundo mensajero AMPc por el LPS y que éste efecto estaría mediado por CBs; en particular, el RCB2 sería el responsable de este mecanismo el cual estaría acoplado a una proteína Gi.

040. (736) ANÁLISIS DE LOS PATRONES PULSÁTILES DE HORMONA LUTEINIZANTE (LH) EN UN MODELO DE PERSISTENCIA FOLICULAR EN BOVINOS

Díaz P.¹; Stangaferro M.¹; Gareis N.¹; Barberis F.²; Matiller V.¹; Rey F.¹; Salvetti N.¹; Ortega H.¹
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET)-CONICET, Universidad Nacional del Litoral¹; Cátedra de Teriogenología Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral².

La enfermedad quística ovárica (COD) constituye una de las causas más comunes de infertilidad y subfertilidad en bovinos lecheros y es la persistencia folicular una de las etapas iniciales de su patogenia. Para estudiar este proceso se desarrolló un modelo experimental de persistencia folicular basado en el uso de dispositivos intravaginales de progesterona, aplicados el día 16 del ciclo estral en animales sincronizados ($n=15$), para conseguir concentraciones séricas subluteales de esta hormona (1-2 ng/ml). Para el análisis de la frecuencia pulsátil de liberación de LH se obtuvieron muestras de sangre cada 12 minutos durante 8 horas en las fases folicular y luteal de los animales controles y en fase folicular y a los 5, 10 y 15 días de persistencia en los animales tratados. Además, se obtuvieron muestras cada 2 hs para detectar el pico preovulatorio de dicha hormona. La concentración de LH se determinó por radioinmunoanálisis y se calcularon los niveles basales, la frecuencia pulsátil y la amplitud de los pulsos. Solamente se detectó el pico preovulatorio en los animales controles. La secreción basal fue menor en la fase luteal (0,14ng/ml) y mayor en la fase folicular (0,19-0,23ng/ml) observándose valores intermedios en los diferentes tiempos de persistencia. Se evidenció que a los 10 días de persistencia, los animales mantenían una frecuencia pulsátil similar a la observada en la fase folicular (6 a 8 pulsos/8 hs) aunque con una amplitud menor (0,34-0,40ng/ml vs. 0,49-0,55ng/ml). Estos resultados confirman que el bloqueo del pico preovulatorio y mantenimiento de la frecuencia de los pulsos de LH por niveles subluteales de progesterona podría ser un componente importante en la patogenia de la trastornos reproductivos caracterizados por la falla en el proceso de ovulación. Además, confirman que el modelo desarrollado reproduce muchos de los aspectos endocrinos de esta enfermedad en particular lo que contribuye con una excelente herramienta para el estudio de la misma.

041. (824) FLUIDEZ DE MEMBRANA Y PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN TIROSINA EN ESPERMATOZOIDES DE CERDO: MODIFICACIONES PRODUCIDAS POR ADITIVOS EMPLEADOS EN CRIOPRESERVACIÓN

Huarte M.¹; Ferraro L.¹; Arana B.¹; Cimato A.¹; Fischman L.²; De Celis E.¹; Piehl L.¹
Cátedra De Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Física Biológica, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Anima (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires².

La congelación de espermatozoides (Z) de cerdo no ha sido lograda aún de manera eficiente, dado que en esta especie la alta fluidez de la membrana de los Z favorece la "crio-capacitación". Los protocolos de congelación incluyen el agregado de yema de huevo (Y), detergente Equex-Paste (E) y glicerol (G). El presente trabajo evalúa el efecto de estos aditivos sobre la fluidez de membrana de los Z y las proteínas fosforiladas en tirosina (P-Tyr). Los Z fueron estabilizados a 17°C (T0) y resuspendidos ($cc=1,5 \times 10^9$ Z/ml) en diluyente Androstar[®] Plus solo (D) o adicionado con: Y 20% (Y20), sobrenadante de Y20 (SNY20) y precipitado de Y20 (PPY20), obtenidos por centrifugación. La temperatura de las muestras fue disminuida de 17 °C a 5 °C en un intervalo de 2 h (T1). Se diluyó luego a $cc=1,0 \times 10^9$ Z/ml con el aditivo correspondiente adicionado con 0,5% E, 3% G (EG) y se incubó 30 min a 5°C (T2). Se evaluó fluidez de membrana de los Z mediante el parámetro de orden S determinado por ESR, P-Tyr por Western blot y calidad espermática, en las distintas etapas del proceso (T0, T1 y T2). Al finalizar T1, se observó un aumento significativo en S ($p < 0,05$) en aquellos Z tratados con Y20 ($S=0,688 \pm 0,010$) y con PPY20 ($S=0,699 \pm 0,006$) respecto a los Z en T0 ($S = 0,659 \pm 0,011$), D ($S=0,662 \pm 0,014$) y SNY20 ($S = 0,667 \pm 0,003$). Luego de T2 se observó una disminución significativa en S ($p < 0,05$) en los Z tratados con Y20-EG ($S=0,646 \pm 0,021$) y con PPY20-EG ($S=0,641 \pm 0,020$) respecto a los mismos aditivos en T1, concordante con disminución del HOS test. En los Z en D se observó la aparición de la P-Tyr p32, y en los Z tratados con Y20 y con PP20 se detectaron proteínas fosforiladas constitutivas de la yema, aun cuando fueron exhaustivamente lavados. Estos resultados indican

que el precipitado de la yema posee componentes que afectan a los Z y que el agregado de EG aumenta la fluidez de membrana, lo cual podría tener un efecto desestabilizador de la misma que favorecería la crío-capacitación.

042. (836) ESTUDIO DE LA REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE FIBROBLASTOS UTERINOS HUMANOS DURANTE LA INTERACCIÓN CON EL TROFOBLASTO UTILIZANDO UN MODELO DE CO-CULTIVO IN VITRO

Cerchi G.¹; Vaccarezza A.¹; Ferguson S.²; Vitullo A.¹; Fazleabas A.²; Cameo P.¹

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides¹; Michigan State University, Grand Rapids, MI, USA².

El estudio de la implantación en humanos está principalmente restringido al cultivo celular. La transformación de los fibroblastos estromales (fenotipo elongado) a células deciduales (fenotipo redondeado) es crítica para el establecimiento exitoso y mantenimiento del embarazo en humanos. Se requieren cambios morfológicos y funcionales en la estructura y fisiología celular e implica la reorganización del citoesqueleto. Se estableció un modelo *in vitro* de co-cultivo de fibroblastos uterinos humanos (células HuF) con explantos de trofoblasto para estudiar la interacción materno-fetal y verificar la capacidad del trofoblasto de inducir modificaciones morfológicas en las células HuF. El co-cultivo se estableció por 12 días y se realizaron distintas condiciones, células HuF control, HuF tratadas con hormonas y AMPc, co-cultivo control y co-cultivo tratado con hormonas y AMPc. Luego de finalizado el mismo, se analizó la disposición de los filamentos de actina en las células HuF de las distintas condiciones mediante la técnica de inmunofluorescencia y se estudió por inmunoblot IGFBP-1, marcador de decidualización. Se observaron por microscopía, modificaciones morfológicas en ambos compartimentos, HuF y trofoblasto, en condición de co-cultivo. Al estudiar la disposición de los filamentos de actina de las células HuF del co-cultivo, la misma se encontró modificada al comparar con el control. IGFBP-1 fue detectado en las células HuF que estuvieron en presencia de trofoblasto. Conclusión: el trofoblasto fue capaz de modificar la disposición de los filamentos de actina de las células HuF e inducir la decidualización de las mismas.

043. (852) SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO Y EFECTOS DE LA HIPERANDROGENIZACIÓN PRENATAL SOBRE LAS FUNCIONES METABÓLICAS EN UN MODELO MURINO

Abruzzese G.; Heber M.; Ferreira S.; Velez L.; Motta A. Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-Universidad de Buenos Aires.

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una patología asociada a trastornos reproductivos y metabólicos como insulino-resistencia (IR) y síndrome metabólico (SM). La etiología de SOP se desconoce pero se postula que un incremento de andrógenos maternos en la gestación influiría en su aparición. Previamente desarrollamos un modelo de SOP en ratas Sprague-Dawley (SD) hiperandrogenizadas prenatalmente (HP) con 2 mg de testosterona (T), que generaba 2 fenotipos, ovulatorio o anovulatorio, siempre con IR y quistes ováricos. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la concentración de andrógenos durante la gestación influye en el desarrollo de insulino resistencia y de riesgo de SM. Se utilizan ratas SD preñadas e inyectadas, entre los días 16 y 19 de gestación, con T:1mg (T1), 0,5 mg(T0,5) ó con aceite como control(C)(N=10/grupo). Entre los 45 y 60 días se evaluó el ciclo estral por extendido vaginal. El 100% de C y T0,5 ciclaban, en T1 un 23% no presentó ciclos regulares. Para T1 y T0,5, dentro de las que ciclaban, 30% poseía ciclo regular y en C el 40%. Se realizaron curvas de tolerancia a glucosa mediante inyección intraperitoneal de 30mg de dextrosa y medición en sangre de glucosa durante 2hs cada 30 minutos. El área bajo la curva era significativamente mayor(p<0,05) en T1 que en T0,5 y C, y en T0,5 que en C lo que indicaba mayor IR en los grupos HP. El riesgo de SM (triglicéridos/

colesterol HDL) evaluado mediante kit *Wiener Lab* fue mayor en los grupos HP(T1=2,24+0,92, T0,5=2,24+0,71) respecto a C(1,27+0,18). Se concluye que la hiperandrogenización prenatal genera un desbalance metabólico evidenciado en un aumento de IR y de riesgo de SM que varía de forma dosis dependiente.

INFECTOLOGÍA, INFLAMACIÓN E INMUNOLOGÍA 1

044. (100) EFECTO DE LOS ANTICUERPOS GENERADOS POR LA INMUNIZACIÓN CON DIFERENTES INMUNÓGENOS PROTOTÍPICOS EN LA INTERNALIZACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS (MAC-T)

Renna M.¹; Pereyra E.¹; Baravalle C.¹; Camussone M.²; Andreotti C.¹; Pujato N.³; Dallard B.¹; Marcipar I.³; Calvino L.² Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET)-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral¹; Estacion Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA²; Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral³.

Staphylococcus aureus es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis en Argentina y en otros países de gran desarrollo lechero. Posee la habilidad de invadir tejidos y sobrevivir intracelularmente, protegiéndose de la respuesta inmune humoral del huésped y del tratamiento con antibióticos, tendiendo a producir infecciones crónicas. Es por ello que se han propuesto medidas alternativas, como la manipulación de los mecanismos de defensa específicos del hospedador mediante el uso de inmunógenos. En el presente trabajo se propuso comparar *in vitro* la funcionalidad de anticuerpos generados por la inmunización de vaquillonas con diferentes inmunógenos contra mastitis causadas por *S. aureus*. En una primera etapa, se compararon los anticuerpos generados durante la inmunización con bacterinas de *S. aureus* productoras de polisacárido capsular 5 (CP5), formuladas con un adyuvante tradicional, Al(OH)₃, o un adyuvante de nueva generación, Iscom Matrix, y un grupo control tratado con PBS. Para ello, se inmunizaron 3 grupos de 8 vaquillonas Holstein preñadas 45 y 15 días pre parto. Los sueros de leche y sangre de animales inmunizados disminuyeron *in vitro* la internalización de *S. aureus* en una línea celular epitelial mamaria (MAC-T) comparado con sueros de animales controles (p<0,05). En una segunda etapa se seleccionó a Iscom Matrix como adyuvante para la formulación de los tres inmunógenos: una bacterina *S. aureus* CP5, un lisado CP5, un lisado CP5 más antígenos recombinantes (proteína de unión a fibronectina A, *clumping factor A* y β -toxina), y PBS. Los sueros de sangre y leche de todos los animales inmunizados disminuyeron *in vitro* la internalización de *S. aureus* en MAC-T comparado con sueros de animales controles (p<0,05). Los resultados sugieren que la respuesta inmune humoral generada durante la inmunización con diferentes inmunógenos, podría contribuir al control de la infección por *S. aureus* disminuyendo la adherencia-invasión a la célula epitelial mamaria.

045. (203) ACTIVIDAD ANTIADENOVIRAL DE CUATRO ANÁLLOGOS SINTÉTICOS DE ESTIGMASTANO

Michelini F.; Areco Y.; Bueno C.; Alché L. Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Algunos serotipos de adenovirus (ADV) humanos causan infecciones oculares agudas altamente contagiosas y que producen dolor severo. En ellas, el infiltrado leucocitario que provoca la inflamación de la córnea, reduce la visión. Hasta el presente no hay una terapia antiviral efectiva para controlar dichas infecciones oculares. Para aliviar el dolor y disminuir la inflamación, se administran corticosteroides, cuya aplicación sostenida en el tiempo ocasiona numerosos efectos secundarios indeseados. Resulta entonces necesario el desarrollo de compuestos con actividad anti ADV para controlar las infecciones oculares causadas por

este virus. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antiviral de cuatro análogos sintéticos de estigmastano frente a ADV. Dado que éstos poseen una actividad antiviral de amplio espectro frente a distintos virus, la hipótesis de trabajo fue que dichos compuestos serían capaces de inhibir la multiplicación del ADV, en condiciones de infección *in vitro*. Se evaluó, en primer lugar, la citotoxicidad de los compuestos mediante el método colorimétrico del MTT, para conocer el rango de concentraciones no tóxicas en las que los compuestos serían evaluados como antivirales. Luego, se investigó la capacidad de los mismos de interferir la multiplicación del ADV serotipo 5 *in vitro* por medio de ensayos de inhibición del rendimiento viral y de reducción de placas. Para los compuestos más activos se determinó el mecanismo de acción antiviral de los mismos, ubicando temporalmente la acción inhibitoria de los compuestos sobre la producción viral mediante experimentos de adición y remoción de droga a distintos tiempos post-infección. Los cuatro compuestos resultaron activos para inhibir la multiplicación de ADV *in vitro*. Dicha actividad inhibitoria no se debe a una acción virucida de los compuestos, sino que éstos estarían afectando una etapa tardía de la multiplicación viral, posterior a la internalización del virus en la célula.

046. (358) DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LEPTOSPIRA EN CULTIVOS PUROS Y MUESTRAS CLÍNICAS.

Recavarren M.¹; Scialfa E.³; Quintana S.².

Área Veterinaria, Fares Taie Instituto de Análisis, Mar Del Plata¹; Laboratorio de Biología Molecular, Fares Taie Instituto de Análisis, Mar Del Plata²; División Zoonosis Rurales, Azul³.

La prueba de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico serológico de leptospirosis es la micro aglutinación con Antígenos Vivos de *Leptospira* (MAT). Esta prueba es altamente específica aunque presenta una sensibilidad limitada en la fase aguda, debido a que los anticuerpos son detectables alrededor de los 7-10 días de la aparición de los síntomas y en general se requiere una segunda muestra de suero para confirmar el caso, lo que retarda el diagnóstico y el tratamiento. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar la técnica de PCR en Tiempo Real para detectar ADN de los serovares más comunes de *Leptospira* que infectan a humanos a partir de cultivos puros y de 23 muestras clínicas de pacientes en distintas etapas de infección. Se realizó extracción, cuantificación y amplificación del ADN de cultivos puros de *Leptospira* Canicola, Hardjo, Tarassovi, Grippotyphosa, Hebdomadis y Sejroe por PCR en Tiempo Real y se determinó la sensibilidad la cual fue en promedio de 8 genomas. A partir de muestras de suero de pacientes sospechosos de leptospirosis se determinó por MAT la presencia de anticuerpos y por PCR en Tiempo Real la cantidad de ADN bacteriano. Se realizó un control interno amplificando beta actina humana para chequear la correcta extracción del ADN y la ausencia de inhibidores. De las 23 muestras positivas a leptospirosis por MAT, 13 amplificaron el control interno (corresponden a los días 4 al 16 de evolución de síntomas clínicos) y de esas; solo 7 (el 54%) fueron positivas. El bajo número de muestras aptas para el análisis refleja el problema para el estudio de Leptospirosis por métodos moleculares ya que se requiere un volumen mínimo de suero de 1 ml y las muestras deben transportarse y conservarse refrigeradas. Mediante la técnica de PCR en Tiempo Real se detectó exitosamente ADN de *Leptospira* a partir de cultivos puros con una alta sensibilidad, y de muestras clínicas en distintas etapas de infección; pudiendo ser usada como complemento del MAT.

047. (409) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES EN LINFOCITOS INDUCIDOS POR ESTRÉS PRENATAL. CONSECUENCIAS EN LA RESPUESTA FRENTE AL ESTRÉS AGUDO EN LA VIDA ADULTA

Pascuan C.; Di Rosso M.; Pivoz Avedikian J.; Genaro A. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

El estrés prenatal (EP) ha sido asociado con alteraciones inmunológicas en la vida adulta. En este trabajo investigamos si el EP induce alteraciones en la respuesta inmune frente a una situación de estrés agudo en la adultez (2 h de inmovilización, EA). Además estudiamos la participación de glucocorticoides (GR) y catecolaminas. Para ello, hembras BALB/c preñadas fueron sometidas a estrés por inmovilización 2 horas al día, desde el día 14 de gestación hasta el parto. Se utilizaron crías, de dos meses de edad, provenientes de madres estresadas (EP; n=10) y de madres sin estresar (control; n=10). Observamos que la exposición a EA indujo un aumento de la respuesta proliferativa en animales controles (148% respecto al no expuesto a EA) no observable en los EP. Asimismo, la corticosterona indujo una menor estimulación y un mayor efecto inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos provenientes de animales EP (p<0,05). La epinefrina moduló la respuesta proliferativa de forma dependiente de la concentración, sin observarse cambios entre animales control y EP. No se encontraron diferencias en los niveles basales de corticosterona (ng/ml, C=192,6 ± 40,1 EP=166,2±44,3; NS) y catecolaminas (ng/ml, C=0,48 ± 0,04 EP=0,48±0,04; NS) en animales sometidos a EP con respecto a los controles. Además, el aumento de ambas hormonas frente a EA fue similar en ambos grupos. Sin embargo se observó un aumento en el número de receptores de GC, tanto a nivel de mRNA (UR, C=1,14± 0,08 , EP=1,42 ± 0,07; p<0,05) como proteína (UR, C= 1,74± 0,28, EP=3,40±0,51; p<0,05), en linfocitos provenientes de ganglios de animales EP con respecto a linfocitos de animales control. El número de receptores β-adrenérgicos no se vio modificado. En conclusión el EP produce cambios en la sensibilidad de los linfocitos a corticosterona, relacionado con la modificación en el número de receptores de GC en animales EP, que conduciría a una respuesta inmune alterada frente a una nueva situación de estrés.

048. (438) PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS ANTI-RO/SSA Y ANTI-RECEPTOR MUSCARÍNICO COLINÉRGICO EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJOGREN

Reina S.¹; Dománico L.²; Pisoni C.³; Rodríguez M.¹; Borda E.¹

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires¹; CONICET²; Departamento de Reumatología, CEMIC, Buenos Aires³.

Mediante estudios previos hemos demostrado la presencia de autoanticuerpos séricos dirigidos contra los receptores de muscarínicos colinérgicos (mAChRs) presentes en los pacientes con Síndrome de Sjögren primario (SSp). Objetivo: determinar si los autoanticuerpos, anti-mAChR y anti-Ro/SSA de pacientes con SS interactúan con la producción de IL-1β y PGE₂, y en última instancia con la alteración intervalo QT corregido. Resultados: la presencia de anti-Ro se asocia con la presencia de anti-mAChR sérico. Ambos autoanticuerpos están acompañados por un incremento de la producción de IL-1β y PGE₂ sérico. La IL-1β puede ser, en parte, responsable de la alteración QTc mientras que la PGE₂ puede corresponder a la gravedad del proceso inflamatorio que se produce a el nivel glandular. Conclusión: los niveles séricos de los autoanticuerpos anti-Ro y anti-mAChR en los pacientes con SS pueden ser factores capaces de provocar una alteración en el intervalo QTc con la participación directa del aumento de los niveles séricos de IL-1β y PGE₂ pacientes Ro(+).

049. (504) EFECTO DEL GENOTIPO EN LA RESPUESTA A LA REINFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS EN EL MODELO MURINO CBI-IGE. ANÁLISIS DE LA ETAPA INTestinal

Codina A.^{1,3,4}; Indelman P.^{2,4}; Di Masso R.^{1,3}; Vasconi M.^{1,2}; Hinrichsen L.^{1,3}

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹; Área Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario²; CIC-UNR Universidad Nacional de Rosario³. Contribuyeron igualmente⁴.

Los roedores son huéspedes naturales de *Trichinella spiralis* (Ts), un parásito nematodo que en el inicio de su ciclo biológico

coloniza el epitelio del intestino delgado. La expulsión rápida producto de la respuesta inmune permite la eliminación inmediata del gusano intestinal. Conocer los mecanismos que la regulan brindaría información valiosa en el desarrollo de medidas de profilaxis para los seres humanos y animales contra la infección por nematodos. El papel del genotipo y la reinfección en la regulación de la expulsión rápida se examinó en ratones machos CBI-IGE de distinto genotipo, infectados y re infectados con *Ts*. Los ratones de las líneas CBI+ (susceptible) y CBI/L (resistente) y sus cruces recíprocas (F1, intermedias) (n=8 por grupo genético 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 32±2 días de la primoinfección. El número de parásitos adultos intestinales (nPA) se determinó a los 3, 6 y 13 días post-infección (p-i) y reinfección (p-ri) (fase intestinal). A los 30 días p-i y p-ri (fase muscular) se estimó la carga parasitaria muscular relativa (CPr) como medida del grado de infección alcanzado por el animal. Se encontró disminución del nPA en el día 3 entre infección y reinfección en CBI+ (mediana, nPA p-i: 20.0, nPA p-ri: 13.0; P=0.023). A partir del día 6 p-ri no se encontraron parásitos adultos en el intestino de CBI/L y F1 (nPA p-ri, CBI+: 10.0, CBI/L: 0.5, F1: 0; P<0.02). En el día 13 p-ri nPA fue cero en CBI+. El número de larvas musculares de *Ts* en el día 30 p-ri aumentó en CBI+ (media±EE, CPr-i=910±163.5, CPr-ri=1685±130.2; P=0.0012) y no discrepó del valor promedio observado en la primoinfección en CBI/L y F1. La expulsión de los parásitos fue más rápida en la reinfección en CBI/L y F1, generando mecanismos que disminuyeron la proporción de parásitos capaces de completar su ciclo. Esto explicaría en parte la resistencia de estos genotipos a la infección con *Ts*.

050. (545) CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CD103+ Y CÉLULAS T REGULATORIAS EN TEJIDOS LINFOIDES ASOCIADOS AL INTESTINO DURANTE LA INFECCIÓN POR MMTV

Riveiro M.; Cabrera G.; Duarte A.; Maglioco A.; Camerano G.; Costa H.; Nepomnaschy I.; Piazon I.
Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina.

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es un retrovirus transmitido en la lactancia que utiliza al sistema inmune del huésped para establecer la infección. Los linfocitos B y las células dendríticas (CD) de las placas de Peyer (PP) son las primeras en ser infectadas. Estas células presentan un superantígeno (Sag) codificado por el virus a células T reactivas al Sag induciendo su activación y proliferación. Hemos demostrado que la infección con MMTV induce aumentos tempranos de CD y del receptor de entrada del virus en estas células y aumentos de células T regulatorias (Treg) reactivas al Sag en PP. Dado que entre las CD las CD103- participarían en la inducción de una respuesta efectora contra patógenos mientras que las CD103+ serían responsables de la inducción de tolerancia, el objetivo de este trabajo fue investigar si existen alteraciones en la subpoblación de CD CD103+ durante la infección y si éstas correlacionan con cambios en el número de células Treg CD4+ Foxp3+ en PP y en ganglio mesentérico (GM). Determinamos por citometría de flujo que ratones BALB/c presentan aumentos progresivos en el número de CD CD103+ en PP. Como ejemplo, al día 10 de infección, CD11c+CD103+/PP(10⁴):control 0,55±0,032; MMTV+ 3,8±0,062;p<0,001(media±DS,n=4). En GM no se detectó aumento en el número de CD CD11c+CD103+(10⁵):control 0,9±0,59;MMTV+ 1,3±0,78;p>0,05(media±DS,n=4), ni en el número de células Treg CD4+CD25+Foxp3+(10⁵):control 9,2±3,3;MMTV+ 8,4±3,3;p>0,05(media±DS,n=4). Aquí demostramos que durante los primeros días de infección viral hay un aumento de CD CD103+ en PP que correlaciona con el aumento en células Treg previamente observado. En GM no observamos diferencias ni en el número de CD CD103+ ni en el de células Treg. Hipotetizamos que las CD CD103+ participarían en la inducción de Treg en PP durante la infección por MMTV. Estos resultados aportan conocimientos sobre los mecanismos que inducen Treg en el sistema inmune de mucosas que regulan la inmunidad contra patógenos.

051. (558) ENCAPSULACIÓN DE LA QUIMERA BLSOMP31 EN MICROESFERAS DE QUITOSANO. MÉTODO DE PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Díaz A.^{1,3}; Quinteros D.²; Llabot J.²; Ghersi G.^{4,6}; Palma S.²; Allemandi D.²; Goldbaum F.^{4,5,6}; Estein S.^{3,4}
Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires¹; Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, UNC-CONICET-UNITE-FA²; Laboratorio de Inmunología, Depto. SAMP, Centro de Investigación Veterinarias de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires³; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET)⁴; Fundación Instituto Leloir e Instituto de Investigaciones Biológicas Buenos Aires-CONICET⁵; Immunova S.A.⁶

El quitosano es un polisacárido natural, hidrofílico, degradable, biocompatible y de baja toxicidad. En los últimos años este polímero se ha usado como portador de fármacos para su administración por diversas vías. Los objetivos de este trabajo consisten en la obtención y caracterización de las microesferas de quitosano como un nuevo sistema de liberación modificada de la quimera BLSomp31 para su administración por vía intranasal. Metodología: Las microesferas fueron preparadas dispersando el polímero (0,5% p/v) en ácido acético al 0,5% con glutaraldehído al 4% (agente entrecruzante superficial) con agitación continua (90 min) a T° ambiente, una vez mezclado se agregó la proteína BLSomp31 y se homogeneizó con Ultraturax T 18 (6000 RPM) durante 30 min. Luego la solución fue secada por spray dried (condiciones: T° entrada 130°, Aspiración 100, Bomba 10%, Aire de atomización 50 mm y T° salida 76°). La caracterización del estado sólido se realizó por: SEM, microscopía óptica, medición del tamaño de partícula y del potencial electrocinético (potencial z). Resultados y Conclusión: Los resultados reflejan un alto rendimiento en el proceso de obtención de las microesferas (68,95%) Tanto el análisis microscópico como las microfotografías obtenidas por SEM mostraron partículas esféricas y uniformes, con un tamaño promedio de 5,37 µm ±4,3 y potencial zeta de +33,07 mV. Estos resultados indican que el método de secado por spray es adecuado para la obtención de las microesferas de quitosano como vehículo de la proteína ya que se obtiene un alto rendimiento en el proceso, partículas homogéneas y con potencial zeta positivo lo que aumentaría de manera significativa el tiempo de contacto (mecanismo de mucoadhesión) de la formulación con la mucosa intranasal con carga neta negativa. Esto permitiría que la proteína se libere en forma controlada en el sitio de aplicación favoreciendo su adecuado procesamiento por las células del sistema inmunitario de las mucosas.

052. (588) VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P EN PACIENTES INFECTADOS CON HIV-1 NAIVE Y CON TRATAMIENTO HAART

Fraga J.; Rossi J.; Bernasconi A.; Mecikovsky D.; Bologna R.; Bellusci C.; Aulicino P.; Sen L.; Mangano A.
Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires.

La glicoproteína P (P-gp) es una proteína miembro de la familia ABC que bombea xenobióticos hacia el exterior de la célula. Entre los sustratos que interactúan se encuentra los inhibidores de proteasas (IP) que son parte del tratamiento antirretroviral de alta eficacia (HAART) de pacientes infectados con HIV-1. Objetivos: a) Comparar los niveles de expresión de P-gp en linfocitos T CD4+ en células circulantes de niños infectados con HIV-1 sin tratamiento antirretroviral (naive) y en niños no infectados. b) Evaluar en forma secuencial la expresión de P-gp previo y al recibir el tratamiento HAART. Materiales y métodos: Se estudiaron 22 niños infectados con HIV-1 y 21 niños no infectados (grupo control). Los niveles de expresión de P-gp se determinaron mediante citometría de flujo y los datos fueron analizados mediante el programa Flow-jo versión 7.5.3. Resultados: El promedio de expresión de P-gp en pacientes infectados naive $\bar{x} \pm DS$ 74.03% ±19.78, fue

significativamente mayor que en los controles $34.81\% \pm 15.07$ ($p < 0.001$) denotando un marcado aumento de la expresión de la P-gp en presencia de infección por HIV-1. En 8 HIV-1 infectados se evaluó secuencialmente la expresión de P-gp naive siendo $x \pm DS$ 84.2 ± 12.77 y con HAART 52.21 ± 22.9 , con una reducción significativa entre un 20-55% ($p = 0.002$) junto con una disminución en la carga viral de HIV-1 $x \pm DS$ $2.15 \log \pm 1.327$. En 3 pacientes se realizaron mediciones posteriores al inicio de HAART, revelando la persistencia de la reducción de P-gp y en dos casos se redujo aun más la expresión (10-20%). Conclusión: Nuestros resultados indican que los niveles de expresión de P-gp se encuentran elevados en niños infectados con HIV-1 por transmisión vertical. El inicio del tratamiento HAART con IP redujo significativamente los niveles de expresión de P-gp persistiendo la reducción durante el tratamiento.

053. (627) LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS MODULAN LA PROGRESIÓN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA MEDIANTE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y CITOQUINAS INFLAMATORIAS

Piccioni F.¹; Blois S.²; Freitag N.²; Tirado González I.²; Moschansky P.²; Lloyd R.¹; Rose M.²; García M.¹; Alaniz L.¹; Mazzolini G.¹

Universidad Austral¹; Centro Charité, Universidad de Medicina de Berlín, Alemania².

Las células dendríticas (CD) cumplirían un rol fundamental en la regresión de la fibrosis hepática avanzada una vez eliminado el estímulo fibrogénico (Jiao *et al* 2012). Las CD pueden regular la composición de la matriz extracelular mediante la expresión de enzimas que la degradan y la expresión de diversas citoquinas. Sin embargo, su papel durante el desarrollo de la fibrosis (estadios iniciales) aún no ha sido estudiado. Nuestra hipótesis radica en que las CD hepáticas pueden regular la progresión de la fibrosis tempranamente, y su papel dependería del estado de maduración de las mismas. Nuestro objetivo fue estudiar cual es el impacto tanto de la depleción de las CD como de la inoculación exógena de las mismas durante el proceso de fibrogénesis hepática. **Materiales y métodos:** Utilizamos ratones C57BL/6 CD11c.DTR, que expresan el receptor de la toxina diftérica bajo el control del promotor de CD11c, para los ensayos de depleción; y ratones C57BL/6-GFP para tratamiento con CD exógenas. La fibrosis se indujo por inoculación i.p. de tioacetamida, 3 veces/semana por 1 mes. El nivel de fibrosis se estableció por tinción de colágeno con Rojo Sirio e índice de Metavir (F0-F4). Se realizó un análisis del perfil de citoquinas mediante Cytometric Bead Array (BD). Se analizó el perfil de expresión de proteínas relacionadas con la angiogénesis a partir de tejido hepático mediante Proteome Profiler (R&D). **Resultados.** En los hígados de ratones con depleción de CD se observó un nivel de fibrosis F3 respecto de los controles sin depleción (F1). Por el contrario, en los animales tratados con CD exógenas se observó disminución de fibrosis respecto al control. Además en los animales con depleción de CD se observó un aumento de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-6, MCP-1). Sin embargo, en los animales tratados con CD se observó una disminución de IL-6 en suero. También se observó una modulación en la expresión de factores angiogénicos en los animales con depleción de CD. **Conclusión:** Las CD hepáticas regularían la progresión de la fibrosis mediante citoquinas clave en la fibrogénesis como IL-6 y de factores angiogénicos. El tratamiento de CD maduras exógenas retardó la progresión de la fibrosis por mecanismos similares, confirmando nuestra hipótesis.

054. (716) TRATAMIENTO CON CLOMIPRAMINA EN LA ETAPA CRÓNICA CARDÍACA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Bazán P.; Lo Presti M.; Báez A.; Strauss M.; Esteves B.; Moya D.; Miler N.; Paglini Oliva P.; Rivarola H.

Cátedra de Física Biomédica, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Existen dos drogas Nifurtimox y Benznidazol, que se emplean para tratar la Enfermedad de Chagas (EC). Ambas de acción tripanocida, pero producen 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 antidepressivo tricíclico Clomipramina (Clo) inhibe a la tripanotona, produciendo la muerte del parásito. El objetivo fue evaluar el efecto de la administración de Clo (5 mg/kg/día) en la etapa crónica cardíaca, en ratones albino suizos ($n=60$), infectados con el aislamiento SGO Z12 (Tc II) de *T. cruzi*. **Metodología:** Los grupos fueron: sin infectar (SI), infectados sin alteraciones (ISA), infectados con alteraciones no tratados (INT) y tratados con Clo (IT), la cual se administró durante 60 días. Los ratones que ingresaron al grupo tratado fueron definidos en función de la presencia de alteraciones electrocardiográficas (fase crónica cardíaca) a los 90 días post infección (d.p.i.). **Resultados:** A los 180 d.p.i. no observamos diferencias significativas en el porcentaje de alteraciones electrocardiográficas y de infiltrados inflamatorios entre el grupo INT y el grupo IT. Con respecto a la carga parasitaria podemos ver por PCR en tiempo real que el grupo IT, disminuyó a la mitad el número de parásitos (0,52), no así el grupo INT que duplicó su número (2,01). **Conclusiones:** En el presente trabajo demostramos, la presencia del *T. cruzi* aún en la fase crónica de la EC. Por otro lado clomipramina ha demostrado su capacidad de provocar la muerte del parásito y como consecuencia la disminución de la carga parasitaria. Por lo tanto, por los resultados obtenidos, es necesario el tratamiento antiparasitario aun en la fase crónica y clomipramina podría ser considerada como un buen candidato para el tratamiento de la EC.

055. (731) ESTUDIO DEL PROCESO DE AUTOFAGIA DURANTE LA RESPUESTA INMUNE DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS ACTIVA

Rovetta A.^{1,2}; Peña D.^{1,2}; Hernández-Del-Pino R.¹; Pellegrini J.^{1,2}; Musella R.³; Saab M.³; Palmero D.³; Colombo M.⁴; García V.^{1,2}

IQUIBICEN-UBA-CONICET¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Hospital F.J. Muñiz, Buenos Aires, Argentina³; Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Cuyo, CONICET, Mendoza, Argentina⁴.

La tuberculosis (TB), enfermedad producida por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), ocasiona casi 2 millones de muertes anuales. La respuesta inmune del hospedador contra *Mtb* requiere de citoquinas Th1, ya que los pacientes con secreción reducida de IFN- γ presentan manifestaciones severas de TB. Previamente caracterizamos dos poblaciones de pacientes con TB activa según la respuesta *in vitro* frente a *Mtb* sonicated: pacientes Altos Respondedores (AR) (alta proliferación y producción de IFN- γ) y Bajos Respondedores (BR) (baja proliferación y niveles de IFN- γ). Es crucial conocer los mecanismos inmunes que permiten controlar la infección por *Mtb*. Al respecto, la autofagia es un mecanismo de eliminación directa de la bacteria, regulado por citoquinas. Estudiamos si *Mtb* inducía la autofagia en dadores sanos (DS) y pacientes con TB, analizando los niveles de LC3 (proteína marcadora de autofagia) por Western Blot, inmunofluorescencia y citometría de flujo. Asimismo analizamos si existía correlación entre los niveles de autofagia y los de IFN- γ en cada grupo de estudio. *Mtb* indujo una significativa respuesta autofágica en monocitos de sangre periférica de los individuos estudiados. Interesantemente, los DS presentaron niveles marcadamente superiores de autofagia comparado con pacientes TB BR ($p < 0.05$). Más aún, los pacientes TB AR mostraron mayor autofagia que los TB BR ($p < 0.05$). El agregado de Bafilomicina A1, inhibidor de la acidificación lisosomal que inhibe la maduración autofágica, incrementó los niveles de LC3 II, indicando que *Mtb* estimula la autofagia sin afectar el flujo autofágico. Además observamos una correlación positiva entre el IFN- γ secretado por los individuos en estudio y los niveles de LC3 II detectados ($p = 0,0287$). Así, el proceso autofágico participa en

la respuesta inmune contra *Mtb* en estricta correlación con los niveles de IFN- γ producidos por el hospedador.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN 1

056. (27) LA INCUBACIÓN CON TIRON, SOD O APOCININA RESTABLECE LA VASODILATACIÓN PULMONAR ENDOTELIO-DEPENDIENTE DISMINUIDA EN EL SÍNDROME METABÓLICO EXPERIMENTAL POR FRUCTOSA

Reyes Toso C.; Reyes M.; Ponzo O.; Torres Batan J.; Zuccarella V.; Linares L.

Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

En un trabajo previo se describió que ratas con síndrome metabólico experimental (SM) por la administración crónica de fructosa al 10% (F10%) presentaban una disminución de la vasodilatación pulmonar endotelio-dependiente (VPed). Dicho efecto podría ser secundario a un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO₂), principalmente aniones superóxido O₂⁻, con disminución en la formación o incremento de la catabolización del óxido nítrico (ON) producido a nivel endotelial. Por este motivo, en este trabajo, se ha evaluado el efecto de la incubación de anillos pulmonares (obtenidos de animales que recibieron F10%), con Tiron (secuestrador de O₂⁻), superóxido dismutasa (SOD) (remueve al O₂⁻) y Apocinina (inhibidor de la NADPH oxidasa). Las ratas se dividieron en dos grupos (n=10 c/u): a) dieta estándar -DE-, b) DE + F10%. A las 20 semanas se sacrificaron y se obtuvieron anillos de arteria pulmonar. Se colocaron en un baño para tejidos en solución de Krebs estándar (KE) y con glucosa -22mM/- (KG). Después de un período de estabilización se efectuaron curvas acumulativas dosis-respuesta a la fenilefrina (Phe) y acetilcolina (Ach) (10⁻⁹-10⁻⁴ M) o al nitroprusiato de sodio (NPS) (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M) sin o con previa incubación con SOD (150 U/ml), Tiron (9.4 x 10⁻³ mol/L) o Apocinina (3 x 10⁻⁸ mol/L). Resultados: ANOVA. La F10% aumentó la contracción a la Phe (F= 7.34; P<0.0001) y disminuyó la VPed (F= 4.48; P<0.001). En un medio KG la VPed experimentó una disminución mayor (P<0.05). En anillos con endotelio desnudo no existieron diferencias a la Phe o al NPS entre los grupos con F10% y controles. La incubación con SOD, Tiron o Apocinina restauró la VPed de los anillos de ratas con F10% a valores similares a los controles (P>0.05). Estos resultados sugieren que la alteración observada en la VPed estaría vinculada a un incremento en la producción de ERO₂, probablemente a partir de la vía de la NADPH oxidasa, con disminución en la biodisponibilidad de ON.

057. (75) LA SEMILLA DE SALVIA HISPÁNICA L. DIETARIA MEJORA EL ALTERADO METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y CONTENIDO LIPÍDICO EN EL MUSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS DISLIPÉMICAS INSULINO RESISTENTES

Oliva M.; Chicco A.; Lombardo Y.

Departamento de Ciencias Biológicas, Cátedra de Química Biológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.

El músculo esquelético es cuantitativamente el sitio más importante de utilización de la glucosa periférica global. Estudios previos mostraron en ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa (DRS) que la semilla de *Salvia Hispánica* L.-chia-variedad Salba normalizó la dislipemia reduciendo en músculo esquelético el elevado contenido de triglicéridos (Tg). El presente estudio investiga en músculo esquelético de ratas alimentadas con DRS, el efecto de la semilla de chia -rica en ALA 18:3,n-3- como fuente grasa dietaria sobre: **a)** masa proteica del Glut-4, vías oxidativa y no oxidativa de la glucosa, **b)** niveles de: Tg, Acil-CoA, diacilglicerol (DAG), masa proteica de nPKC θ en estado basal y durante el clamp euglucémico-hiperinsulinémico. Ratas Wistar recibieron durante 3 meses DRS [%energía: 60 sacarosa, 23 aceite de maíz (AM), 17 proteína]. Luego la mitad de las ratas continuó con DRS, mientras que en la otra mitad el AM fue reemplazado por semilla de chia por 3 meses (DRS+chia). En el grupo control el almidón reemplazó la sacarosa durante la

experiencia. Al final del período experimental se analizaron (n:6 ratas por grupo): Plasma: lípidos, glucosa e insulina. Músculo esquelético: los parámetros mencionados en **a** y **b**. Resultados: El reemplazo de AM por semilla de chia en la DRS normalizó: **1-** la dislipemia y glucemia; **2-** en músculo esquelético el acumulo de Tg, Acil-CoA y DAG; **3-** bajo la acción insulínica la masa proteica del Glut-4, la actividad glucogeno sintasa y niveles de glucogeno y glucosa-6-fosfato alcanzando valores similares al grupo control y **4-** disminuyó la masa proteica de nPKC θ (fracción de membrana). Conclusión: Estos resultados sugieren que los posibles mecanismo/s involucrados en el efecto de la semilla de chia sobre la reversión/mejoramiento de la acción insulínica en el músculo esquelético de ratas dislipémicas podría estar relacionado con la menor disponibilidad de lípidos disminuyendo la lipotoxicidad y normalizando la homeostasis de la glucosa.

058. (81) NUTRICIÓN MATERNA Y PROGRAMACIÓN FETAL: EFECTO DE UNA NUTRICIÓN RICA EN SACAROSA EN LA VIDA ADULTA DE LA PROGENIE

Chicco A.; Fortino M.; Oliva M.; D'Alessandro M.

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Alteraciones medioambientales en etapas tempranas de la vida predisponen a enfermedades crónicas del adulto incluidas en el Síndrome metabólico (SM). Dado el gran consumo de dietas ricas en sacarosa/fructosa y la mayor incidencia de SM, analizamos en crías adultas de ratas Wistar alimentadas con dieta rica en sacarosa (63% p/p) (DRS) durante la preñez+lactancia (P+L) aspectos del metabolismo hidrocarbonado y lipídico cuando la dieta post-lactancia fue: control (DC: almidón 63% p/p) o DRS. Al destete mitad de las crías machos de madres DC y DRS se alimentaron hasta 150 días de vida con una de ambas dietas generando 4 grupos: DC-DC, DC-DRS, DRS-DRS, DRS-DC. Al final del período de dieta cuantificamos: Plasma: lípidos, glucosa, insulina. Hígado: triglicéridos (Tg), actividades enzimáticas acetil-CoA carboxilasa (ACC), sintetasa de ácidos grasos (FAS) enzima málica (EM), glucosa-6-P-dehidrogenasa (G-6PDH), carnitina-palmitoil transferasa 1 (CPT-1). "In vivo": tolerancia a la glucosa (Kg), tolerancia a la insulina (KITT), secreción de VLDL-Tg, remoción de Tg (K₂). Resultados expresados como media \pm SEM (n=6) y analizados por ANOVA: Glucemia (mM): DC-DC 6.11 \pm 0.25, DC-DRS 7.17 \pm 0.34, DRS-DRS 7.71 \pm 0.21 y DRS-DC 7.08 \pm 0.39 (p<0.05 DRS-DC, DRS-DRS y DRS-DC vs DC-DC). Insulinemia no mostró cambios significativos en ningún grupo. Kg x10⁻² min⁻¹: DC-DC 2.47 \pm 0.12, DC-DRS 1.83 \pm 0.10, DRS-DRS 1.63 \pm 0.08 y DRS-DC 1.91 \pm 0.11; KITT mostró un patrón semejante al Kg (p<0.05 DRS-DC, DRS-DRS y DRS-DC vs DC-DC para Kg y KITT). En los grupos DC-DRS, DRS-DRS y DRS-DC la dislipemia acompañó al incremento de Tg hepático y actividades de enzimas lipogénicas (ACC, FAS, EM, G-6PDH), menor actividad de la enzima CPT-1 (beta-oxidación), mayor secreción de VLDL-Tg y menor K₂, comparado con DC-DC (p<0.05). Conclusión: una exposición temprana a DRS progresa el metabolismo intermedio predisponiendo el desarrollo de alteraciones incluidas en el SM independiente de la dieta post-lactancia.

059. (119) ESTUDIO COMPARATIVO DEL REMODELADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR FRENTE A LA INJURIA POR LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD: ENDOTELIO ARTERIAL VERSUS VENOSO

Oberkersch R.¹; Barakian B.¹; Yuschak S.²; Calabrese C.¹ *Facultad De Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Servicio de Obstetricia del Complejo Médico Churrucá-Visca².*

Las células endoteliales expuestas a la injuria por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) podrían inducir el remodelado de la matriz extracelular (MEX) vascular favoreciendo el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Nuestro objetivo fue comparar el remodelado de la MEX del endotelio macrovascular humano venoso y arterial (HUVEC Y HUAEC) frente a las VLDL. Ambos tipos celulares fueron tratadas a concentraciones crecientes de VLDL

(0, 50, 75 y 100 µg/mL), sobre los mismos se analizó: 1) la translocación del factor transcripcional NFκB por inmunoblot e inmunofluorescencia; 2) la producción de los proteoglicanos decorina y versicano por inmunoblot; y 3) la actividad de metaloproteinasas de matriz por gelatina/caseína zimografía (MMP-2,9, 3, 7 y 10). La translocación de NFκB al núcleo se incrementó frente a dosis crecientes de VLDL en HUAEC siendo máxima la relación núcleo/citoplasma(N/C) a 100µg/mL ($N/C_{VLDL0}=0.19$ vs $N/C_{VLDL100}=3.87$, $p<0.05$; $n=2$. Tukey's Test). Este incremento se acompañó con un descenso significativo en la producción de los proteoglicanos decorina (0vs50; 0vs75 y 0vs100 µg/mL VLDL, $p<0.0001$, $n=2$. Tukey's Test) y versicano (0vs50; 0vs75 y 0vs100 µg/mL VLDL, $p<0.001$, $n=2$. Tukey's Test). La actividad de MMPs no se modificó. Por su parte, las HUVEC presentaron una mayor translocación de NFκB a una dosis de 50µg/mL, con un aumento significativo en la producción de decorina (0 vs 50 µg/mL, $p<0.001$ y 0 vs 75µg/mL, $p<0.05$; $n=3$.) y versicano (0 vs 75 µg/mL $p<0.001$; $n=3$. Tukey's Test). Mientras que en presencia de concentraciones fisiológicas de VLDL (50 y 75 µg/mL) las HUVEC mostraron un aumento significativo de la actividad de la metaloproteína inflamatoria MMP-9 ($p<0.05$; $n=3$. Tukey's Test). Los resultados sugieren que frente al agente injuriante VLDL, el endotelio venoso ejecuta un remodelado de la MEX con características diferentes al evidenciado por el endotelio arterial. Diferencia que podría asociarse al inicio y progresión de la lesión aterosclerótica.

060. (218) LA DOBLE CARGA DE LA MALNUTRICIÓN EN UN GRUPO DE ESCOLARES ARGENTINOS DE 6 A 11 AÑOS

Napoli C.¹; Vidueiros S.¹; Paganini A.²; Dimarco G.²; Tarducci G.²; Fernandez I.¹; Pallaro A.¹

Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; PROPIA, Facultad de Humanidades, Universidad Nacional de La Plata.²

La masa grasa corporal (MG) es uno de los factores de riesgo asociados a las enfermedades crónicas no transmisibles. La doble carga de la malnutrición se refiere a una alimentación desequilibrada y deficiencias específicas de nutrientes. La obesidad y la deficiencia de hierro son dos de los trastornos nutricionales más frecuentes. Objetivo: Evaluar el %MG por dilución isotópica con deuterio como método de referencia y el perfil Ferrico en un grupo de escolares argentinos. Materiales y Métodos: Estudio descriptivo y transversal en 98 escolares, ambos sexos, de 6-11 años de edad, provenientes de la periferia de la ciudad de La Plata. Previa firma del consentimiento informado, fueron pesados y medidos, calculándose el índice de masa corporal (IMC), %sobrepeso (%S) y %obesidad (%O) (Zscore IMC >1:sobrepeso; >2:obesidad). Recibieron en ayunas una dosis oral de 0,5g de óxido de deuterio/kg de peso corporal. Alcanzado el equilibrio, se recolectó una muestra de saliva. Se estimó la masa corporal libre de grasa a partir del agua corporal total obtenida a través de la concentración de deuterio en saliva la que fue medida en un espectrofotómetro infrarrojo con Transformada de Fourier. El %MG se calculó por diferencia con el peso corporal. Se extrajo sangre por punción venosa y se determinó hemoglobina (Hb, g/dL) y en el suero, ferritina (F, ng/mL) y receptores de transferrina (RcT, mg/L) por técnica de ELISA. Resultados: %S: 23.5, %O: 19.4, %MG: 28.6 ± 7.4 ; encontrándose un 64% de la población con %MG elevados respecto al punto de corte según sexo y edad. Hb: 13.1 ± 0.8 ; F: 12.3 ± 5.1 ; RcT: 2.2 ± 0.6 . El 2.1% de la población presentó Hb baja, mientras que el 55% de F se encontró disminuida y 36% de RcT aumentados. Conclusión: Se evidencia la problemática de la doble carga de la malnutrición en este grupo de escolares al encontrarse %MG elevados asociados al sobrepeso/obesidad concomitantemente a una prevalencia de deficiencia de hierro.

061. (331) DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL PROVOCADA POR TOXICIDAD AGUDA DE COBRE EN CEREBRO

Semprine J.; Musacco Sebio R.; Saporito Magrina C.; García Magro N.; Boveris A.; Repetto M.
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El cobre (Cu) es un metal de transición esencial para la vida ya que es requerido por numerosos procesos vitales para el organismo. Sin embargo, una sobrecarga aguda de Cu produce daño oxidativo en cerebro y está relacionada con la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, asociadas a disfunción mitocondrial. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos tóxicos de una sobrecarga aguda de Cu sobre la actividad mitocondrial en cerebro de rata. Ratas macho Sprague-Dawley (150g) recibieron Cu(II) por vía intraperitoneal (5mg/kg). Se determinó en cerebro la quimioluminiscencia de cerebro (corteza) in vivo (QI) y el consumo de oxígeno (ΔO_2) a las 6, 16 y 24 hs de la sobrecarga y se aislaron mitocondrias para determinar: ΔO_2 , actividad de los complejos I y II de la cadena respiratoria, oxidación de lípidos (TBARS) y de proteínas (carbonilos). A partir de las 16 hs QI incrementó un 125% (16 ± 2 cps/cm², $p<0.001$). A las 24 hs, el ΔO_2 mitocondrial disminuyó un 17% con sustratos del complejo I (malato-glutamato) ($C:54 \pm 14$ nmolO₂/min mg proteína, $p<0.05$) y un 49% con sustratos del complejo II (succinato) ($C:91 \pm 8$ nmolO₂/min mg proteína, $p<0.001$) en estado 3. La actividad del complejo I mitocondrial disminuyó un 55% a las 24 hs de tratamiento con respecto al control (control: 74 ± 23 nmol/min.mg proteínas). A las 6, 16 y 24 hs de tratamiento, se observó un aumento significativo del daño a proteínas del 56%, 57% y 144%, respectivamente, respecto al control. En cuanto a la oxidación de lípidos, se observó un aumento significativo del 50% a las 24 horas de tratamiento respecto del control ($C:1,4 \pm 6$ nmol/mg proteína, $p<0.01$). El daño oxidativo en cerebro inducido por la sobrecarga aguda de Cu está asociado a la alteración de la funcionalidad mitocondrial, mediante disminución ΔO_2 e inhibición de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria, oxidación de proteínas mitocondriales y oxidación de lípidos.

062. (411) EVALUACIÓN DEL ESTADO REDOX EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLAUCOMA EN RATAS.

Lasagni Vitar R.¹; Reides C.¹; Lerner F.¹; Ferreira S.^{1,2}; Llesuy S.^{1,2}

Catedra de Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-UBA-CONICET².

El glaucoma es una neuropatía óptica caracterizada por atrofia del nervio óptico y pérdida de células ganglionares retinales extendiéndose el daño a nivel cerebral. El objetivo fue evaluar las alteraciones que se producen en el estado redox en el cerebro de ratas Wistar sometidas a un modelo experimental de glaucoma. Al grupo glaucoma ($n=12$) se le cauterizaron dos venas episclerales del ojo izquierdo y al grupo control ($n=12$) se lo sometió a igual protocolo quirúrgico sin cauterización. Las determinaciones se realizaron en homogeneizados de cerebro al séptimo día postquirúrgico. Se evaluaron: marcadores de daño a proteínas (PC) y lípidos (LP), contenido de ácido ascórbico (AA), vitamina E (VE), glutatión (GSH) y las actividades de las enzimas NADPH oxidasa (NAOX), Glucosa-6P deshidrogenasa (G6PD), tioredoxina reductasa (TR), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPX). Para el grupo con glaucoma: PC fue $2,84 \pm 0,22$ nmoles/mg prot (control $1,46 \pm 0,27$ nmoles/mg prot $p<0,001$). LP fue 690 ± 41 cpm/mg prot (control 432 ± 29 cpm/mg prot $p<0,001$). AA fue 67 ± 26 mM (control 275 ± 22 mM $p<0,001$). VE fue $0,58 \pm 0,05$ mmol/g (control $1,10 \pm 0,06$ mmol/g $p<0,01$), GSH $1,98 \pm 0,13$ mmol/g (control $8,19 \pm 0,71$ mmol/g $p<0,001$). NAOX fue $0,114 \pm 0,015$ U/mg prot (control $0,046 \pm 0,015$ U/mg prot $p<0,01$). G6PD fue $0,03 \pm 0,01$ U/mg prot.min (control $0,15 \pm 0,04$ mmol/min.mg prot $p<0,05$). TR $0,19 \pm 0,04$ nmol/min.mg prot (control $0,42 \pm 0,03$ nmol/min.mg prot $p<0,05$). GR fue $6,0 \pm 0,10$ mmol/min.mg prot (control $10,2 \pm 0,4$ mmol/min.mg prot $p<0,05$). GPX fue $0,067 \pm 0,008$ U/mg prot.min (control $0,042 \pm 0,003$ U/mg prot.min $p<0,05$). Las actividades de enzimas asociadas al metabolismo del glutatión se encuentran disminuidas excepto la GPX que está incrementada sugiriendo una respuesta adaptativa al aumento del daño oxidativo. Estos resultados sugieren que en el cerebro glaucomatoso las especies prooxidantes se encuentran incrementadas y los

antioxidantes no enzimáticos, disminuidos como consecuencia de un proceso oxidativo.

063. (448) EFECTO DE HARINA DE SOJA SOBRE EL METABOLISMO DE GLUTATIÓN Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA HIPERCALORICA

Razzeto G.^{1,2}; Lucero Lopez V.^{1,2}; Escudero N.^{1,2}; Giménez M.^{1,2}

Universidad Nacional de San Luis¹; Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas-San Luis (IMIBIO-SL)-CONICET, San Luis, Argentina².

Las dietas hipercalóricas inducen la generación de especies reactivas de oxígeno que causan daño a las macromoléculas. Estudios preliminares mostraron que los componentes bioactivos de la harina de soja en dieta normal estarían modulando los sistemas antioxidantes enzimáticos desempeñando una importante protección. Dado que las células también tienen sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos, el objetivo fue evaluar por ensayos cinéticos, el efecto de la harina de soja sobre el contenido de glutatión total y glutatión reducido, como así también sobre marcadores de daño oxidativo a proteínas y lípidos, a través de la determinación de grupos carbonilos y malondialdehído. Se trabajó con ratas macho *Wistar* que fueron divididas en dos grupos: control y experimental, alimentadas con dieta AIN-93 y AIN-93 hipercalórica (34,15% sacarosa, 42% de calorías provenientes de grasas), respectivamente, por 9 semanas. Luego cada grupo fue dividido en dos: uno de ellos continuó siendo alimentado con dieta conteniendo caseína como fuente proteica, mientras que en el otro se sustituyó caseína por soja, quedando: CC (control caseína), CS (control soja), HC (hipercalórica caseína) y HS (hipercalórica soja). Se alimentaron 45 días y se sacrificaron. El glutatión total aumentó en CS respecto a CC ($P < 0,001$) y disminuyó en HS respecto de HC ($P < 0,05$) y de CS ($P < 0,001$). El glutatión reducido aumentó en CS comparado a CC ($P < 0,05$) y disminuyó comparado a HS ($P < 0,01$). MDA en suero e hígado aumentó en HC respecto de CC ($P < 0,05$) y en suero hubo una tendencia de disminución del 16% en HS respecto de HC. Los grupos carbonilos disminuyeron en HC respecto CC ($P < 0,01$), e incrementaron en HS comparados con HC ($P < 0,01$). Nuestros resultados nos permiten concluir que ambas dietas de soja aumentan la relación GSH / GSSG respecto a caseína y contribuyen a mejorar del estado redox. Además la soja comparada a caseína, ante un estresor (dieta hipercalórica), protege contra la lipoperoxidación.

064. (564) CORTES LAMINARES DE TEJIDO (TISSUE SLICES): UN MODELO IN VITRO PARA ESTUDIAR INTERACCIONES METABÓLICAS A NIVEL HEPÁTICO EN RUMIANTES

Virkel G.; Viviani P.; Lifschitz A.; Maté M.; Larsen K.; Lanusse C.

Centro de Investigaciones Veterinarias de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

La incubación de cortes laminares de tejido hepático (tissue slices) permite, en comparación con otros modelos in vitro, una representación más adecuada de los procesos metabólicos que se producen in vivo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la modulación del metabolismo del antihelmíntico albendazole (ABZ) empleando el mencionado modelo in vitro. Se prepararon slices de hígado bovino ($n=6$) utilizando un micrótopo Brendel/Vitron®. Cortes de 10 mm (diámetro) por 250-300 μm (espesor) y 25.6 \pm 3.7 mg se incubaron con ABZ (50 μM) en ausencia o en presencia del inhibidor metabólico metimazole (MTZ) en el medio de cultivo E de Williams bajo una atmósfera de O₂/CO₂ (95/5). Se obtuvieron muestras del medio de cultivo a las 0, 2, 4, 6, 8 y 12 h para el análisis por HPLC. En presencia de MTZ, se observaron menores tasas de aparición de ABZ-sulfóxido total (0.8 \pm 0.3 vs. 1.3 \pm 0.2 nmol/h, $p < 0.001$) y del enantiómero (+)ABZ-sulfóxido (0.2 \pm 0.1 vs. 1.1 \pm 0.2 nmol/h, $p < 0.001$). Por el contrario, la tasa de aparición del enantiómero (-)ABZ-sulfóxido fue mayor (0.52 \pm 0.24 vs. 0.14 \pm 0.08 nmol/h, $p < 0.05$) mientras que no se modificó la tasa

de aparición del metabolito inactivo ABZ-sulfona. Estos resultados permiten concluir que los cortes laminares de tejido hepático son una herramienta metodológica de utilidad para estudiar interacciones metabólicas en bovinos.

065. (618) LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA DISMINUYE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL TEJIDO ADIPOSEO DE LA RATA CON SÍNDROME METABÓLICO

Avila M.; Scacchi Bernasconi P.; Scacchi P.; Cardinali D.; Pagano E.

Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica de Buenos Aires (UCA).

La epidemia global de sobrepeso, obesidad, diabetes y Síndrome Metabólico (SM), se ha vuelto un gran problema de salud pública en todo el mundo. El SM es un fenómeno pandémico y de naturaleza multifactorial: intolerancia a la glucosa, insulino-resistencia, depósito central de grasa, dislipidemia aterogénica, triglicéridos elevados, colesterol HDL descendido, hipertensión arterial, entre otros. El aumento de su prevalencia, genética aparte, está asociado a una inadecuada alimentación, sedentarismo, stress, y también al desajuste entre nuestros hábitos de vida y los ciclos naturales de luz-oscuridad. La inhibición de la producción de melatonina, la hormona pineal responsable del sueño, la reparación oxidativa, e innumerables procesos de recuperación del equilibrio interno, da cuenta de ello. Trabajos previos de este laboratorio demuestran que la melatonina (cronobiótico con importante capacidad citoprotectora) es capaz de contrarrestar algunos de los efectos provocados por una dieta alta en grasas. Antecedentes respaldan el efecto benéfico de la melatonina sobre distintos modelos de obesidad. En un modelo de SM en ratas inducido por fructosa en el agua de bebida al 10%, evaluamos la progresión del SM por parámetros metabólicos y el estado oxidativo de dos panículos adiposos. La presión arterial, el colesterol LDL, los triglicéridos y el ácido úrico mostraron valores cercanos al control por el tratamiento con melatonina. El peso corporal mostró una evolución notable desde el inicio del tratamiento (en gramos, C: 265 \pm 22; F: 284 \pm 19; F+M: 273 \pm 16) hacia el final del mismo (C: 351 \pm 30; F: 479 \pm 36; F+M: 370 \pm 32). La evaluación de la peroxidación lipídica del tejido adiposo blanco demostró que el SM inducido provoca un aumento de TBARs de 6,33 \pm 1,4 veces sobre el control, mientras que la adición de melatonina previene este incremento (1,29 \pm 0,47). En el tejido adiposo pardo, aunque la oxidación es mayor (18,8 \pm 5,55 veces sobre el control) la melatonina continúa previniendo el daño (1,21 \pm 1). Los resultados indican que la melatonina es capaz de prevenir el daño oxidativo en el tejido adiposo.

066. (638) EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS EN CEBRO DE RATONES ALIMENTADOS CON DIFERENTES FUENTES DE GRASA DIETARIA

Lavandera J.^{1,2}; Gonzalez M.¹; Sain J.^{1,2}; Scalerandi M.¹; Bernal C.^{1,2}

Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)².

Los ácidos grasos (AG) dietarios pueden incorporarse en tejidos y modular los niveles de AG poli-insaturados de cadena larga (AGPI-CL), los cuales juegan un rol clave en tejidos como el cerebro. El objetivo fue evaluar el efecto de los AG trans (AGt) sobre la incorporación de isómeros y alteraciones en la composición de AGPI-CL en cerebro de ratones alimentados con dietas conteniendo diferente perfil de AG insaturados (AGI). Ratones CF1 macho (25g) ($n=6$), fueron alimentados (60 días) con dietas que difieren en la fuente de grasa dietaria: aceite de canola (C), maíz (M) u oliva (O) y en la presencia o no de 0.75% AGt (Ct, Mt y Ot). Se determinó la composición de AG en cerebro mediante cromatografía gaseosa, y se comparó la retención de isómeros con la de otros tejidos (adiposo, hígado y suero). Los resultados (promedio \pm SEM) se analizaron por ANOVA, seguido de test

de Tukey. Significancia: $p < 0,05$. No se observó incorporación de AGt en cerebro, pese a que la retención de AGt totales fue significativa en otros tejidos (AG%; en tejido adiposo: 3,43-3,78, hígado: 1,77-1,86 y suero: 2,32-3,55). En cerebro, el tipo de grasa dietaria y en menor medida los AGt modificaron la composición de 18:2 n-6 (AL)(%): C:0,59±0,10^{ab}; Ct:0,51±0,02^{ab}; M:0,86±0,13^c; Mt:0,63±0,02^b; O:0,42±0,04^a; Ot:0,34±0,02^a. No obstante, los niveles de AGPI-CL sólo se modificaron por la fuente de grasa dietaria y no por la suplementación con AGt; 20:4 n-6 (AA)(%): C:8,8±0,1^a; M:10,4±0,2^b; O:9,5±0,1^c y 22:6 n-3 (DHA)(%): C:16,1±0,5^a; M:15,4±0,7^{ab}; 13,1±0,8^b. Los resultados muestran que: 1) a diferencia de otros tejidos el cerebro presenta una alta resistencia a incorporar AGt, independientemente de la fuente de grasa dietaria; 2) la fuente de grasa dietaria afectó en mayor medida que los AGt los niveles de AGPI-CL y 3) los AGt estarían modificando sólo los niveles de AL en cerebro, pudiendo a largo plazo afectar la producción de AA y de esta manera funciones del Sistema Nervioso Central.

067. (722) DESBALANCE ENTRE EL SISTEMA PRO Y ANTI-OXIDANTE EN PULMÓN DE ANIMALES CASTRADOS Y ACCIÓN DE HSP27 Y 70

Escobar S.; Pacheco Guíñazu A.; Biaggio V.; Alvarez S.; Piguillem S.; Pérez Chaca M.; Ciminari M.; Gomez N. *Universidad Nacional de San Luis.*

Introducción: El estrés oxidativo tiene un rol importante en numerosas patologías pulmonares. Además, hay numerosas evidencias que revelan la acción de las proteínas de golpe de calor (HSP), principalmente en cuadros inflamatorios. Sumado a ello la presencia de receptores de andrógenos (RA) en pulmón implicaría la acción de hormonas sexuales, que jugarían un rol fisiológico en el órgano. **Objetivo:** Nuestro objetivo fue investigar el rol de las HSP 27 y 70i en pulmón de animales castrados asociado al comportamiento de los componentes del sistema de defensa antioxidante. **Objetivo secundario,** determinar si la situación puede ser revertida con administración de testosterona. **Materiales y Métodos:** Se usaron ratas Wistar (200 ± 20g) las cuales fueron separadas en 3 lotes: controles (Co), castradas (Ca) y castradas con Testosterona (Ca+T) que se sacrificaron a los 30 días. Se determinó el grado de lipoperoxidación cuantificando (TBAR'S). Se extrajo RNA total, se obtuvo ADNc y se realizaron PCR, usando como control interno S28. Se investigó la expresión de Hsp 27 y 70i por inmunohistoquímica (IHQ). Asimismo se determinó la actividad de CAT y Gpx en homogenatos de pulmón. **Resultados:** En el grupo Ca, aumentaron los niveles de RA ($p < 0,01$), TBARS ($p < 0,01$) al igual que las actividades de las enzimas CAT ($p < 0,01$) y GPx ($p < 0,05$). También aumentó la expresión de GPx ($p < 0,05$), Nox ($p < 0,01$) y NRF-2 ($p < 0,05$). TNF-alfa e IFN-gamma disminuyeron su expresión ($p < 0,05$). Se incrementó la inmunomarcación positiva para Hsp 70 en Ca ($p < 0,01$), mientras que Hsp 27 disminuyó ($p < 0,001$). Ca + T revertiría el cuadro en algunos parámetros. **Conclusión:** Nuestro modelo experimental estaría demostrando un desbalance entre el sistema pro y antioxidante, con un cuadro inflamatorio al que el organismo trata de resolver. Sumado a ello, las HSP estarían asociadas a una respuesta de protección ante la injuria producida.

068. (730) EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN MÉDULA ÓSEA Y BIOMARCADORES DE RECAMBIO ÓSEO EN RESPUESTA A PROPRANOLOL EN UN MODELO ANIMAL DE RETARDO DEL CRECIMIENTO (RCCN)

Tasat D.¹; Lezn C.²; Astort F.¹; Pintos P.²; Ramos C.³; Champin G.²; Friedman S.³; Boyer P.² *Catedra de Histología¹, Catedra de Fisiología², Catedra de Bioquímica³, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.*

Introducción. Existe evidencia de la participación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 en la patogénesis de la osteoporosis. **Objetivo.** Evaluar la expresión de las citoquinas IL-6, TNF- α e IL-10 en médula ósea como posibles mediadores involucrados en modificaciones del remodelado óseo con conse-

cuencias negativas sobre la calidad ósea en ratas RCCN con/sin propranolol. Asimismo, se determinaron CTX, osteocalcina, PTH, calcio y fósforo séricos. **Materiales y métodos.** Ratas macho de la cepa Wistar de 21 días se dividieron en 4 grupos: Control (C), C + P (CP), RCCN y RCCN + P (RCCNP). C y CP recibieron una dieta para roedores ad libitum; RCCN y RCCNP recibieron por cada 100 gr de peso corporal un 80% de la misma dieta que C y CP, respectivamente, durante 4 semanas. P (7mg/Kg/día) por vía ip, 5 días/semana durante 4 semanas en los grupos CP y RCCNP. C y RCCN recibieron solución salina vía ip. Se registraron peso y longitud corporales y consumo diario de alimento. A Tfinal post-eutanasia se extrajo sangre para las determinaciones bioquímicas, y ambos Femures para la determinación de mRNA de citoquinas en médula ósea. **Resultados.** A Tfinal, tamaño corporal: RCCN y RCCNP < C y CP, ($P < 0,001$). sCTX: RCCN > C ($P < 0,001$); RCCNP < RCCN ($P < 0,01$). Osteocalcina, PTH, Calcemia y fosfatemia: no DS entre grupos ($P > 0,05$). IL-6 mRNA: RCCN < RCCNP ($P < 0,01$), C ($P < 0,05$) y CP ($P < 0,05$); TNF- α mRNA: RCCN > NGPR ($P < 0,05$), C ($P < 0,001$) y CP ($P < 0,001$); IL-10 mRNA: RCCN < RCCNP ($P < 0,001$), C ($P < 0,05$) y CP ($P < 0,05$). **Conclusiones.** El microambiente proinflamatorio en médula ósea de RCCN resultaría en un desequilibrio del remodelado óseo a expensas de un incremento de la resorción ósea. El propranolol, en el régimen administrado, proveería un entorno medular apropiado necesario para una adecuada calidad ósea en el presente modelo de estrés nutricional. UBACyT 20020100100070.

069. (753) REMISIÓN BIOQUÍMICA Y CLÍNICA PERMANENTE EN PACIENTES CON PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

Melito V.^{1,2}; Rossetti M.^{1,2}; Batlle A.¹; Parera V.¹ *Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET-UBA¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².*

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) se produce por mutaciones en el gen que codifica para la Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-D). Generalmente se manifiesta luego de la pubertad por acción de agentes desencadenantes como el ayuno, ciertas drogas, alcohol, hormonas esteroides, estrés, que pueden precipitar los ataques agudos característicos: dolores abdominales y manifestaciones neurológicas. Los precursores ácido delta aminolevulíco (ALA) y porfobilinógeno (PBG) están significativamente aumentados y pueden continuar elevados durante la remisión. El objetivo fue evaluar la eficacia del tratamiento de los ataques agudos con glucosa, ácido fólico y un complejo de vitaminas B. La administración de grandes cantidades de carbohidratos durante los ataques y en los períodos de remisión es la base fundamental del tratamiento nutricional, indicado como una dieta personalizada por un nutricionista especializado. Los carbohidratos actuarían a través del mecanismo conocido como efecto glucosa, inhibiendo la enzima regulatoria ALA-Sintetasa. Se seleccionaron 24 pacientes, pertenecientes a 22 familias no relacionadas, que fueron diagnosticados entre los 19 y 48 años de edad. Los valores de precursores al diagnóstico variaron entre 4,9 a 47,7 mg/24h para el ALA y 12,6 a 185,0-mg/24h para el PBG. Luego del tratamiento, disminuyeron a valores normales ALA (4 mg/24h) y PBG (2 mg/24h). Una vez alcanzada la remisión, estos pacientes continuaron con un tratamiento de mantenimiento con ácido fólico, glucosa y complejo vitamínico B, sin haber desarrollado nuevos ataques durante 4-19 años. Esta recuperación no está relacionada con la mutación presente en el gen que codifica para la PBG-D, pues en estas 22 familias hemos descrito 16 mutaciones distintas. En conclusión, el correcto manejo clínico de los pacientes porfiricos lleva a una pronta recuperación de la crisis y a una remisión permanente, teniendo en cuenta que ninguno de ellos ha sufrido otro ataque hasta el presente.

ONCOLOGÍA 1

070. (38) GALECTINA-1 EN EL MICROAMBIENTE DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO

Manzi M.¹; Bacigalupo M.¹; Elola M.¹; Wolfenstein C.¹; Rabinovich G.²; Espelt M.¹; Troncoso M.¹
Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET².

Galectina-1 (Gal1) es una proteína con afinidad por β -galactósidos. En algunos tumores y en las células endoteliales asociadas al tumor, la sobreexpresión de Gal1 se asocia con la agresividad y diseminación del tumor y la angiogénesis. Previamente demostramos que el aumento de expresión de Gal1 en células de carcinoma hepatocelular (HCC) promueve la proliferación, el crecimiento tumoral y metástasis. Nuestro objetivo fue evaluar la relevancia del aumento de Gal1 en el microambiente tumoral. Gal1 recombinante, al igual que medios condicionados de células de HCC que sobreexpresan Gal1 (HepG2G2), promovieron la proliferación de células endoteliales sinusoidales asociadas al HCC, SK-HEP-1 ($120 \pm 8\%$ $p < 0,01$; $130 \pm 9\%$ $p < 0,001$, respectivamente *t de student*; 72 h; Kit de proliferación MTS). Mediante microscopía de fluorescencia, se observó una mayor adhesión de células HepG2G2 a monocapas de células SK-HEP-1 ($146 \pm 9\%$ $p < 0,05$ *t de student*; 15 min). Este efecto se inhibió en presencia de lactosa ($101 \pm 3\%$ $p < 0,05$ *t de student*). Pacientes con HCC presentan altos niveles del factor de crecimiento tumoral $\beta 1$ (TGF $\beta 1$). Además, TGF $\beta 1$ induce la expresión de Gal1 en células de adenocarcinoma mamario. Por Western blot, se determinó que la incubación con TGF $\beta 1$ (5 ng/ml) aumentó la expresión de Gal1 en células HepG2 (176 ± 32 $p < 0,05$ *t de student*, 48h). Hasta el momento, se desconocían ligandos para Gal1 en las células SK-HEP-1. A partir de la fracción de membranas y mediante espectrometría de masa, se aisló e identificó una metaloexopeptidasa, aminopeptidasa (APN/CD13). El aumento de Gal1 en las células de HCC promovió la adhesión al endotelio y estimuló la proliferación de las células endoteliales sinusoidales, sugiriendo que Gal1 contribuye en la invasión y angiogénesis tumoral. TGF $\beta 1$ podría contribuir al incremento de los niveles de Gal1 en los hepatocitos tumorales. El hallazgo del ligando CD13 nos permitirá ampliar el conocimiento sobre el papel de Gal1 en el microambiente del HCC.

071. (50) LA HIPOXIA INTRATUMORAL COMO MODULADOR DE LA RESISTENCIA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA
 Lamberti M.; Pansa M.; Rumie Vittar N.; Rivarola V.
Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

La resistencia a intervenciones terapéuticas convencionales, observada en tumores sólidos se atribuye en gran medida a su desarrollo dentro de un microambiente hipóxico. El O₂ es un factor determinante de la citotoxicidad de la terapia fotodinámica (TFD), tratamiento que consiste en la aplicación de un compuesto fotoactivable. Por ello, este trabajo se enfocó en caracterizar el efecto de la hipoxia intratumoral en relación a la resistencia a la TFD utilizando Me-ALA como precursor del fotosensibilizador (FS) PpIX. Para imitar microtumores avasculares se estandarizaron modelos de cultivos tridimensionales (3D) de células de carcinoma colorrectal SW480. Los cultivos 3D resultaron ser 3 veces más resistentes a la TFD en comparación con los cultivos 2D. La eficiencia terapéutica se incrementó prolongando el tiempo de incubación "células-FS" para lograr una distribución homogénea de PpIX dentro del esferoide. Por medio de ensayos de viabilidad se observó que la periferia del esferoide fue la región más afectada por la TFD y el centro la zona con mayor supervivencia. Debido a que la respuesta molecular frente a la hipoxia es dirigida por el factor de transcripción HIF-1, se utilizó un gen reportero que demostró su actividad en el interior de la estructura 3D correspondiendo a la zona hipóxica del microtumor. Esta observación explicaría en parte la fotoresistencia observada. Para confirmar la implicancia de la hipoxia intratumoral en este fenotipo resistente, se aplicó CoCl₂ (mimético químico de hipoxia) a cultivos 2D (no hipóxicos) previo a la TFD. Se demostró que la presencia de CoCl₂ estabilizó la expresión de HIF-1 y esto se correlacionó con una disminución de la sensibilidad a la TFD. Los resultados sugieren que la resistencia a la TFD inducida por el microambiente hipóxico

debe ser tenida en cuenta en el diseño de protocolos terapéuticos. Proponemos identificar marcadores moleculares y/o celulares claves para contrarrestar la fotoresistencia tumoral.

072. (52) EFECTO DE COMPUESTOS ADRENÉRGICOS EN LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS DE MATRIZ (MMP) Y EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANA
 Rivero E.; Gargiulo L.; Bruzzone A.; Luthy I.
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET.

Trabajos previos demuestran que en células tumorales de mama humana, la activación de receptores $\beta 2$ -adrenérgicos ($\beta 2$ -RA) inhibe la proliferación y el crecimiento tumoral, mientras que la estimulación de los $\beta 2$ -RA incrementa estos parámetros. Además describimos un efecto antimigratorio del salbutamol, un agonista $\beta 2$ -AR (Salb), en la línea metastásica MDA-MB-231 pero no en la línea no metastásica MCF-7. El objetivo fue evaluar el efecto de agonistas y antagonistas adrenérgicos en la migración de otras líneas tumorales de mama humana (IBH-4 e IBH-6) utilizando la técnica de cierre de herida en monocapa, y determinar por zimografía si estos compuestos son capaces de modular la actividad de MMPs en las 4 líneas mencionadas. En la línea IBH-6, pero no en la IBH-4, el Salb 1 μ M disminuyó la migración celular (IBH-6: $58 \pm 15\%$ disminución con respecto al control, $p < 0,001$). Ambas líneas poseen actividad basal de MMP2, la cual no se moduló por los compuestos adrenérgicos. La línea MCF-7 no presentó actividad de MMP2 ni MMP9 y tampoco se observó modulación de la actividad de MMP9 cuando se estimuló con 10 nM PMA. En células MDA-MB-231 se observó una reducción en la actividad de MMP9 tanto con la catecolamina endógena epinefrina 1 μ M ($43 \pm 12\%$ reducción respecto al control, $p < 0,001$) como con 1 μ M Salb ($32 \pm 16\%$ reducción respecto al control, $p < 0,01$) sugiriendo un efecto mediado por el $\beta 2$ -RA. No se observó efecto en ningún parámetro con compuestos $\beta 2$ -RA. Por real-time PCR, se encontró que la línea MDA-MB-231 expresa 200 veces más $\beta 2$ -RA que la línea MCF-7 y 15 veces más que las IBH-4 e IBH-6 ($p < 0,001$). En conclusión, en la línea MDA-MB-231 (que expresa altos niveles de $\beta 2$ -RA), el Salb disminuye la actividad de MMP9. Dado que, el Salb disminuye la proliferación y la migración celular, estos resultados sugerirían que el Salb podría inhibir también su capacidad invasiva. En el futuro se evaluarán parámetros relacionados con la progresión metastásica.

073. (82) QUIMIO-GENOTERAPIA EN CÉLULAS DE MELANOMA CANINO: TRATAMIENTO COMBINADO DE BLEOMICINA Y LIPOFECCIÓN DEL SISTEMA DE GEN SUICIDA HSVTK/GCV O DEL GEN INTERFERÓN BETA CANINO
 Fondello C.; Glikin G.; Finocchiaro L.
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

Se evaluó la sensibilidad a la co-administración de complejos DNA/lípidos (*lipoplexes*) y bleomicina, en 2 líneas celulares de melanoma espontáneo canino (Ak y Ol). La lipofección de la línea Ol con el sistema del gen suicida (timidina quinasa del virus herpes simplex: HSVtk/GCV) (GS), con o sin bleomicina, disminuyó significativamente la sobrevida (17% y 20% , respectivamente) ($p < 0,05$). Esto se reflejó en un aumento en la fracción de células en subG0 y con daño en el DNA (positivas para γ H2AX). En cambio, la citotoxicidad producida por la lipofección del gen Interferón beta canino (cIFN- β) (34%) aumentó significativamente ($p < 0,05$) por agregado de bleomicina (78%). Este mayor efecto citotóxico de la combinación, se correlacionó con un aumento en el porcentaje de células: i) en SubG0 y ii) con daño en el DNA. Esta genotoxicidad, posiblemente por estrés oxidativo, se correlacionó con un aumento significativo de los niveles de oxidantes intracelulares (ROS). El tratamiento de la línea Ak con el sistema de GS, con o sin bleomicina, disminuyó significativamente la sobrevida con respecto al control ($56,28\%$ y $41,51\%$, respectivamente). En ambos casos, el tratamiento generó una alteración en el perfil del ciclo celular aumentando la proporción de células sintetizando activamente DNA en las fases S y G2/M y región hiperdiploide. Además, se

vio un aumento en el porcentaje de células positivas para γ H2AX y en la fracción subG0. La citotoxicidad del gen del $\text{cIFN-}\beta$ en estas células (56%) no varió significativamente por combinación con bleomicina (72%). En ambos casos se vio un aumento en el porcentaje de células positivas para γ H2AX. Sin embargo, sólo el tratamiento combinado con bleomicina aumentó el porcentaje de células en subG0. Próximamente, evaluaremos los efectos antitumorales de la quimio-inmunoterapia genética en el marco de un protocolo clínico veterinario para el tratamiento de tumores que aún no cuentan con una terapia adecuada.

074. (591) EL 99mTc-SESTAMIBI COMO MARCADOR FUNCIONAL EN CARCINOMA DE MAMA. ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO

Tesan F.; Salgueiro M.; Martinel Lamas D.; Leonardi N.; Medina V.; Zubillaga M.

Laboratorio de Radioisotopos, Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El ^{99m}Tc -sestamibi, propuesto como radiofármaco para ser utilizado en la predicción de la respuesta a la terapia tumoral en la clínica, ha sido postulado como ligando de MRP1, MRP2, Pgp y BCRP asociadas con la multi-resistencia a drogas. Evidenciar y caracterizar un proceso fisiológico específico de una célula tumoral sensible con esta sonda radiactiva sería de utilidad tanto en la clínica como en investigación. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética de captación de ^{99m}Tc -sestamibi *in vitro* y evidenciar la existencia de eflujo (asociado a quimio-resistencia) así como evaluar la cinética de captación *in vivo* a través de imágenes. **Materiales y Métodos:** Se cuantificó la captación y el eflujo *in vitro* de ^{99m}Tc -sestamibi en las líneas tumorales de carcinoma mamario MCF-7 y MDA-MB-231 a distintos tiempos: 20, 40, 60 y 80 min. Para ello se incubaron 10^6 células con 20 uCi de ^{99m}Tc -sestamibi. Para el análisis de la captación y biodistribución *in vivo* se inyectó el radiofármaco en ratones nude con xenoinjertos de tumores de células MDA-MB-231. Las imágenes fueron adquiridas en una cámara gamma planar a los 30, 60, 120 y 180 minutos. **Resultados:** Se observó una cinética de captación similar para ambas líneas celulares con un máximo a los 60 min. Además se confirmó la presencia de ^{99m}Tc -sestamibi en el espacio extracelular de las MCF-7 dejando en evidencia el eflujo de este radiofármaco en esta línea celular. Con respecto al análisis *in vivo* no se observó una captación diferencial del radiofármaco por el tumor para ninguno de los tiempos evaluados. **Conclusión:** estos resultados preliminares presuponen que el ^{99m}Tc -sestamibi podría ser utilizado como sonda para evaluar la expulsión de sustratos hacia el espacio extracelular en líneas celulares en cultivo. El traslado a la investigación clínica requiere de implementar estrategias de formulación, delivery ó bloqueo del eflujo para facilitar el seguimiento de ese proceso *in vivo* a través de imágenes.

075. (149) MODULACIÓN DE LA PROGRESIÓN TUMORAL POR NARINGENINA EN LAS CÉLULAS SCA-9

Dmytrenko G.; Castro M.; Español A.; Sales M.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEBYBO)-CONICET.

Los flavonoides son polifenoles de origen vegetal conocidos por producir efectos beneficiosos para la salud. Evidencias recientes indican que los flavonoides pueden activar a los receptores T2R para el gusto amargo, de siete dominios transmembrana. En trabajos anteriores demostramos la presencia de T2R en células SCA-9 derivadas de un tumor de glándula salival murina. La activación de estos receptores con el agonista amargo denatonio aumentó la proliferación celular, la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A) y la respuesta angiogénica inducida *in vivo* por las células SCA-9. En este trabajo estudiamos el efecto del flavonoide naringenina (N) sobre la proliferación de células SCA-9 con el reactivo MTT, el crecimiento tumoral tridimensional (3D) por medio de la formación de esferoides en suspensión, la producción de óxido nítrico (NO) mediante la técnica de Griess, la respuesta neovascular *in vivo* y la

expresión de VEGF-A por Western blot en el sitio de inoculación del tumor. Observamos que la estimulación de las células SCA-9 con N aumenta la proliferación celular con una concentración efectiva máxima de 10^{-7}M ($73\pm 13\%$ vs. control, $p<0,001$) y el crecimiento 3D ($28\pm 4\%$, $p<0,05$ vs. control). La producción de NO disminuyó en un $23\pm 5\%$ ($p<0,001$ vs. control). Además N incrementó la respuesta neovascular (N° de vasos/ mm^2 de piel) producida por las células SCA-9 en ratones singéneos con respecto al control ($N=3.25\pm 0.49$; control= 2.05 ± 0.38 ; $p<0,001$, $n=6$) y también aumentó la expresión de VEGF-A en el sitio de inoculación tumoral en un $98\pm 13\%$ ($p<0,01$ vs. células sin tratamiento). Concluimos que en nuestro modelo la estimulación con N potencia la progresión tumoral al incrementar la proliferación celular y la angiogénesis tumoral *in vivo*, lo que podría estar mediado por los T2Rs.

076. (213) IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES SOLUBLES Y NO SOLUBLES QUE REGULAN LA PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA HUMANO

Fletcher S.¹; Coló F.²; Pistone Creydt M.²; Sacca P.¹; Carón R.³; Calvo J.^{1,4}; Pistone Creydt V.³

Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Instituto de Oncología "Alexander Fleming"²; Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CCT Mendoza-CONICET³; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁴.

Demostamos recientemente que los medios condicionados (MCs) de explantes de tejido adiposo humano de mamas tumorales (EATh) regulan la proliferación, adhesión y migración de líneas celulares epiteliales tumorales mamarias; a diferencia de los MCs de explantes de tejido adiposo de mamas normales (EANh). Objetivos: 1) identificar por WB componentes presentes en los MCs de EATh y EANh; y en las líneas celulares epiteliales de mama tumorales (MCF-7 e IBH-7) y no tumorales (MCF-10A y HBL100) incubadas con los diferentes MCs; 2) evaluar cambios en el tamaño de los adipocitos, de diferentes tejidos adiposos mamarios, por tinción con H/E y cuantificación al microscopio. Utilizamos los MCs luego de 24h de incubación de los EATh ($n=9$) y EANh ($n=6$). Evaluamos la expresión del proteoglicano vérsican y de la metaloproteasa ADAMTS1 en los MCs. Incubamos células MCF-10A, HBL100, MCF-7 e IBH-7 con los MCs por 24h (HCAM), 10 min y 2h (pERK/ERKt), lisamos las células y evaluamos la expresión de la proteína de adhesión HCAM y de pERK/ERK totales por WB. Realizamos cortes de EATh y EANh incluidos en parafina, tinción con H/E y evaluamos cambios del área de los adipocitos en: a) tejido adiposo de mamas normales, b) tejido adiposo pegado al frente invasivo del tumor, y c) tejido adiposo de mamas tumorales, a 2cm del tumor. Observamos una mayor expresión tanto de vérsican como de ADAMTS1 en los MCs-EATh respecto a la expresión en los MCs-EANh ($p<0,05$). Así mismo, observamos un aumento de la expresión de HCAM ($p<0,05$) y de pERK ($p<0,01$) en las células epiteliales tumorales MCF-7 e IBH-7 incubadas con MCs-EATh comparado a la expresión observada con los MCs-EANh y MC-control ($p<0,05$). Por último, observamos que los adipocitos asociados al tumor (frente invasivo) presentaron un tamaño reducido respecto a los adipocitos que se encuentran a mayor distancia ($p<0,05$). La identificación de estos y otros factores podrían proporcionar nuevas estrategias para prevenir y/o tratar el cáncer de mama.

077. (244) EFECTO DE LA PROTEÍNA X DEL VIRUS HEPATITIS B (HBV) SOBRE MDR1, MRP1 Y BCRP: POTENCIALES NUEVAS IMPLICANCIAS EN LA HEPATITIS B CRÓNICA, LA ONCOGÉNESIS VIRAL Y LA TERAPÉUTICA

Cuestas M.^{1,2}; Castillo A.^{1,2}; Gentile E.^{1,2}; Delfino C.^{1,2}; Oubiña J.^{1,2}; Mathet V.^{1,2}

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Argentina².

Introducción. El carcinoma hepatocelular (HCC) representa el 4% de los tumores de todo el mundo y la quinta causa de cáncer en el hombre. Cerca del 80% de los pacientes con HCC se encuentran crónicamente infectado con el virus Hepatitis B (HBV). La proteína X del HBV desempeña un rol principal en la oncogénesis hepática, y su triple mutante (I127T/ K130M /V131I) exhibe una actividad transactivadora mayor que la salvaje, contribuyendo significativamente a la hepatocarcinogénesis. Las proteínas ABC son bombas transmembrana que transportan sustratos en contra del gradiente de concentración. La sobreexpresión de algunos de sus miembros- como MDR1, MRP1 y BCRP- está asociada a la resistencia a múltiples drogas. La sobreexpresión de algunos de estos miembros (MDR1 y MRP1) está asimismo asociada con la inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis y el cáncer. **Objetivo.** Analizar el efecto de la expresión de la proteína X salvaje (Xsal) y de la triple mutante (Xmut) del HBV sobre los niveles de ARNm de *mdr1*, *mrp1* y *bcrp*, así como sobre los niveles de expresión de las proteínas homónimas. **Diseño del Estudio.** La línea celular Huh7 fue transfectada con plásmidos que codifican para la proteína Xsal o Xmut del HBV. Al cabo de 24 y 72 h. de expresión transitoria, los niveles de ARNm y de proteína de los genes *mdr1*, *mrp1* y *bcrp* fueron evaluados mediante RT-qPCR y *Western Blot*, respectivamente. **Resultados.** Se observó: (i) un aumento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de BCRP –medidos por *Western Blot*- en aquellos cultivos que expresaron Xsal por 24 y 72h, así como en los que expresaron Xmut por 72h; y (ii) un aumento estadísticamente significativo en los niveles de la proteína MRP1 en las células Huh7 luego de 24h de expresión de Xmut. **Conclusiones:** Dichos hallazgos ameritan su análisis *ex vivo* para evaluar las potenciales nuevas implicancias –al menos de *bcrp* y *mrp1*- en la hepatitis B crónica, la oncogénesis hepática y en el tratamiento del HCC.

078. (255) INTERACCIÓN ENTRE RUNX1 Y FOXP3: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RSPO3 Y LA MIGRACIÓN CELULAR

Recouvreur M.¹; Cambados N.²; Schere Levy C.²; Simian M.¹; Castilla L.³; Kordon E.²; Rubinstein N.^{2,4}
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"; *IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*; *Program In Gene Function and Expression, Umass, Worcester, USA*³; *Departamento de Biomedicina, Universidad de Basel, Basel, Suiza*⁴.

Nuestro laboratorio estudia la actividad y regulación del oncogén **SPO3**, el cual es capaz de inducir tumorigénesis mamaria. Recientemente hemos demostrado que la sobre-expresión del factor de transcripción (FT) Runx1 es capaz de regular la expresión de RSPO3 e interaccionar físicamente con el FT Foxp3 en células epiteliales mamarias murinas normales, SCP2. A través de ensayos de CHIP (en células tumorales humanas (H) y murinas (M)) demostramos que Runx1 interacciona con el promotor de RSPO3. Por otro lado, se ha demostrado que Foxp3 inhibe la actividad transcripcional de Runx1 a través del contacto proteína-proteína definiendo una subpoblación de linfocitos. Además, se ha postulado a Foxp3 como un supresor tumoral en epitelio mamario normal. El objetivo de este trabajo fue analizar, en células epiteliales mamarias tumorales (H y M), la capacidad de Runx1 de modular la expresión de RSPO3 e investigar el rol de Foxp3 en esta regulación. Mediante la utilización de un dominante negativo de la actividad transcripcional de Runx1 pudimos observar una disminución significativa de la expresión de RSPO3 y la capacidad migratoria celular en células tumorales. Por otro lado, la disminución de la expresión de Foxp3 en SCP2 reflejó un aumento significativo en la actividad transcripcional de Runx1 y en la expresión de RSPO3. Asimismo, la inducción de la expresión de Foxp3 en células tumorales fue acompañada por una menor expresión de RSPO3. Estos resultados sugieren fuertemente que Runx1 es capaz de promover la transcripción de RSPO3 en epitelio mamario solo cuando la expresión de Foxp3 está reducida (fenotipo tumoral). Asimismo sugieren que Runx1 podría contribuir en la tumorigénesis mamaria regulando positivamente la expresión

de oncogenes y promoviendo la migración celular. Los resultados obtenidos **describen un potencial nuevo mecanismo de regulación de genes en glándula mamaria y postular a Runx1 como un posible modulador de la progresión tumoral.**

079. (258) BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG) INDUCE DISMINUCIÓN DEL FGFR3 EN EL CÁNCER DE VEJIGA

Langle Y.¹; Belgorosky D.¹; Sahores A.²; Gongora A.²; Baldi A.²; Lanari C.²; Lamb C.²; Eijan A.¹
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"; *Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET*².

Bacilo Calmette Guerin (BCG) es el tratamiento estándar en el cáncer vejiga (CaV) no músculo invasor (NMI) de alto grado. Anteriormente demostramos que BCG inhibe el crecimiento en tumores murinos MB49, mediado por proliferación y diferenciación de fibroblastos (FB) en respuesta al FGF-2 producido tanto por ellos, como por macrófagos y células MB49. Observamos que los FB y las células MB49 expresan FGFR3. Se han descrito que mutaciones activantes y sobre-expresión del FGFR3 son responsables de la carcinogénesis en pacientes con CaV NMI. Nuestro **objetivo** fue analizar la relevancia del FGFR3 en respuesta a BCG en el CaV. Para cumplir este objetivo estudiamos la respuesta a BCG en células MB49 luego del silenciamiento del FGFR3. Así mismo, evaluamos la expresión de FGFR3 luego del tratamiento con BCG en a) en células murinas (MB49), humanas (T24) y tumores de pacientes por western blot, b) en tumores murinos por inmunohistoquímica. **Resultados:** el silenciamiento del FGFR3 no disminuyó la proliferación de MB49 pero aumentó la muerte inducida por BCG (p<0.005). BCG redujo un 50% la expresión del FGFR3 (isoforma madura y fragmentos de clivaje) en MB49 y T24 (p<0.05). El 20% de los tumores humanos tratados *in vitro* con BCG muestran disminución de la expresión del FGFR3. Los tumores MB49 tratados con BCG presentaron menor expresión del FGFR3 que los controles (p<0.01), observándose una correlación entre inhibición con BCG y la menor expresión del FGFR3. Podemos concluir que la disminución del FGFR3 está implicada en la inhibición del crecimiento tumoral inducido por BCG. Ya que se ha visto a la expresión del FGFR3 asociada a los inicios del CaV, el hecho de que BCG regule negativamente este receptor, nos habla de un novedoso mecanismo de acción de BCG.

080. (289) INCIDENCIA DE SEGUNDAS NEOPLASIAS MALIGNAS EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA EN EL HOSPITAL DE PEDIATRÍA JP GARRAHAN

Ottaviani D.¹; Alonso C.¹; Sampor C.²; Fandino A.³; García De Davila M.⁴; Szijan I.⁵; Chantada G.²
Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Hemato-Oncología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"; *Servicio de Hemato-Oncología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"*²; *Servicio de Oftalmología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"*³; *Servicio de Patología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"*⁴; *Laboratorio de Neurobiología Molecular, Hospital de Clínicas José de San Martín*⁵.

El retinoblastoma (RB) es el cáncer intraocular más frecuente en la niñez, con un promedio de 44 nuevos casos por año en Argentina. Aproximadamente la mitad de los casos son hereditarios (85% bilaterales y 15% unilaterales), con uno de los alelos del gen *RB1* mutado en la línea germinal, lo cual supone un riesgo aumentado de desarrollar segundas neoplasias malignas (SNM), en comparación con la población normal. Los reportes de la literatura provienen de países desarrollados donde el RB se diagnostica tempranamente y es menor el uso de tratamientos intensos. Se desconoce la prevalencia y distribución de SNM en nuestro medio. El objetivo de este trabajo es presentar el primer reporte del país de SNM en pacientes con RB tratados en el Hospital Garrahan durante 25 años. Desde enero de 1988 se diagnosticaron 693 casos de RB (263 bilaterales). Doce de ellos, 11 con RB bilateral y 1 con RB unilateral, desarrollaron SNM: 4 osteosarcomas de extremidad, 1 tumor de Ewing, 1 sarcoma de partes blandas, 1 astrocitoma de

bajo grado, 1 ependimoma, 3 casos de leucemia mieloide aguda (LMA) y 1 caso de leucemia linfoblástica aguda. Sólo 2 de ellos ocurrieron en el campo de la radioterapia (RT). La mediana del tiempo entre la fecha de diagnóstico de RB y el desarrollo de la SMN (latencia) fue 14 años para los tumores sólidos (rango: 6,3-18,5 años) y 3 años para las leucemias (rango: 3 meses-7,5 años). El tratamiento recibido por la población total de pacientes con RB fue: enucleación (EN)(n=567), quimioterapia (QT)(n=377) y/o RT (n=173). Los pacientes bilaterales que desarrollaron SNM habían recibido como tratamiento para RB EN (n=9), QT (n=8) y/o RT (n=11). El paciente unilateral fue tratado únicamente con la EN del ojo afectado. Conclusiones: El osteosarcoma es la SNM más frecuente, seguido por la LMA lo cual se correlaciona con un mayor uso de QT en pacientes con enfermedad avanzada. La incidencia de tumores secundarios en el campo de la RT es menor que lo reportado.

081. (293) LA COMBINACIÓN DE BAJAS DOSIS DE CPS49 Y FLAVOPIRIDOL DISMINUYEN EL CRECIMIENTO TUMORAL DE PRÓSTATA IN VIVO

Zalazar F.^{1,2}; De Luca P.^{1,2}; Meiss R.³; Vallecorsa P.³; Figg W.⁴; Elguero B.²; Cotignola J.²; Vázquez E.²; De Siervi A.^{1,2}
Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Laboratorio de Inflamación y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Academia Nacional de Medicina³; National Institutes of Health (NIH), USA⁴.

El cáncer de próstata (PCa) resistente a castración (CRPC) es la primera causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo. En este trabajo investigamos nuevas estrategias quimioterapéuticas para el CRPC utilizando modelos pre-clínicos. Evaluamos los efectos de bajas dosis de tres agentes: CPS49, flavopiridol o paclitaxel, aplicándolos como drogas únicas y sus combinaciones. Los resultados mostraron que el flavopiridol y el paclitaxel son agentes altamente citotóxicos en varias líneas de PCa. La combinación de CPS49 con estos agentes disminuyó significativamente la viabilidad de las líneas de PCa sin afectar la viabilidad de la línea no-tumoral HEK293. Asimismo, la combinación de flavopiridol y CPS49 arrestó el ciclo celular, indujo la apoptosis e inhibió la formación de colonias de células PC3. Finalmente, ésta combinación redujo significativamente el crecimiento tumoral en ratones *nude* xenotransplantados con células PC3, utilizando dos esquemas de administración de las drogas. Sin embargo, la combinación de CPS49 con paclitaxel no produjo cambios significativos en el volumen tumoral en el modelo evaluado. Los análisis histológicos de los tumores extraídos de los animales tratados con CPS49 y flavopiridol mostraron extensas áreas de necrosis inducidas por el tratamiento. Realizando un *array* de expresión por RT-qPCR de 22 genes, a partir de las células PC3 o de los tumores extraídos de los animales expuestos a la combinación de CPS49 con flavopiridol, demostramos que este tratamiento disminuyó la expresión de un grupo de genes involucrados en adhesión, migración e invasión celular. En resumen, la actividad antitumoral de la combinación de CPS49 con flavopiridol es una terapia prometedora para el tratamiento de PCa. Debido a que las dosis evaluadas fueron la mitad de las dosis previamente publicadas para cada agente por separado, esta estrategia terapéutica permitirá aumentar la eficacia disminuyendo los efectos colaterales de los compuestos en los pacientes.

082. (298) ESTUDIO DE PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV) EN MAR DEL PLATA

Quintana S.¹; Guerra F.²; Di Gerónimo V.¹; Estevez M.¹; Palaoro L.²
Laboratorio de Biología Molecular, Fares Taie Instituto de Análisis¹; Laboratorio de Citología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

La relación entre la infección por el virus papiloma humano (HPV) de alto riesgo y el cáncer de cuello de útero ha sido bien

demostrada. En la Argentina se observa una alta incidencia de esta patología y en consecuencia se estima una alta prevalencia de infección por HPV. El objetivo del presente trabajo fue identificar los genotipos de HPV asociados a casos de lesiones malignas y pre-malignas de cuello de útero. Se estudiaron 99 muestras ecto-endo cervicales de mujeres con alteraciones cito-histológicas compatibles con infección por HPV. La genotipificación de los virus fue realizada por amplificación por PCR en tiempo Real con los *primers* genéricos My9-11 y/o GP5-GP6 con posterior análisis por secuenciación. Se realizó también un control interno amplificando beta actina humana para chequear la correcta extracción del ADN y ausencia de inhibidores para evitar falsos negativos. De las 99 pacientes estudiadas un 96% resultaron positivas para HPV, se detectaron 19 genotipos de HPV diferentes. Un 38,85 % de las muestras resultaron genotipos de bajo riesgo, un 33,6% de alto riesgo y un 8,4% genotipos de probable alto riesgo. Correspondiendo la mayor frecuencia a HPV-6 (21,78%), seguido por HPV-11 (9,9%), HPV- 31,- 58 (11,88%), HPV- 56,- 83,-66 (8,91%), HPV -53,-62 de probable alto riesgo (7,92%), HPV-16, -18 (4,95%) y HPV 84, -61-81 (4,95%). Un 15,8% de las muestras fueron positivas no genotificables. Los genotipos más prevalentes resultaron los de bajo riesgo HPV-6 y -11. Los resultados demuestran que los genotipos de alto riesgo HPV-16 y -18, de mayor prevalencia a nivel mundial, no son los más prevalentes en la población de Mar del Plata. Adicionalmente, otros genotipos de alto riesgo como HPV-31 y -58, como algunos genotipos de probable alto riesgo (HPV 53,-62) también están presentes en nuestra población, lo que podría constituir un rasgo epidemiológico de importancia regional y ser de utilidad en el futuro en los programas de vacunación.

083. (312) LA EXPRESIÓN CONSERVADA EN MEMBRANA DE BETA CATENINA SE ASOCIA CON MENOR PROGRESIÓN EN TUMORES MAMARIOS DE RATAS HIPOTIROIDEAS

López Fontana C.¹; Santiano F.¹; Sasso C.¹; Estalles P.²; Cuello Carrin F.¹; Fanelli M.¹; Carn R.¹
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, CCT -Mendoza¹; Anatomía Patológica, Hospital Universitario, Universidad Nacional de Cuyo².

β -catenina juega un rol crítico en la adhesión celular limitando el movimiento celular y la proliferación. La expresión aberrante citoplasmática/nuclear de β -catenina ha sido correlacionada con peor pronóstico en cáncer de mama, mientras que su expresión normal en membrana con mayor sobrevida. Las conexiones mecánicas asociadas con la expresión de β -catenina en los estados tiroideos y el cáncer de mama no se conocen. Por ello, evaluamos la localización y expresión de β -catenina en tumores de mama inducidos por dimetilbenzantraceno (DMBA) en un modelo animal con diferentes estados tiroideos. Ratas hembras Sprague-Dawley fueron tratadas p.o. con una dosis de DMBA (15mg/rata) a los 55 días de edad y divididas en tres grupos: eutiroides (EUT, n=22), hipotiroideas (HIPO, 0.01% PTU en el agua de beber, n=26) e hipertiroideas (HIPER, por la inyección s.c de 0.25 mg/kg/día de T4, n=23). Se determinaron la latencia, la incidencia y la progresión tumoral. Se tomaron muestras de sangre troncal y una porción de glándula mamaria normal y de tumor para determinar las concentraciones plasmáticas de hormonas por RIA y para el análisis histopatológico e inmunohistoquímico. El análisis estadístico se realizó por ANOVA I, Bonferroni y Chi cuadrado. La latencia de aparición de tumores fue mayor (p<0.01) y la incidencia y velocidad de crecimiento tumoral fue menor (p<0.05) en las HIPO que en las EUT e HIPER. Los tumores fueron mayoritariamente de tipo ductal, con más componente infiltrante y menor respuesta inflamatoria local en las HIPO. La expresión de β -catenina fue menor en las HIPO que en las EUT e HIPER (p<0.05). β -catenina se expresó en membrana en las HIPO y en el núcleo en los otros dos grupos. En conclusión, la menor expresión de β -catenina y su localización normal en membrana se asocian a menor incidencia y velocidad de crecimiento tumoral en las ratas HIPO mientras que la traslocación nuclear observada en las EUT e HIPER se asocia a una mayor progresión tumoral.

084. (335) TERAPIA FOTODINAMICA: ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD DEL FOTOSENSIBILIZADOR TRIS 1,10-FENANTROLINA CROMO (III) EN LA LINEA CELULAR CHO-K1

García P.¹; Argüello G.¹; Virgolini M.³; Cabanillas A.²
Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba (INFIQC)-CONICET¹; Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET²; Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC)-CONICET³.

Los complejos fenantrolínicos de Cromo (III) se han estudiado como posibles fotosensibilizadores para terapia fotodinámica (PDT). Las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de estos complejos, además de su posible capacidad de ingresar al interior de la célula para realizar dicho efecto los hacen compuestos importantes a ser estudiados.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación, han demostrado la capacidad de los complejos de cromo (III) de unirse a ADN plasmídico y generar daños sólo en presencia de irradiación con luz visible (452nm). Por otro lado, los resultados preliminares han demostrado que el estado excitado del complejo Tris 1,10-fenantrolina cromo (III) ($\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$) genera una considerable disminución de la viabilidad celular de las células CHO-K1. Es además de suma importancia para la aplicación clínica de la PDT que el fotosensibilizador en su estado fundamental (no excitado) no induzca daño *per se* sobre las células. El objetivo del trabajo es estudiar la genotoxicidad del $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ en la línea celular epitelial normal CHO-K1. Para ello, optimizamos en el laboratorio el ensayo de Cometa en el cual es posible medir el porcentaje de ADN degradado luego de ser sometido a electroforesis en condiciones fuertemente alcalinas. En caso positivo se observa al microscopio de fluorescencia al ADN nuclear fragmentado con forma de cometa. Los controles positivos se realizaron utilizando H_2O_2 a una concentración de 200 μM , en tanto que las células sin tratamiento fueron los controles negativos. Los resultados muestran que a concentraciones inferiores a 50 μM de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$, las cuales normalmente indujeron foto daño a las células, el ADN nuclear se mantuvo intacto, lo que indica que este complejo de cromo podría no ser genotóxico en estas concentraciones destacando su utilidad para la PDT.

085. (375) LA MODULACIÓN DE FOXO3A POR INTERFERÓN- β (IFN) PROMUEVE LA APOPTOSIS EN UN MODELO DE DESARROLLO TEMPRANO DE CÁNCER HEPÁTICO

Parody J.; Ceballos M.; Quiroga A.; Francés D.; Carnovale C.; Alvarez M.; Carrillo M.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET.

FoxO3a, miembro de la familia de factores de transcripción FOXO, se expresa en hígados adultos y modula la expresión de genes involucrados en apoptosis. FoxO3a está regulado negativamente por PI3K/Akt y MAPK/Erk y positivamente por JNK. Previamente demostramos que el tratamiento de ratas con IFN induce apoptosis en focos de hepatocitos alterados mediante un mecanismo que involucra la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Aquí, evaluamos los eventos de señalización desencadenados por las ERO inducidas por IFN y su relación con la modulación de la actividad transcripcional de FoxO3a en hígados preneoplásicos de rata. Ratas Wistar macho adultas fueron sometidas a un modelo de hepatocarcinogénesis de iniciación-promoción (grupo IP). Por vía intraperitoneal, un segundo grupo recibió además IFN (grupo IP+IFN) y un tercer grupo recibió además IFN y ácido ascórbico (IP+IFN+ASC). Por inmunoblotting en homogenados hepáticos totales encontramos aumento de pJNK/JNK (+66%*) y disminución de pAkt/Akt (-89%*) y de pErk/Erk (-65%*) en IP+IFN respecto de IP. En IP+IFN, FoxO3a aumentó

en fracción nuclear (+54%*) y disminuyó en fracción citosólica (-71%*) respecto de IP. Observamos un aumento de la proteína pro-apoptótica Puma (+118%*) en IP+IFN con respecto a IP. Por otro lado, la relación Bax/Bcl-xL en fracción mitocondrial, la liberación de citocromo c en fracción citosólica y la actividad caspasa-3 aumentaron 361%*, 189%* y 142%* respectivamente en IP+IFN respecto de IP. El grupo IP+IFN+ASC presentó valores similares al grupo IP en todos los parámetros estudiados. * $p < 0,05$. Nuestros datos sugieren un mecanismo en el cual el tratamiento *in vivo* con IFN induce la translocación nuclear y activación transcripcional de FoxO3a mediada por activación de JNK e inhibición de Akt y Erk, gatillando la ruta apoptótica mitocondrial en los hígados preneoplásicos.

086. (396) EL ÁCIDO RETINOICO REDUCE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS DE CÁNCER DE MAMA: ROL DEL RECEPTOR DE ÁCIDO RETINOICO BETA EN LA PROGRESIÓN METÁSTASICA DEL CARCINOMA MAMARIO HUMANO

Flamini M.; Gauna G.; Sánchez N.; Vargas Roig L.

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CCT-CONICET, Mendoza.

Las metástasis producen el 98% de las muertes de las mujeres con cáncer de mama. La pérdida de la expresión del receptor de ácido retinoico β (RAR β) se ha asociado con metástasis en ganglios linfáticos. Nuestra hipótesis es que RAR β participa en la migración celular. **Objetivos:** 1) Verificar en células MCF7 (RAR β metilado y silenciado) si la re-expresión del gen, luego de un tratamiento con ácido retinoico (AR), produce inhibición de la migración celular. 2) Determinar si el silenciamiento de RAR β en células T47D aumenta la migración celular. 3) Identificar mecanismos moleculares por los cuales AR/RAR β ejercen su efecto. **Metodología:** Se realizaron ensayos de MTT y migración celular. Se estudió la expresión de RAR β , moesin, FAK, c-Src y actina por western blot e inmunofluorescencia. Se usaron antagonistas y agonistas selectivos para los subtipos de RAR y se silenció RAR β con siRNA específico. **Resultados:** El AR induce la expresión del gen RAR β en células MCF7 (máxima a las 72hs con 1 μM). La mayor expresión de RAR β produce un 60% de inhibición de la migración celular ($p < 0,05$). El AR disminuye la expresión de proteínas que estimulan la migración: FAK, c-Src y moesin. Cuando se silencia RAR β , el AR no logra inhibir la migración de manera significativa sugiriendo la participación de RAR β . El agonista selectivo para RAR β (BMS453), redujo significativamente la migración comparable con la inhibición ejercida por el AR, no siendo así con los agonistas de los otros RAR. El AR disminuye la expresión de moesin relocalizándola en el citoplasma e inhibiendo la formación de estructuras especializadas para la migración. El AR no logra inhibir o redistribuir dicha proteína cuando RAR β está silenciado. **Conclusión:** El AR por medio de RAR β inhibe la migración modulando la expresión-relocalización de proteínas involucradas en dicho proceso. Estos resultados evidencian el efecto antimetastásico del AR sugiriendo la importancia de idear nuevos esquemas terapéuticos que incluyan retinoides.

087. (410) TRIAZOLIL AMINOACIL (PEPTIDIL) PENICILINAS: NUEVOS AGENTES CON ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA

Blank V.¹; Bellizzi Y.¹; Cornier P.²; Mascali F.²; Delpiccolo C.²; Boggian D.²; Mata E.²; Roguin L.¹
Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Química Rosario, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario².

Puesto que existen evidencias de la acción apoptótica de ciertos derivados beta-lactámicos, decidimos emprender la búsqueda de nuevos agentes con potencial antitumoral constituidos por un derivado de penicilina unido a una porción peptídica a través de un grupo triazol (triazolil aminoacil (peptidil) penicilinas: TAP). El diseño de estos compuestos tiene en cuenta que la porción peptídica facilitaría el transporte a través de membranas, mientras

que el anillo beta lactámico contribuiría con el efecto antitumoral. Con el fin de evaluar la actividad antiproliferativa de una biblioteca de 23 TAP obtenidos por síntesis química, se emplearon dos líneas tumorales: HeLa (carcinoma de cuello de útero humano) y B16 (melanoma murino). La línea de células no neoplásicas NUMMG (epitelio mamario normal) se utilizó como control. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron a partir de curvas dosis-respuesta. Los compuestos más activos y selectivos fueron aquellos que contienen los dipéptidos Phe-Leu (TAP6), Trp-Leu (TAP18) y Phe-Met (TAP17), con IC₅₀ que oscilan entre 3-13 µM en las células tumorales, y 102-400 µM en las células no tumorales. Asimismo, comprobamos que en células HeLa el TAP6 indujo un arresto del ciclo celular en G1 luego de 24 hs (p<0.05) y un incremento en el porcentaje de células hipodiploides a mayores tiempos de incubación (38±7% vs 5±2% a las 48 h; 66±7% vs 4±1% a las 72 h). También se detectaron células apoptóticas por tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. En conclusión, hemos identificado derivados de penicilina con potente y selectiva actividad antitumoral *in vitro*. El análisis de la relación estructura-actividad indicó que tanto el núcleo penicilánico como la porción peptídica son importantes para que se manifieste el efecto biológico. Asimismo, el estudio inicial del mecanismo de acción de uno de los compuestos más activos sugirió que la acción antitumoral estaría mediada por el arresto del ciclo celular y la inducción de apoptosis.

088. (414) ESTUDIO DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Leonardi D.¹; Cotignola J.¹; Pecci A.²; Vázquez E.¹
 IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; IFIBYNE-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

El tratamiento con glucocorticoides (GC), del cáncer de próstata (CaP) refractario a hormonas (HRPC) produce beneficios, parcialmente debido a la inhibición de la síntesis de andrógenos por la glándula adrenal. Sin embargo, su mecanismo de acción no se conoce claramente. Por el contrario, algunos trabajos revelaron que los GC mantendrían la viabilidad de las células del HRPC, sugiriendo que contribuirían a la progresión de dependencia a independencia hormonal. Nuestro objetivo es estudiar la señalización del receptor de GC (GR) en líneas celulares de CaP. Se analizó el efecto de distintas concentraciones del GC sintético dexametasona (Dex) sobre la viabilidad de células PC3 y LNCaP, mediante el ensayo de MTS. Dex no modificó la viabilidad celular. Mediante RT-qPCR analizamos la expresión de GR y de IκB (blanco transcripcional directo). Dex no alteró el nivel de GR pero indujo la expresión de IκB en LNCaP, probablemente debido a la activación del receptor. En PC3, la máxima expresión de GR se detectó a las 6 h por RT-qPCR y por Western Blot. Las células PC3 se transfectaron con el plásmido de expresión pRSV-GR o su control pRSV-bgal. Con el objetivo de analizar la actividad transcripcional de GR se utilizó un ensayo de genes reporteros. Las células PC3 se transfectaron con el MMTV-luc que posee 3 sitios de unión para GR río arriba del gen de la luciferasa. Se analizó el efecto de la generación de un estado anti-inflamatorio por tratamiento con hemina. Se observó que Dex indujo la actividad de luciferasa en todas las condiciones experimentales ensayadas respecto a los controles. El tratamiento con hemina redujo significativamente tanto la actividad basal del GR como la inducida por Dex. En conclusión, comprobamos diferencias en la expresión y comportamiento del GR en células de CaP en respuesta a Dex.

089. (441) EFECTO ANTI-PROLIFERATIVO DE NUEVOS COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS DERIVADOS DE D-RIBOSA SOBRE LÍNEAS TUMORALES PROSTÁTICAS

Schuster F.¹; Avanzo R.²; Paez A.¹; Fascio M.²; D'Accorso N.²; Vázquez E.¹; Gueron G.¹
 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUI-

BICEN-CONICET¹; Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR)-CONICET².

El desarrollo de agentes anti-tumorales potentes y efectivos a devenido en uno de los temas más estudiados por la química moderna. En un trabajo previo se informó la síntesis y evaluación anti-proliferativa contra la línea celular del linfoma BW 5147 de una serie de derivados mono- y di-heterocíclicos de D-ribosa. Se encontró que el alil 2,3-O-ciclopentiliden-5-desoxi-5-S-(1,2,4-triazol-3-il)-b-D-ribofuranosido y su correspondiente derivado isoxazolínico pueden ser considerados como moléculas promisorias para el tratamiento del cáncer. Estos resultados condujeron a diseñar nuevos análogos con pequeñas modificaciones estructurales y evaluar su actividad contra la línea tumoral prostática PC3. El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres. En este trabajo informamos la síntesis de nuevos derivados de D-ribosa conteniendo heterociclos aromáticos de cinco miembros tales como triazoles o/y isoxazoles y su efecto anti-proliferativo sobre dicha línea tumoral. El tratamiento con cinco de estos compuestos inhibió significativamente (40-70%, p<0.05) la viabilidad celular. Dado que algunos derivados isoxazólicos de la curcumina han sido reportados como agentes antioxidantes, nuestro próximo paso fue evaluar la expresión de genes asociados a dicho proceso. Ensayos de Western blot, muestran una inducción significativa de la expresión de hemo-oxigenasa 1 (HO-1), la isoforma inducible de la enzima limitante en la degradación del hemo que actúa contrarrestando el estrés oxidativo. A partir de estos resultados se diseñarán las modificaciones químicas que permitan obtener nuevos y más potentes inhibidores para las líneas celulares de PCa.

090. (449) LA SILIBINA, UN POTENCIAL AGENTE RADIOSENSIBILIZANTE EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE VEJIGA INVASOR

Prack Mc Cormick B.; Belgorosky D.; Langle Y.; Eijan A.; Sandes E.

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

La radioterapia (RT) es clave en el tratamiento tumoral, y constituye junto a la quimioterapia la opción terapéutica conservadora en múltiples tumores entre ellos el cáncer de vejiga (CaV). La radioresistencia y el daño sobre el tejido sano, vuelven necesaria la búsqueda de adyuvantes que optimicen el efecto de la RT. Un posible blanco terapéutico es el factor de transcripción NF-κB que activa vías de sobrevida en respuesta a la RT. Los flavonoides pueden bloquear la actividad de NF-κB, por esto, analizamos la capacidad del flavonoide silibina (Sb) de mejorar el efecto antitumoral de la RT sobre un modelo de CaV murino invasor (MB49-I) y no invasor (MB49) del músculo vesical, evaluando: 1) viabilidad celular en función de las dosis de RT (0-2-4 y 8 Gy) y/o Sb (0-150 µM) por MTS, 2) radiosensibilización por ensayo clonogénico, 3) activación de NF-κB por western blot y ensayo de gen reportero, y 4) crecimiento tumoral en ratones C57BL/6J, tratados con Sb (400 mg/kg/día, VO, 5 d/sem) y/o RT (3 Gy/día, 2 v/sem, dosis total=18 Gy). *In vitro* la Sb mostró citotoxicidad dosis dependiente (DE50: MB49-I=104 µM, MB49=120 µM). A las 120 hs del tratamiento, MB49-I presentó mayor repuesta a la RT (4 y 6 Gy) al ser combinada con Sb 40 ó 60 µM (p≤0,001), el efecto fue menor en MB49. En los ensayos clonogénicos la Sb (60 µM) indujo mayor radiosensibilización en la línea MB49-I (2 Gy vs 2 Gy+Sb p=0,01) respecto de MB49. A nivel molecular, la activación del factor NF-κB fue gatillada por RT solo en MB49-I, efecto revertido por la Sb. *In vivo* el tratamiento combinado generó reducción tumoral (pendiente=-4,238) y aumento de la sobrevida en los ratones portadores de tumor MB49-I, y retardo del crecimiento en los tumores MB49 (RT vs SbRT p=0,01). Los resultados evidencian que la Sb presenta mayor actividad radiosensibilizante en la línea invasora, involucrando la vía del factor NF-κB. Esto ubica a la Sb como un potencial agente adyuvante en el tratamiento del CaV invasor.

091. (451) RSP03 ES EXPRESADO Y SECRETADO POR LA SUBPOBLACIÓN MIOEPITELIAL-BASAL EN LA GLÁNDULA MAMARIA

Tocci J.¹; Goddio M.¹; Buric D.²; Brisken C.²; Kordon E.¹
LEGMA, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; École Polytechnique Fédérale De Lausanne, Lausanne, Suiza².

Los genes R-spondins (RSPOs) codifican para una familia de cuatro proteínas de secreción que modulan las vías de señalización canónica y no canónica de WNT en diferentes tipos celulares. En los últimos años, han sido involucrados en procesos como el desarrollo embrionario, la diferenciación de tejidos y diversas patologías. Además, se los ha postulado como potentes factores de crecimiento de células madre. Se ha determinado que los RSPOs, particularmente Rspo3, aparecen frecuentemente mutados en tumores mamarios murinos inducidos por el virus MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*), y su sobre-expresión induce la transformación de las células mamarias. Asimismo, nosotros demostramos que Rspo3 puede expresarse en líneas celulares mamarias humanas y de ratón no infectadas por MMTV, particularmente en aquellas que expresan marcadores basales. El objetivo de este trabajo fue determinar si Rspo3 se expresa en células mamarias normales *in vivo* y si, tal como se observó en las líneas celulares, lo hace preferencialmente en la subpoblación basal. Para ello, se obtuvieron glándulas mamarias de hembras C57/Bl6 vírgenes y se separaron las diferentes poblaciones celulares mediante FACS, utilizando los marcadores CD24 y Lin. Al analizar la expresión de Rspo3 por RT-PCR cuantitativa, los resultados sugieren que este gen se expresa preferencialmente en la subpoblación mioepitelial-basal (Lin⁻/CD24^{low}). Además, encontramos que la actividad de Rspo3 también estaría asociada al fenotipo basal/mesenquimal, ya que el tratamiento en cultivo con la proteína Rspo3 genera características asociadas a la transición epitelio-mesenquimal en la línea celular mamaria no-tumoral NMuMG. En conjunto estos resultados sugieren que la expresión y actividad de Rspo3 estarían asociadas al mantenimiento de la población basal en la glándula mamaria normal, y esto explicaría por qué su sobre-expresión en células lumbales facilitaría el desarrollo tumoral.

092. (481) INFECCIÓN IN VITRO DE CÉLULAS DE DURAMADRE HUMANA POR EL VIRUS SV-40. IMPLICANCIA DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ANTÍGENOS VIRALES

Goldschmidt E.¹; Mattioni L.²; Sanjuan P.²; Argibay P.¹; Sanjuan N.²
Hospital Italiano de Buenos Aires¹; Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, UBA-CONICET².

El SV40 es un Poliomavirus del simio que puede transmitirse también al humano, y su papel en la oncogénesis es controvertido, especialmente en relación con los mesoteliomas pleurales y los meningiomas. Recientemente, pudimos (E.G. y P.A.) establecer una línea de fibroblastos de duramadre humana. El objetivo de este trabajo fue estudiar la permisividad de esas células al virus SV40. Los fibroblastos fueron cultivados sobre cubreobjetos de vidrio dentro de placas de Petri, con DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los cultivos celulares fueron infectados con la cepa prototipo de SV40, a una multiplicidad de infección de 1 ufp/célula. A las 48hs post-adsorción, sendos cubreobjetos fueron fijados con metanol, y la expresión de los antígenos virales tempranos y tardíos fue realizada por inmunofluorescencia indirecta, empleando los controles pertinentes. En paralelo se infectaron células Vero, que fueron procesadas de igual manera. Éstas expresaron los antígenos virales tempranos y también los estructurales (tardíos), indicando una infección lítica. En cambio, los fibroblastos de duramadre humana sólo expresaron los antígenos tempranos de SV40. Se concluye que estos fibroblastos permiten una infección semi-permisiva por el virus, expresando el oncogén viral pero no los antígenos estructurales. Este nuevo modelo experimental podrá ser útil para estudiar el papel de SV40 en los meningiomas humanos, así como los cambios metabólicos de células de la duramadre humana luego de una infección viral

093. (500) LA PROTEÍNA SPARC MODULA LA SENSIBILIDAD A GEMCITABINA EN LÍNEAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS.

Salvatierra E.^{1,2}; Rivas Baquero E.^{1,2}; Podhajcer O.^{1,2}
Fundación Instituto Leloir¹; Laboratorio de Terapia Molecular y Celular²

El cáncer pancreático es una enfermedad excepcionalmente letal con una tasa de mortalidad similar a su incidencia anual. La tasa de supervivencia mínima se debe a varios factores que incluyen el diagnóstico tardío, con tumores localmente avanzados, irresectables, metástasis y una rápida aparición de quimioresistencia. SPARC es un componente de la ECM cuya expresión se encuentra aumentada en cáncer de páncreas y está asociada con mal pronóstico. La expresión de SPARC en cáncer pancreático está relacionada con cambios en el fenotipo celular y modifica la resistencia a drogas quimioterapéuticas. Se generaron líneas derivadas de cáncer de páncreas, Miapaca2 y Panc1, con expresión de SPARC aumentado mediante infección con un lentivirus conteniendo la región codificante de SPARC. Se evaluó la expresión del transgén y seleccionaron dos clones. Se caracterizó el crecimiento en el tiempo y el tamaño celular de las líneas generadas y se compararon con los controles. Para evaluar el efecto sobre la resistencia a gemcitabina se analizó el crecimiento de las distintas líneas a las 72hs bajo distintas concentraciones de la droga en cultivos en monocapa y esferoides mediante MTS. El aumento de la expresión de SPARC no produce cambios en el crecimiento de las líneas de cáncer de páncreas Miapaca2 y Panc1. Se observó una reducción de entre 50 y 65% del tamaño celular en los clones con alta expresión de SPARC. En monocapa, Miapaca2 y Panc1 poseen una EC50 a gemcitabina de 2,5nM y 39nM respectivamente. La EC50 de los clones que expresan SPARC no difiere significativamente de los controles. En cultivos en 3D, Panc1 posee un EC50 de 151nM, Los clones Panc1-SP1 y Panc1-SP8 mostraron una EC50 de 420nM y 395nM. La expresión de SPARC modifica el fenotipo celular, disminuyendo el tamaño sin afectar el crecimiento ni la sensibilidad a gemcitabina en ambas líneas celulares en cultivos 2D. Sin embargo, aumenta por un factor de 9,9 veces la resistencia a gemcitabina en cultivos 3D.

094. (516) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ANHIDRASA CARBÓNICA IX (CAIX) EN TEJIDO TUMORAL DE PACIENTES CON CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES DE CÉLULAS CLARAS (CCRCC)

Knott M.¹; Gandur Quiroga M.¹; Nuñez M.²; Pulero C.¹; Boggio G.²; Grasselli J.²; Gueglio G.²; Rondot Rado P.¹; Brzezinski M.¹; Pasik L.¹; Álvarez A.¹; Malagrino H.¹; Isola M.²; García Marchena P.²; Uria Soruco L.²; Jurado J.²; Bal De Kier Joffe E.¹; Pallotta M.²; Puricelli L.¹
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"¹; 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. A nivel molecular, se demostró inactivación del gen supresor VHL, involucrado en la expresión de la proteína transmembrana CAIX, cuya función es mantener el pH intra y extracelular. Se analizó, en el tejido tumoral de 44 pacientes vírgenes de tratamiento, la expresión de CAIX, mediante inmunohistoquímica y su asociación con los parámetros clínico patológicos. Se incluyeron 22 hombres [Edad; Md (rango): 56 (46-72)] y 22 mujeres [63 (44-82)]. También se analizó la supervivencia global (SVG) por el método de Kaplan-Meier y el Log-Rank test. Se compararon los resultados con los obtenidos en un análisis de expresión de CAIX soluble (CAIXs) mediante test de ELISA en suero de pacientes cCRCC y controles sanos. Se determinó un valor de corte del 50% para definir una elevada o baja expresión de CAIX tanto en membrana como en citoplasma. Se encontró una asociación significativa entre la baja expresión en membrana de CAIX tanto con la presencia de metástasis al diagnóstico como con el estatus de supervivencia del paciente. El análisis de la SVG reveló que una baja expresión de CAIX en membrana se asoció con un peor pronóstico. Sin embargo la significancia se perdió en el

estudio multivariado de Cox, por lo que no se puede considerar a CAIX como un marcador independiente de SVG en la población en estudio. El suero de pacientes ccRCC con estadios más bajos presentó valores de CAIXs menores respecto de aquellos con estadios más avanzados [Estadio I=45,25 pg/ml vs Estadio IV=102,93; MW $p < 0,001$]. Se observó una correlación significativa entre el tamaño tumoral y la concentración de CAIXs, a mayor tamaño tumoral, mayor concentración de CAIXs. Postulamos que a medida que los tumores CCRcc crecen, aumenta la presencia de enzimas proteolíticas en el microambiente tumoral capaces de clivar la porción extracelular de la proteína transmembrana CAIX, aumentando su presencia en suero y disminuyéndola en el tejido tumoral.

095. (552) ESTUDIOS PRECLÍNICOS DEL NUEVO ANÁLOGO DE CALCITRIOL C10

Salomón D.¹; Ferronato M.¹; Fermento M.¹; Alonso E.¹; Obiol D.¹; Mascaró E.²; Vitale C.²; Fall Y.³; Curino A.¹; Facchinetti M.¹

Laboratorio de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET¹; Instituto de Química del Sur (INQUISUR)-CONICET, Universidad Nacional del Sur²; Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Vigo, España³.

El calcitriol tiene efectos antineoplásicos pero su actividad hipercalcemianta disminuye su potencial utilización terapéutica. El análogo C10, que hemos sintetizado en colaboración con dos laboratorios de química orgánica, ha demostrado no poseer actividad calcemianta, ejercer efectos antiproliferativos e inhibitorios de la migración sobre varias líneas celulares de cáncer y reducir marcadamente las metástasis pulmonares en un modelo murino de cáncer mamario. Además, ha mostrado regular el ciclo celular principalmente aumentando los niveles de p27 en las líneas de cáncer estudiadas. A partir de estos resultados, el objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad, en especial el efecto calcemianta del C10 en una dosis mayor y más prolongada, y evaluar su efecto antitumoral en nuevos modelos animales de cáncer. Se utilizaron dos modelos de xenotransplante, uno de glioma (U251) y otro de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello (CCECC) (HN12) así como también el modelo singeneico de carcinoma mamario (LM3) previamente utilizado. Los animales tratados con la nueva dosis de 50ug/Kg durante 3 semanas no presentaron modificaciones de calcemia, hematocrito ni peso corporal a lo largo del tratamiento. Tampoco se evidenciaron signos histopatológicos en riñón e hígado. En el modelo de glioma la carga tumoral no se redujo con la dosis de 20ug/Kg, pero sí cuando se la aumentó a 50ug/kg ($p=0,0317$). El análogo no tuvo efectos sobre la carga tumoral en el modelo de CCECC ni en el modelo de carcinoma mamario en la dosis de 50ug/Kg. Sin embargo, mantuvo su efecto inhibitorio sobre la metástasis pulmonar en este último ($p=0,0069$). Los resultados obtenidos destacan la importancia de testear los nuevos compuestos tanto *in vitro* como *in vivo* y demuestran que el análogo C10 podría ser, solo o en combinación con otros tratamientos, un agente terapéutico efectivo en el tratamiento de gliomas y carcinomas mamaros.

096. (592) POTENCIAL TERAPÉUTICO DE AGONISTAS DEL RECEPTOR A HISTAMINA H4 EN CÁNCER DE MAMA

Martinel Lamas D.¹; Cortina J.¹; Ciruolo P.¹; Carabajal E.¹; Ventura C.¹; Rivera E.¹; Medina V.^{1,2}

Laboratorio De Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)².

Se demostró que la histamina (HA) y ligandos del receptor H4 (RH₄) inhiben la proliferación de las células tumorales mamaras humanas MDA-MB-231 (MDA, RE α -) y MCF-7 (RE α +), a través de la inducción de apoptosis y senescencia celular. El tratamiento *in vivo* con HA (5 mg/Kg, *sc*) de tumores xenotransplantados de la línea MDA en ratones *nude* disminuye el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia. El objetivo de este trabajo fue

profundizar en el estudio del efecto de los ligandos del RH₄ en cáncer de mama en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados *in vitro* demuestran que el tratamiento con agonistas RH₄ [Clozapina (CLZ), JNJ28610244 (J28)] reduce la proliferación de las células MDA en forma dosis dependiente, con CI₅₀: 11.5 μ M (CLZ) y 13.4 μ M (J28). Este efecto se revierte con el tratamiento combinado con un antagonista (JNJ7777120) y cuando la expresión del RH₄ está reducida mediante siRNA. El efecto antiproliferativo también se demostró en células MCF-7. Además, el tratamiento con HA sinergiza el efecto antiproliferativo del quimioterápico doxorrubicina (DOX, 10 nM) tanto en células MDA [% de incorporación de BrdU: 50.7 \pm 4.2 (control), 40.8 \pm 1.3 (DOX), 36.6 \pm 1.8 (HA 10 μ M) vs. 30.9 \pm 2.7 (DOX+HA), $P < 0.01$] como en las MCF-7 [41.3 \pm 1.1 (control), 30.3 \pm 2.2 (DOX), 28.8 \pm 1.8 (HA 10 μ M) vs. 17.2 \pm 1.0 (DOX+HA), $P < 0.01$]. Este efecto, que se ve simulado por agonistas RH₄, está asociado con un aumento de las especies reactivas del oxígeno (2-veces, $P < 0.001$) y del marcador de daño al ADN, γ H2AX. A su vez, el tratamiento *in vivo* de tumores MDA con J28 (10 mg/kg, *sc*) y CLZ (1 mg/kg, *sc*) reduce el crecimiento tumoral, aumentando el tiempo de duplicación del tumor [10.8 \pm 0.7 (J28), 15.1 \pm 1.1 (CLZ) vs. 7.4 \pm 0.6 días, $P < 0.01$]. El tratamiento con el antagonista RH₄ JNJ10191584 (10 mg/kg, *sc*) disminuye la supervivencia de animales con tumor. Podemos concluir que los agonistas del RH₄ podrían ofrecer un novedoso potencial terapéutico como adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

097. (595) DL-BUTIONINA-S,R-SULFOXIMINA Y CALCITRIOL INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS CACO-2 MEDIANTE INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ARRESTO DEL CICLO CELULAR

Liaudat A.; Bohl L.; Tolosa De Talamoni N.; Picotto G.

Catedra de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba.

La incidencia y el pronóstico del cáncer de colon están en estrecha relación con los niveles plasmáticos de calcitriol (D). Por otro lado, la inclusión de drogas que deplecionan glutatión (GSH), tal como D,L-butionina-S,R-sulfoximina (BSO), aumentan la sensibilidad celular a los tratamientos. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del calcitriol y BSO sobre la proliferación de las células de cáncer de colon Caco-2 y evaluar los posibles mecanismos involucrados. Las células se trataron con D 200 nM, BSO 100 μ M, con BSO+D o vehículo a diferentes tiempos. La proliferación celular se determinó por la técnica de violeta de cristal. Los niveles de GSH y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y fosfatasa alcalina (FAL) se midieron por espectrofotometría. El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) y el ciclo celular se evaluaron por citometría de flujo. La morfología nuclear se observó a través de la tinción con DAPI, la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL y la expresión génica de Bcl-2 por qPCR. El análisis estadístico se realizó por ANOVA y Bonferroni como post-hoc. Los resultados muestran que D y BSO inhibieron la proliferación de las células Caco-2. El GSH disminuyó a las 6 y 48 h con BSO y BSO+D. A las 96 h CAT aumentó sólo con el tratamiento combinado, el $\Delta\Psi$ m disminuyó con D y BSO+D y SOD no se modificó. El tratamiento combinado indujo arresto del ciclo celular en fase S+G₂/M y disminución de las células en mitosis. La fragmentación del ADN aumentó con BSO, D y BSO+D. Los niveles de ARNm de Bcl-2 disminuyeron con BSO y con el tratamiento combinado. FAL incrementó en las células tratadas con D y con ambas drogas durante 96 hs. En conclusión, BSO incrementa el efecto antiproliferativo de calcitriol sobre las células Caco-2 mediante aumento del estrés oxidativo, arresto del ciclo celular y fragmentación del ADN. El incremento de FAL sugiere una inducción de la diferenciación celular.

098. (602) ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO IN VIVO DE LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA TIPO T UTILIZANDO LA LÍNEA CELULAR HUMANA CUTLL1 QUE REMEDA LOS DEFECTOS CLÍNICOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH PARA DESARROLLO Y TESTEO DE DROGAS QUIMIOTERAPÉUTICAS

Amoros M.¹; Caryol F.²; Diaz Flaque M.²; Cerchiotti L.³; Sganga L.¹; Podhajcer O.¹; Cremaschi G.²; Bolontrade M.¹ *Fundación Instituto Leloir¹; Laboratorio de Neuroinmunomodulación, Instituto de Investigaciones Biomédicas (Biomed)-UCA-CONICET²; Weill Cornell Medical College of Cornell University, New York, USA³.*

La leucemia linfoblástica de células T (T-ALL) es un desorden hematológico agresivo que involucra a progenitores hematopoyéticos de linaje T. Su etiología no está definida aunque evidencias sugieren que su origen estaría ligado a defectos en la vía de señalización de NOTCH. CUTLL1 (Columbia University T-cell Lymphoblastic Lymphoma 1) es una línea de T-ALL que muestra respuestas biológicas a la inhibición de NOTCH remediando la etiología de la enfermedad. La ausencia de líneas T-ALL humanas con defectos en la vía de señalización de NOTCH verificables biológicamente a nivel celular hace que el establecimiento de un modelo *in vivo* adquiera valor biológico como prerrequisito para desarrollo y ensayo de drogas quimioterapéuticas. Hemos establecido un modelo tumoral *in vivo* de T-ALL con la línea CUTLL1 en ratones inmunosuprimidos (SCID). Los tumores se desarrollaron a partir de la segunda semana post-inoculación subcutánea de un número mínimo de 2×10^7 células CUTLL1 en el flanco derecho de ratones SCID. Los tumores fueron visibles luego de 15-30 días post-inoculación (Vol tumoral: 895.1 ± 84.91 mmE3). La administración de un número mayor de células, 4×10^7 CUTLL1, originaron tumores visibles entre 15-20 días post-inoculación, pero de mayor tamaño (Vol: 4830 ± 1982 mmE3, $p < 0.05$). Los tumores desarrollados en los ratones SCID fueron caracterizados histológicamente y a su vez se utilizaron para aislar células CUTLL-1, que se establecieron en cultivo a fin de seleccionar una línea celular derivada de la parental con mayor capacidad tumorigénica. Las dificultades para establecer este tipo de enfermedades hematológicas en xenomodelos que reflejen los aspectos clínicos de la enfermedad, hacen que el establecimiento y caracterización de este modelo *in vivo* posea valor relevante preclínico. Este es el primer reporte de un xenomodelo de T-ALL utilizando la línea celular humana CUTLL-1, útil como modelo de enfermedad remediando defectos en la vía de señalización de Notch

099. (610) EFECTO DE PLX4032 EN LA LINEA CELULAR MEL-XY3 HETEROCIGOTA PARA LA MUTACIÓN BRAF V600E

Madorsky Rowdo F.¹; Barón² A.; Mordoh J.^{1,2} *Fundación Instituto Leloir¹; Centro de Investigaciones Oncológicas, Fundación Cáncer².*

Aproximadamente 50% de los melanomas cutáneos (MC) presentan mutaciones activadoras en la quinasa BRAF. Se han desarrollado inhibidores específicos de BRAF que en la clínica han demostrado importantes respuestas, pero al cabo de pocos meses la mayoría de los pacientes recaen. Se estudió el efecto del inhibidor de BRAF PLX4032 en la línea celular de MC humano MEL-XY3. Esta línea es heterocigota para la mutación BRAF V600E y sensible a PLX4032, presentando un $IC_{50} < 0,25$ mM. Se determinó que cuando las células MEL-XY3 en fase de crecimiento exponencial son incubadas en presencia de 10 mM de PLX4032, la síntesis de DNA se interrumpe rápidamente (≤ 24 hs). De forma similar a lo que sucede post-radioterapia (Pizzurro *et al. Cancer Immunol Immunother. 2013;62(1):3-15*), MEL-XY3 post-tratamiento con PLX4032 mantuvo la síntesis de lípidos, presentando un aumento en vesículas lipídicas. Se observó que al suspender el tratamiento luego de incubar a las células durante 96hs con PLX4032, las mismas recuperaron rápidamente la síntesis de ADN, aunque con capacidad disminuida de generar colonias en medio semisólido (500 vs 100 colonias; $p < 0,05$). Se estudió también si la inhibición de BRAF por el tratamiento con PLX4032 lleva a cambios en la expresión de antígenos (Ags) de diferenciación melanocítica. Se analizaron por RT-qPCR los niveles de ARNm de gp100, MART-1, Tyr y Trp-2 a diferentes tiempos de exposición a 10 mM de PLX4032. Se observó un aumento importante para los cuatro Ags después del tratamiento con el inhibidor de BRAF. Observamos, sin embargo, que cuando las células en fase estacionaria son tratadas con PLX4032, no se observan cambios

importantes en la viabilidad celular. Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición inmediata de la vía de las MAPK y síntesis de DNA son responsables de la ulterior diferenciación y muerte celular, y que las células en reposo son menos sensibles a la acción de PLX4032, constituyendo un posible mecanismo de resistencia celular.

100. 636) ACCIÓN ANTITUMORAL DE ANÁLOGOS PEPTÍDICOS DE VASOPRESINA (AVP) SOBRE UNA LÍNEA DE CÁNCER PULMONAR HUMANO CON CARACTERÍSTICAS NEUROENDÓCRINAS

Pifano M.¹; Garona J.¹; Pastrian B.²; Ianucci N.^{2,3}; Gomez D.¹; Alonso D.¹; Ripoll G.¹.

Laboratorio Oncología Molecular Universidad Nacional de Quilmes¹; Facultad de y Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Laboratorio de Investigación Desarrollo de Péptidos Terapéuticos, Chemo-Romikín. Buenos Aires³.

En los tumores neuroendócrinos ocurren fenómenos de señalización autócrina y paracrina capaces de modular el crecimiento tumoral. En cáncer de pulmón existen evidencias de la participación de distintos neuropéptidos específicos y sus receptores, incluyendo los receptores AVP que estimulan la proliferación, como V1a y V1b, o que la inhiben, como el receptor V2 (V2r). La desmopresina (dDAVP) es un compuesto sintético que actúa como agonista selectivo de V2r, con propiedades citostáticas y antimitóticas reportadas en cáncer mamario y colorrectal. A partir de un panel de péptidos derivatizados, nuestro grupo desarrolló un nuevo análogo designado [V4Q5]dDAVP con acción citostática mejorada respecto de dDAVP. En este trabajo se evaluó la acción antitumoral de estos compuestos sobre la línea celular humana H82 de cáncer pulmonar de células pequeñas, con características neuroendócrinas (NE). Se confirmó la presencia de V2r en células H82 mediante RT-PCR e inmunofluorescencia. La incubación de células H82 en presencia de los compuestos (100 nM a 1,5 μ M) resultó en una inhibición de la proliferación ($p < 0,05$), valorada en fase de crecimiento exponencial con el ensayo de MTS. El análogo [V4Q5]dDAVP mostró un mayor efecto citostático respecto de dDAVP, a bajas (100 nM) como a altas (1 μ M) concentraciones. Se estudió también la línea H125 de carcinoma escamoso de pulmón, en la cual no se observó expresión de V2r ni efectos sobre la proliferación. El tratamiento *in vitro* a una concentración de 1 μ M inhibió un 60-75% la migración de células H82 en Transwells. Se evaluó de manera preliminar el efecto antitumoral *in vivo*, utilizando un modelo de colonización pulmonar de células H82 por xenotransplante en ratones nu/nu. La administración endovenosa de [V4Q5]dDAVP (0,3 μ g/kg) redujo en un 65% la formación de nódulos pulmonares. Estos resultados muestran por primera vez las propiedades antitumorales de análogos de AVP agonistas de V2r en una línea celular con características NE.

101. (640) LA FRACCIÓN D DE MAITAKE EMPLEADA COMO ANTINEOPLÁSICO EN RATONES CON TUMOR MAMARIO MEJORA LA SOBREVIVENCIA TOTAL EN COMPARACIÓN CON EL TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO CONVENCIONAL.

Roldán Deamicis A; Moverer L.; Balogh G. *Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-CONICET y Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina, Buenos Aires.*

Grifola fondosa (Maitake) es un hongo comestible y medicinal que posee propiedades inmunomoduladoras y antitumorales. En este trabajo comparamos los efectos de la Fracción D del Maitake, rica en β -glucanos, con los de quimioterapia (Doxorrubicina+Ciclofosfamida) en el tratamiento de ratones BALB/c con cáncer de mama y determinamos si existe un efecto co-adyuvante entre Maitake y quimioterapia. Empleamos 15 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad divididos en 3 grupos de 5 animales cada uno: Grupo Quimioterapia solo, Grupo Quimioterapia y Maitake Pro 4X (extracto purificado de Fracción D de Maitake) y Grupo Maitake Pro 4X solo. Luego de

3 semanas de inducido el tumor mamario por inyección IP de células tumorales murinas LM3 y cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 10mm, comenzamos los tratamientos. El tratamiento con quimioterapia consistió en la administración oral semanal de 4mg/kg Doxorubicina + 80mg/kg Ciclofosfamida y el tratamiento con Maitake en la administración oral diaria de 5mg/kg Maitake Pro4X. Los tratamientos tuvieron una duración de 5 semanas. Observamos que ninguno de los tratamientos fue efectivo en detener el crecimiento tumoral. Sin embargo, al observar el aspecto macroscópico de los tumores durante los tratamientos, hallamos que los tumores de los ratones tratados sólo con Maitake fueron menos agresivos y ulcerantes que aquellos que recibieron quimioterapia. Además, la mortalidad total fue mayor en los grupos tratados con quimioterapia sola (100%) o combinado con Maitake, que en el grupo tratado sólo con Maitake Pro 4X (60%). Asimismo, la mayor sobrevida total (40%) se registró en el grupo que recibió Maitake solo. Los resultados sugieren que la Fracción D Pro 4X de Maitake, administrada a ratones con tumores de mama, aumenta la sobrevida total de los animales y disminuye la malignidad de los tumores. Por otro lado, es interesante destacar que Maitake no actúa como co-adyuvante de la quimioterapia.

102. (645) EL CELECOXIB INCREMENTA LOS EFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN HUMANO

Blanco H.¹; Paz C.²; Mendez C.^{2,3}

Departamento de Radiaciones, Hospital Municipal de Oncología María Curie¹; Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET-UBA²; Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires³.

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una enzima inducible que cataliza la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos. Su expresión ha sido registrada en diversos tumores y trabajos recientes asocian la expresión de COX-2 con la resistencia a la radiación ionizante (RI). El objetivo de este trabajo fue determinar si la actividad de COX-2 modifica la sensibilidad de las células tumorales a los efectos de la RI. Se emplearon células de la línea A549 derivada de adenocarcinoma de pulmón humano que sobreexpresan COX-2 y se expusieron a ⁶⁰Co como fuente de RI, en presencia o ausencia de celecoxib (CXB), inhibidor de COX-2. Se determinó la proliferación, viabilidad celular, índice apoptótico y fosforilación de ERK1/2, mediante tinción con cristal violeta, ensayo de MTT, RT-PCR semi cuantitativa de los transcritos de Bax y Bcl2 y western blot (con anticuerpos contra P-ERK y ERK total), respectivamente. Tanto la RI como el CXB redujeron significativamente la proliferación y viabilidad celular en forma dependiente de la dosis (0-10 Gy) y de la concentración (0-50 µM), respectivamente (p<0,05), aunque CXB sólo resultó significativo en una concentración de 50 µM. La presencia de CXB 50 µM en el medio de cultivo redujo significativamente la proliferación (0,16 ± 0,04 vs 0,28 ± 0,01, p<0,05) e incrementó el índice apoptótico (1,19 ± 0,12 vs 0,55 ± 0,04 UA, p<0,05) producido por la exposición a 2,5 Gy de RI. La RI promovió la activación de ERK en forma dependiente de la dosis y del tiempo (entre 5 y 60 min) con un máximo a los 10 min y la preincubación de las células con CXB 50 µM impidió ese efecto. Se concluye que en células A549 el CXB potencia el efecto de la RI, aunque en concentraciones superiores a las alcanzadas en el plasma de pacientes tratados con esa droga. Además, los efectos de CXB sobre la activación de ERK producida por la RI sugieren que la radiosensibilidad inducida por CXB puede ser independiente de su acción sobre la actividad de COX-2.

103. (663) EFECTO DE LA TEMOZOLOMIDA (TMZ) SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REPARACIÓN DEL ADN EN LÍNEAS CELULARES DE GLIOMAS HUMANOS

Cayado N.; Castro G.; Nadin S.; Zoppino M.; Fanelli M.; Cuello Carrion D.; Ciocca D.
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, CCT Mendoza.

Estudios previos de nuestro grupo en gliomas humanos demostraron que HSP27 (HSP=Heat Shock Protein = proteína de golpe de calor) y HSP70 junto con β-catenina, p53, y O(6)-metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT) se asocian con astrocitomas de alto grado. Además, en tumores oligodendrogiales HSP27 surgió como un marcador molecular sustituto de la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 1p. TMZ es la principal droga administrada a pacientes que sufren de gliomas de alto grado, el estado de metilación del promotor de MGMT se utiliza para guiar este tratamiento. Con el objetivo de identificar dianas moleculares relacionadas con procesos de resistencia a la droga, analizamos los efectos de TMZ sobre la sobrevida de las células y los niveles de expresión de proteínas implicadas en la reparación del ADN en tres líneas celulares de glioma humano. Las tres líneas celulares exhibieron diferentes niveles de sobrevida celular, apoptosis, senescencia y capacidad para formar colonias. En las células Gli36, la TMZ no indujo senescencia. Se observó, en cambio, elevado daño al ADN (ensayo cometa) que se correlacionó con una reducida sobrevida a largo plazo. A pesar de esto, la línea celular mantuvo su viabilidad a concentraciones terapéuticas de la droga (ensayo MTT). En estas células la TMZ aumentó los niveles de expresión de MGMT, HSP27 y MLH1. Por otro lado, HSP27 y MSH2 se observaron en los núcleos de las células Gli36. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación e inmunofluorescencia se demostró una interacción entre MSH2 y HSP27 en las células tratadas con la droga. Estas proteínas podrían estar implicadas en mecanismos moleculares de resistencia al tratamiento con TMZ en gliomas.

104. (678) RELEVANCIA DE LA REGIÓN MHD DE LAS PROTEÍNAS MAGE EN LA ACTIVACIÓN DE AR

Laiseca J.; Bret C.; Toledo M.; Ladelfa M.; Monte M.
Laboratorio De Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET.

La proteína MageA11 fue descrita como un coactivador del receptor de andrógenos (AR). Pertenece al grupo Mage-A (Melanoma Antigen Genes) y forma parte de una subfamilia de proteínas cuya expresión ha sido detectada en un gran número de tumores. Las proteínas MAGE poseen una región de alta homología de aproximadamente 200 aminoácidos cercana al C-terminal, el Mage Homology Domain (MHD). Nosotros hemos reportado que MageA6 es capaz de colaborar con MageA11, en el aumento de la actividad transcripcional de AR y que esto viene dado, al menos en parte, por la estabilización que genera la unión de MageA6 con MageA11 como consecuencia de la disminución de la poliubiquitinación. Recientemente ha sido reportada la importancia de la formación de dímeros de MageA11 para la eficiente activación de AR. Para comprender este mecanismo, en este trabajo clonamos el MHD de MageA6 y de MageA11 (MHD-A6 y MHD-A11). Vimos que la interacción entre MageA11 y MageA6 se da a través de esta región y que esta es suficiente para ejercer la estabilización de MageA11. Además, el MHD-A11 es capaz de estabilizar y colaborar con MageA11 en el aumento de la actividad transcripcional de AR, sugiriendo la importancia de la región MHD-A11 en la estabilización y eficiente activación de AR por MageA11. Por el contrario, si bien MageA2 que posee un 83% de homología de secuencia con MageA6 en su MHD, es capaz de estabilizar y coimmunoprecipitar a MageA11, no ejerce el efecto colaborador en el sistema AR/MageA11. Concluimos que, si bien los MAGEs aquí estudiados son capaces, de estabilizarse y de coimmunoprecipitar en sobreexpresión y que sus regiones MHD poseen más del 80% de identidad, no todos ejercen la misma función. Creemos que existen secuencias características, propias de cada MAGE que otorgan especificidad a estas proteínas, confiriéndoles la capacidad de colaborar en procesos asociados al desarrollo tumoral.

105. (680) LOS ELEMENTOS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL DIFERENCIAN CÉLULAS CON PROPIEDADES "STEM" MEDIANTE LA VÍA DE MAPK/ERK EN MODELOS DE CÁNCER DE MAMA MURINO Y HUMANO

Raffo D.; Berardi D.; Todaro L.; Bal De Kier Joffe E.; Simian M.

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

El 75% de los tumores de mama son positivos para receptores de estrógeno y el tamoxifeno es la terapia más utilizada. Se propone que las células stem podrían ser iniciadoras de tumores y que tendrían una menor susceptibilidad a la quimio y radioterapia. El objetivo fue estudiar el efecto del microambiente tumoral sobre las poblaciones con propiedades stem y los mecanismos involucrados utilizando las líneas LMO5-E murina y la MCF-7 humana. Mediante ensayos de mamoesferas (ME) estudiamos la capacidad de autorrenovación de las células con propiedades stem y además medimos la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH). Las células fueron pretratadas durante 2 días en medio con 1% SFB charcoalizado, estradiol 10^{-8} M más el agregado o no de fibronectina (FN) (10 μ g/ μ l), laminina (LN) (2 μ g/ml) o medio condicionado (MC) de fibroblastos de la línea celular LM05-F y luego se sembraron 10.000 por well en placas de 6 en 2 ml de medio para ME (DMEM/F12 suplementado con B27 y EGF 20ng/ml) y se contó el número de colonias en suspensión a los 7 días o se utilizó el kit ALDEFLUOR® para estudiar la actividad de ALDH1. Se observó que tanto la FN, la LN como el MC disminuyeron la capacidad de formar ME en ambas líneas celulares así como también llevaron a una reducción del porcentaje de células ALDH+ en la línea LM05-E ($P < 0,05$). Los cambios en la capacidad de autorrenovación perduraron en el tiempo dado que aún un mes después de interrumpido el tratamiento los resultados fueron los mismos y estos fueron mediados por la vía de MAPK en ambos modelos ($P < 0,05$). Por último, ME tratadas con FN o LN dieron lugar a un menor número de ME secundarias ($P < 0,05$). Estos resultados indicarían que existe una regulación por parte del microambiente tumoral sobre la población con características stem en las líneas celulares estudiadas. En particular observamos que este efecto está mediado por la vía de las MAPK y que el mismo probablemente sea una diferenciación de las células con propiedades stem

106. (699) LA EXPRESIÓN DE SLPI (SECRETORY LEUKOCYTE PROTEASE INHIBITOR) DESESTABILIZA EL COMPLEJO ADHERENTE, INDUCE LA RE-LOCALIZACIÓN DE β -CATENINA Y DESENCADENA LA APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA

Rosso M.¹; Lapyckyj L.¹; Amiano N.²; Besso M.¹; Sánchez M.²; Chuluyan E.²; Vázquez Levin M.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; 3ª Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

Cadherina Epitelial (CadE) es una glicoproteína transmembrana que media la adhesión celular a través de su dominio extracelular, mientras que su dominio intracelular refuerza las uniones celulares por interacción con cateninas (ej. β -catenina) y con el citoesqueleto de actina. CadE protege a las células epiteliales de mama de la apoptosis y su pérdida ha sido reportada en la progresión del cáncer de mama. Por otro lado, se ha descrito que inhibidores secretorios de serin-proteasas, como SLPI, tienen actividades anti- y pro-apoptóticas. Particularmente en cáncer de mama se han detectado niveles bajos/elevados de SLPI, los que se han relacionado con regresión/progresión tumoral. Usando un modelo *in vivo*, la expresión de SLPI disminuyó el crecimiento tumoral mamario e indujo cambios relacionados con la apoptosis. A pesar de su relevancia, hasta el momento no hay reportes de cómo cambios en la expresión de SLPI en células tumorales afectan a CadE y a otros miembros del complejo adherente. **Objetivo:** Evaluar el efecto de SLPI sobre la expresión de CadE y proteínas relacionadas en modelos *in vitro* de cáncer de mama murino (F3II) y humano (MCF-7). **Metodologías:** mRNA: PCR en tiempo real, proteína: WB/inmunocitoquímica. **Resultados:** La expresión de SLPI redujo los niveles de mRNA/proteína de CadE y causó desarticulación del complejo CadE- β -catenina. Además condujo a una alteración del balance de proteínas pro- y anti-apoptóticas (Bax/Bcl2, c-Myc, Ciclina D1, p21, Claudina-1), conduciendo de esta manera a la apoptosis. Este proceso fue, al

menos en parte, mediado por β -catenina nuclear y cambios en su expresión proteica asociados con su re-localización. **Conclusión:** Teniendo en cuenta la relevancia de las alteraciones de CadE en la progresión tumoral del cáncer de mama, el efecto pro-apoptótico de β -catenina nuclear inducido por la expresión de SLPI permitiría especular sobre el potencial uso terapéutico del inhibidor de proteasas en esta enfermedad.

107. (723) LA SOBREEXPRESIÓN DE NGCGM3 MODIFICA LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y ESTIMULA EL PERFIL PROLIFERATIVO AÚN CUANDO INHIBE LA SEÑALIZACIÓN VÍA C-SRC/RAC1 EN CÉLULAS B16

Segatori V.; Alberto M.; Cuello H.; Gomez D.; Alonso D.; Gabri M.

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes.

Por su participación en *rafts* de membrana, los gangliósidos (GLS) son actores importantes en la modulación de diversas vías de señalización. Se caracterizan por tener al menos un residuo de ácido siálico siendo los más relevantes el N-acetilneuramínico (NAc) y el N-glicolilneuramínico (NGc). Parte de estos ocupan posiciones terminales en GLS como el GM3 (NAcGM3 o NGcGM3). La línea celular B16 muestra altos niveles de NAcGM3 el cual participa activamente en la modulación de diversas vías de señalización como la vía c-Src/Rac1 asociada a la proliferación dependiente de anclaje. Por su parte, la expresión NGcGM3 está asociada al desarrollo del fenotipo maligno en diversos tipos de cáncer. Buscando evaluar el impacto de NGcGM3 en el comportamiento tumoral, transfectamos B16 con la secuencia de CMAH, enzima responsable de la síntesis de NGc (B16-H). Estas células mostraron una baja expresión de NAcGM3 en membrana y un aumento de la expresión de NGcGM3. B16-H mostró un incremento significativo en la proliferación y la adhesión celular *in vitro*. Aún cuando se observó un aumento de la expresión de integrina $\alpha 5$ en membrana, caveolina-1 mostró niveles menores de concentración y una movilización hacia el espacio citoplasmático. Paralelamente, se observó una disminución en los niveles de expresión de c-Src y Rac-1. Asimismo, cuando es mantenida *in vitro*, B16-H presenta cambios morfológicos con respecto a la línea parental, mostrando un descenso en la cantidad de filopodios y una menor capacidad en la construcción de haces de actina. Nuestros resultados muestran que el aumento de expresión de NGcGM3 regula negativamente la vía de señalización Cav-1/c-Src/Rac1 probablemente a través de la alteración en la composición de los *rafts* de membrana. Considerando que se observa un incremento en la tasa proliferativa celular, estos resultados sugieren que el NGcGM3 promueve la proliferación mediante vías de señalización independiente de anclaje.

108. (734) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES RHOB EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO Y SU INDUCCIÓN POR RADIACIÓN

Notcovich C.¹; Sánchez Crespo R.³; Delgado González D.²; Molinari B.^{1,2}; Duran H.^{1,2,3}

Comisión Nacional de Energía Atómica¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; Universidad Nacional de San Martín³.

Hemos demostrado previamente que existe una correlación entre la radiosensibilidad intrínseca de células de melanoma humano y la muerte celular por apoptosis. RhoB es una GTPasa pequeña que, además de regular la organización del citoesqueleto, está relacionada al proceso de apoptosis de células expuestas a un daño al ADN como la radiación. Asimismo, en una amplia variedad de tumores los niveles de RhoB disminuyen con el progreso del tumor, siendo considerado un gen supresor de tumores por su efecto antiproliferativo y proapoptótico. El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de RhoB en diferentes líneas celulares de melanoma humano en relación a una línea proveniente de melanocitos, y evaluar el efecto de la radiación gamma sobre la expresión de RhoB. Se utilizaron las líneas de melanoma A375,

SB2 y MELJ, y la derivada de melanocitos Pig1. Se demostró para las tres líneas tumorales niveles de expresión de RhoB significativamente menores a los de Pig1 ($p < 0,05$), evaluado por RT-PCR semicuantitativa. Cuando las células tumorales fueron irradiadas hasta una dosis de 4 Gy se observó una inducción de RhoB a las 3 horas de irradiación. La expresión de RhoB aumentó en todas las líneas en relación a su control no irradiado, observándose una inducción mayor ($p < 0,05$) en la línea más radiosensible SB2 en concordancia con su mayor apoptosis en respuesta a la radiación. Los resultados nos permiten demostrar por primera vez en melanoma que RhoB, al igual que en otros tipos de tumores, presenta una menor expresión en células tumorales que en su contraparte normal. Por otro lado, la inducción en la expresión de RhoB en las células irradiadas podría estar asociada con el proceso de apoptosis inducida por radiación. La modulación de RhoB podría constituir una nueva herramienta que permita la sensibilización del melanoma radioresistente.

109. (761) PARTICIPACIÓN DE COFILINA-1 EN LA MIGRACIÓN CELULAR DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO QUE SOBREENPRESAN CATALASA

Bracalente C.²; Salguero N.¹; Ibañez I.²; Muller C.⁴; Klamt F.⁴; Durán H.^{1,2,3}

Comisión Nacional de Energía Atómica¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)²; Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín³; Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brasil⁴.

El melanoma es un cáncer altamente metastásico y resistente a los tratamientos de quimio- y radioterapia. Alteraciones en el sistema de defensa antioxidante conllevan a un estado de estrés oxidativo que está asociado a numerosas enfermedades, como el cáncer. Células tumorales de diversos orígenes incluido el melanoma presentan altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS). Previamente en nuestro laboratorio, se demostró que clones de células de melanoma A375 que sobreexpresan catalasa de forma estable, presentan bajos niveles de H_2O_2 , pero muestran fenotipos diferenciales entre sí. El clon G10 presenta mayor capacidad de migración celular y el A7 mayor diferenciación, asociada a un fenotipo más benigno. A fin de dilucidar si los niveles de ROS participan en la inducción de estos fenotipos, se determinaron los niveles de ROS por DCFH en los clones y células control. Además, se evaluó en cortes de tumores inducidos por los clones y células control, tanto la expresión de cofilina (CFL1), una proteína asociada a migración celular y metástasis como también la formación del aducto, 8-OHdG, marcador de daño oxidativo al ADN. Se observó que el clon G10 presentaba mayores niveles de ROS vs control ($p < 0,05$), no así el clon A7, que no muestra diferencias significativas vs el control. Respecto de los niveles de 8-OHdG, se observó una disminución en ambos clones vs control ($p < 0,05$), en cambio se observó un aumento de CFL1 en el clon G10 ($p < 0,01$) vs control. Estos resultados indicarían que la sobreexpresión de catalasa al disminuir los niveles de H_2O_2 inhibe el daño oxidativo al ADN. Sin embargo, esta sobreexpresión induce mecanismos compensatorios que modulan los niveles de ROS. El clon A7 presenta un fenotipo más benigno que estaría relacionado a que los niveles de ROS no aumentaron en respuesta a la sobreexpresión de catalasa. En cambio, el incremento de los niveles de ROS en el clon G10, estaría asociado a su mayor capacidad de migración y al aumento de CFL1.

110. (765) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA EN TEJIDO NORMAL Y TUMORAL DE MAMA. IMPLICANCIAS EN LA UTILIZACIÓN CLÍNICA DE ERITROPOYETINA EN LA CORRECCIÓN DE LAS ANEMIAS ASOCIADAS A TRATAMIENTOS ONCOLÓGICOS

Zimmermann M.¹; Gómez Pescic M.¹; Stoyanoff T.¹; Alsina A.¹; Todaro J.¹; Aguirre V.¹; Harvey G.^{1,2}; Brandan N.¹
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Nordeste¹; Hospital "Juan R. Vidal", Corrientes².

La eritropoyetina (Epo) y sus análogos son ampliamente empleados en el tratamiento de anemias en pacientes oncológicos,

sin embargo, existen controversias en cuanto a la sobreexpresión y funcionalidad del receptor de eritropoyetina (EpoR) en tejido tumoral mamario. El objetivo general del presente proyecto fue el de caracterizar la presencia del receptor de eritropoyetina, (EpoR) en tejido mamario normal y tumoral humanos y definir su posible rol como factor de proliferación tumoral. Se analizaron especímenes parafinados de biopsias de tumores mamaros con las correspondientes secciones normales. Los cortes de hematoxilina y eosina fueron previamente revisados para confirmar diagnóstico histológico y grado tumoral basado en criterios ya establecidos. Información referente al estadio tumoral, incluyendo tamaño, compromiso de ganglios axilares y marcadores biológicos tales como receptores de estrógeno y progesterona y sobreexpresión de HER2/neu fueron observados de los informes histopatológicos. No se incluyeron otros factores de riesgo que involucren la historia clínica del paciente. Los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica fueron aquellos comercialmente disponibles. Los oligonucleótidos para las PCR han sido elegidos de manera de amplificar diferentes regiones del gen de EpoR y de asegurar la especificidad de la prueba. Logramos determinar un patrón de expresión del EpoR, en los tumores de mama y en sus correspondientes secciones normales, que en muchos casos no se condice con lo previamente descrito en la bibliografía. Asimismo, pudimos establecer una correlación entre la expresión del EpoR con el grado y las características tumorales. Analizando los resultados obtenidos, consideramos que el uso de la Epo recombinante humana para el tratamiento de la anemia resultante de la quimioterapia debería ser precedida de un examen del material de biopsia para el estudio de la expresión del EpoR.

111. (775) EXPRESIÓN DE ERITROPOYETINA (EPO) Y SU RECEPTOR (EPO-R) EN EL ENTORNO HIPÓXICO DEL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS

Todaro J.¹; Aguirre M.¹; Stoyanoff T.¹; Espada J.²; Mansur J.²; Zimmermann M.¹; Brandan N.¹

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste¹ Servicio de Urología, Hospital "Juan R. Vidal", Corrientes².

El carcinoma de células claras renales (CRCC) es el más común de los tumores renales y se asocia con mutaciones del gen Von Hippel-Lindau, implicando la expresión de una serie de proteínas relacionadas con la hipoxia tumoral, entre ellas HIF-alfa 1, EPO y EPO-R. El objetivo de este estudio fue investigar la expresión de eritropoyetina (EPO) y su receptor (EPO-R) en muestras de estos pacientes a través de estudios multiparamétricos. Secciones de tejido tumoral y distal normal de pacientes sometidos a nefrectomía radical (n=10) fueron analizadas por inmunohistoquímica para EPO y EPO-R. Asimismo, se realizó Western blotting para HIF-1 alfa, EPO y EPO-R a partir de homogenados renales de biopsias de estos pacientes. La co-expresión EPO y EPO-R fue detectada por inmunoblottings en todos los casos analizados. Solo en el 55% de los casos EPO-R se evidenció por inmunohistoquímica, presentando un patrón de inmunoreactividad citoplásmico y membranoso. RNAm de EPO-R fue estudiada por PCR, detectándose en la mayoría de las muestras. Estos resultados preliminares sugieren que la expresión de HIF-1 alfa, EPO y EPO-R juegan un importante rol en la tumorigénesis del CRCC, indicando que EPO podría actuar como un factor de crecimiento de tipo autocrino en este tipo de tumores.

112. (823) ROL DE LA AUTOFAGIA EN LA RESISTENCIA ADQUIRIDA A LA INMUNOTERAPIA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA HUMANO HER2+

Rodríguez C.; Reidel S.; Bal De Kier Joffe E.; Jasnís M.; Fiszman G.

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

El receptor HER2, sobreexpresado en el 20-25% de tumores de mama, se asocia a una baja supervivencia libre de enfermedad. El Trastuzumab (Tz), Ac monoclonal anti HER2, se utiliza como inmunoterapia de los tumores de mama HER2+, pero un 60% de los pacientes no responde. Durante el desarrollo tumoral se ha propuesto a la autofagia como mecanismo de escape a la

muerte celular inducida por inmunoterapia, correlacionando con la resistencia adquirida. El objetivo de este trabajo es estudiar el rol de la autofagia en el tratamiento con Tz y su implicancia en el desarrollo de resistencia en células de adenocarcinoma de mama humano HER2+. Con este fin, se analizó la presencia del marcador de autofagia LC3 por Western Blot en células tratadas por 24hs con Tz 50ug/ml o con una IgG no relacionada, observándose que el tratamiento con Tz aumenta el nivel de LC3 significativamente ($p < 0,01$). La inhibición del flujo autofágico con 5nM de Bafilomicina A1 (BAFA1) durante 90 min, incrementó más de un 50% este efecto. Al analizar la presencia de LC3 por inmunofluorescencia, se observó un aumento en la formación de autofagosomas en las células tratadas con Tz. La inhibición farmacológica con BAFA1 del proceso autofágico, simultaneo al tratamiento con Tz mostró una disminución en la viabilidad celular ($p < 0,01$) tras 48hs de incubación. Con el fin de estudiar los mecanismos de resistencia al Tz, se generó una línea celular a partir de un cultivo en 3D (esferoides) tratado con Tz por 14 días y la resistencia de estas células se evaluó por MTS. Al inhibir el proceso autofágico con BAFA1 en la línea celular resistente, se observó una inhibición del crecimiento significativamente mayor respecto a la línea sensible ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos demuestran que la inducción de autofagia estaría relacionada con la supervivencia de células HER2+ resistentes al Tz. La inhibición de la autofagia revierte parcialmente esta resistencia. Concluimos que el estudio de la autofagia en relación a la resistencia a la inmunoterapia, podría aportar nuevos enfoques terapéuticos.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 1

113. (69) PARTICIPACIÓN DE IL-6 EN EL MECANISMO DE SENESCENCIA DE TUMORES DE HIPÓFISIS

Sapochnik M.^{1,2}; Fuertes M.¹; Haedo M.¹; Bonfiglio J.^{1,2}; Atorresi A.¹; Borkosky S.¹; Arzt E.^{1,2}

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)-CONICET- Partner Institute of The Max Planck Society¹; Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

Los tumores de hipófisis son neoplasias en su mayoría benignas, de crecimiento lento y bajo índice mitótico, lo cual hace pensar que existen mecanismos que frenan su desarrollo. La senescencia consiste en el arresto irreversible del ciclo celular como respuesta protectora ante la transformación neoplásica. En este contexto, se conoce que la senescencia inducida por oncogenes (OIS) detiene la transformación maligna a través de la señal autócrina de interleuquina 6 (IL-6). Además, IL-6 parácrina induce proliferación en células hipofisarias tumorales mientras que la inhibe en células hipofisarias normales. La senescencia mediada por IL-6 autócrina podría ser, entonces, responsable de la naturaleza benigna de los tumores hipofisarios. Habiendo observado indicios de senescencia en estos tumores, se caracterizó la línea celular tumoral hipofisaria MtT/S como modelo de senescencia *in vitro* mediante determinación de marcadores específicos, tales como β -galactosidasa asociada a senescencia (SA β -gal), por tinción histoquímica; y expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, por *Western blot*. Luego, se generaron clones de células tumorales MtT/S con silenciamiento estable de IL-6, utilizando un shRNA específico. Estos clones presentaron cambios en los marcadores de senescencia, observando actividad reducida de SA β -gal, menor expresión de p21 y mayor expresión de pRb. A fin de determinar el rol de IL-6 en senescencia *in vivo*, 2 clones MtT/S-shRNA IL-6 se inyectaron en 2 series independientes de 4 ratones *nude* cada una, observando desarrollo tumoral (volumen promedio de 2.2 cm³ a 85 días post-inyección); mientras que la inyección de células MtT/S-shRNA control no indujo tumorigénesis, ya que la misma depende de células foliculo-estrelladas. Estos hallazgos demuestran la participación de IL-6 autócrina en senescencia tumoral hipofisaria y alientan a caracterizar en detalle el *pathway* de IL-6 involucrado en este proceso. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA, FOCEM (COF 03/11)

114. (124) CRH ACTIVA LA MAPK P38 A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE TIPO 1 EN CÉLULAS NEURONALES HIPOCAMPALES

Gonzalez H.¹; Inda C.¹; Bonfiglio J.^{1,2}; Senin S.¹; Atorresi A.¹; Holsboer F.³; Arzt E.^{1,2}; Silberstein S.^{1,2}

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)-CONICET-Partner Institute of The Max Planck Society¹; Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Max-Planck Institute Of Psychiatry, Munich³.

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) está involucrada en la respuesta neuroendócrina, autonómica y comportamental frente al estrés. La desregulación del sistema CRH y su receptor tipo 1 (CRHR1) está asociada a estadios patológicos como ansiedad y depresión. Estudios *in vivo* de nuestro laboratorio demostraron que CRH activa, vía CRHR1, MAPKs en zonas límbicas específicas (hipocampo y amígdala) relacionadas con el procesamiento de la información externa y aspectos comportamentales del estrés. Nuestro objetivo es dilucidar los mecanismos moleculares de esta activación mediante el uso de una línea celular murina de origen hipocampal (HT22). Observamos que CRH produce una activación de la MAPK p38 en clones que expresan de manera estable CRHR1 (HT22-CRHR1) en función del tiempo (0-60min) y de la concentración de CRH (0,001-100 nM). Esta activación es mediada por CRHR1, ya que es bloqueada con un antagonista específico (DMP696). Mediante microscopía confocal observamos, en respuesta a CRH, un incremento de la forma activada (fosforilada) de p38 en el núcleo. A su vez, encontramos que p38 puede ser activado por forskolina, con una cinética similar a la obtenida con CRH 100 nM, lo cual sugiere que el AMPc regularía su actividad. En trabajos previos demostramos que CRH activa, vía CRHR1, la MAPKs ERK1/2 en estas células. Comenzamos a estudiar la interacción entre las vías de p38 y ERK1/2 en la señalización de CRHR1, mediante el uso de inhibidores (de p38, SB203580; de MEK1/2, U0126). Observamos que el pretratamiento de HT22-CRHR1 con SB203580 produjo una disminución de la activación de ERK1/2 por CRH a tiempos cortos (3-6 min), en tanto que U0126 no tuvo efecto significativo en la activación de p38. Nuestros resultados aportan a la comprensión de los mecanismos moleculares de acción de CRHR1 y contribuyen a la identificación de las vías de señalización, lo cual podría conducir al descubrimiento de blancos terapéuticos. Apoyado por ANPCyT, CONICET y FOCEM (COF 03/11)

115. (168) PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA FOSFORILACIÓN DEL DOMINIO AMINO TERMINAL DE ZEB1 Y SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Llorens M.; Cavallo N.; Perrone A.; Cabanillas A.
Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CICIBI)-CONICET.

ZEB1 (Zinc Finger E-box binding Homeobox) factor de transcripción involucrado en la diferenciación celular, EMT y metástasis se presenta bajo dos formas hiper e hipofosforiladas. Nuestro objetivo fue determinar qué vía/s de señalización intracelular estarían involucradas en la fosforilación de la región aminoterminal de ZEB1 (N-ZEB1) y cómo eso repercute en su localización subcelular. Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de N-ZEB1 en células HEK293T previamente tranfectadas con un clon que expresa dicha región y posterior Western Blot revelado con diferentes anticuerpos anti-fosfostrato específicos, lo cual mostró que N-ZEB1 es modificado postraducionalmente por fosforilación y las vías de señalización involucradas serían PI3K(AKT), MAPK y PKC. Para estudiar la localización subcelular de N-ZEB1 se realizó microscopía de fluorescencia en células CHO-K1 tranfectadas con dos clones de dicha región fusionados a GFP, eGFPZ1 y eGFPZ2 (incluido en el anterior) y posteriormente tratadas con diferentes activadores e inhibidores de vías. Los tratamientos con PD98095, CalC, LY294002 y NVP-AEW541 (inhibidores de MEK/ERK, PKC, PI3K e IGF1 respectivamente) mantuvieron la señal

GFP con localización nuclear tanto en controles como en ambos clones. El tratamiento con PMA/Iomicina (activador de PKC) reveló una fuerte señal citosólica en ambos clones, en tanto que el tratamiento con IGF1 repitió ese comportamiento sólo en el clon eGFPZ1. El clon eGFPZ2 no fue respondedor a IGF-1. Estos resultados sugieren que el cambio de estado de fosforilación de la región N-ZEB1 induce cambios en su localización subcelular y que las vías de señalización involucradas serían PKC e IGF1 y eGFPZ1 y PKC en eGFPZ2. Múltiples vías de señalización parecen estar involucradas en la fosforilación de N-ZEB1, sin embargo la fosforilación inducida por las vías de IGF1 y PKC contribuirían en el rol biológico de ZEB1 mediante un cambio de localización subcelular.

116. (180) EFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO SOBRE LA VIA DE SEÑALIZACION DE INSULINA PI3K/AKT EN CORAZÓN

Piazza V.; Burghi V.; McCallum G.; Morales Y.; González L.; Sotelo A.; Dominici F.; Tury D.; Muñoz M.; Miquet J. *Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

El exceso prolongado de hormona de crecimiento (GH) produce resistencia a la insulina. Ratones transgénicos que sobreexpresan GH presentan alteraciones en la señalización de la insulina en el corazón. Debido a que en estos ratones la sobreexpresión de GH ocurre desde el nacimiento y se asocia con una marcada hiperinsulinemia, no es posible diseccionar si las alteraciones en la señal de la insulina en el corazón se deben a la acción directa de niveles crónicamente elevados de GH sobre este tejido, o si son consecuencia de la hiperinsulinemia. Para evaluar el efecto de la exposición a la GH por un período más corto sobre la señal de la insulina en corazón, se trataron ratones normales adultos con GH durante 4 días. Este tratamiento no produjo un aumento significativo de los niveles de insulina en suero. Se trabajó también con cultivo primario de cardiomiocitos de rata al que se le agregó GH en el medio de cultivo por 24 horas. En ambos modelos se realizó un estímulo agudo con insulina luego del tratamiento con GH; los controles se trataron con solución salina. Mediante inmunoprecipitación e inmunoblotting se determinó la activación de proteínas involucradas en la señalización de la insulina. El tratamiento con GH en ratones por 4 días provocó una disminución en la fosforilación en tirosinas del receptor de la insulina en respuesta al estímulo con insulina. También se observó una menor respuesta a nivel de la asociación del sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS1) con la subunidad p85 de la enzima PI3K, y de la fosforilación de Akt y de sus sustratos GSK3 y AS160 ($P < 0,01$, $n=6$). En cultivo primario de cardiomiocitos el pretratamiento con GH también produjo una menor activación de la vía PI3K/Akt en respuesta a la insulina ($P < 0,01$, $n=5$). Estos resultados demuestran que la GH produce una atenuación en esta vía de señalización de la insulina en corazón, incluso si la exposición a altos niveles de GH se da por un período de tiempo corto y en ausencia de hiperinsulinemia.

117. (239) EL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL MODIFICA EL PATRÓN DE APOPTOSIS DURANTE EL DESARROLLO POST-NATAL DEL CEREBRO EN EL HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO

Elguero E.; Alippe Y.; Prez H.; Finocchietto P.; Poderoso J.; Carreras M. *Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.*

Previamente, demostramos que las hormonas tiroideas regulan la localización mitocondrial y actividad de la enzima Oxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). El objetivo de este trabajo es evaluar el papel del óxido nítrico mitocondrial como segundo mensajero durante el desarrollo post-natal del cerebro en el hipotiroidismo. Mediante la administración de metimazol a ratas preñadas se indujo el hipotiroidismo congénito; se analizaron sus crías en los

días 5 -15 y 30 post- natales (P5 - P15 y P30 respectivamente). La expresión y actividad de nNOS en fracciones mitocondriales, fué máxima en P15 en el grupo hipotiroideo (H) consecuente con niveles aumentados de NO medidos por citometría de flujo (DAFM). El incremento del NO mitocondrial condujo a la disminución de la actividad del Complejo I de la cadena respiratoria (CI) en P5 y P15 de H, el cual se revirtió a valores control por la infusión de L-NAME (30mg/Kg/día) entre los días p10 y p15. La inhibición del CI incremento 3 veces la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno en P15H respecto al control y al grupo con L-NAME. En forma paralela se produjo un aumento de la expresión de Bax en mitocondrias de P15H y P30H. El ensayo de TUNEL reveló un incremento en la apoptosis en P30 H que no se evidenció en los animales tratados con L-NAME. Estos resultados permiten concluir que en el hipotiroidismo, la inhibición de la actividad de nNOS durante un período crítico en el desarrollo post-natal del cerebro restablece el metabolismo mitocondrial y el estado redox, alterado por el incremento de la producción de NO, que permite restaurar el balance apoptótico del cerebro en desarrollo.

118. (363) IMPACTO DE P-REX1 SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES ERBB EN EL CÁNCER DE MAMA Y SUS CONSECUENCIAS PARA LA PROGRESIÓN TUMORAL

Wertheimer E.¹; Barrio Real L.²; Abba M.³; Garg R.²; Kordon E.⁴; Kazanietz M.² *Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET¹; University of Pennsylvania School of Medicine², Universidad Nacional De La Plata³; Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFYBINE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁴.*

Los receptores tirosina-quinasa de la familia ErbB juegan un rol fundamental en la progresión del cáncer de mama. La hiperactivación de estos receptores así como la sobreexpresión de sus ligandos como EGF, TNF alfa, heregulinas (HRGs), o el aumento de la señalización río abajo (como la mediada por PI3K), son de importancia indiscutida en la etiología del cáncer de mama. Se ha demostrado que la activación por ligando de los receptores ErbB1 ó ErbB3 promueve una fuerte activación de Rac1, una Rho GTPasa ampliamente implicada en motilidad, mitogénesis, transformación y metástasis. P-Rex1 es un Rac-GEF esencial para la activación de Rac1 y la migración inducida por ligandos de receptores ErbB de células de cáncer de mama. Este GEF está altamente sobreexpresado en cáncer de mama humano y en líneas celulares luminales derivadas de este tipo de tumores, incluyendo a MCF-7, BT-474 y T-47D. Además, se ha demostrado que su silenciamiento inhibe profundamente la tumorigénesis dependiente de ErbB2. Reportamos aquí un estudio de microarreglos de cDNA el cual revela que la activación de receptores ErbB modifican los niveles de expresión de un alto número de genes involucrados en la progresión del cáncer de mama, en particular en procesos migratorios e invasivos. El análisis de los datos muestra que una parte importante del efecto gatillado por receptores ErbB depende de P-Rex1. Basados en estos resultados, proponemos que P-Rex1 participa en los procesos migratorios e invasivos de las células de cáncer de mama regulando la expresión génica de moléculas involucradas en las vías de señalización asociadas a dichos procesos. Este estudio servirá de base para determinar la relevancia funcional de P-Rex1 en la progresión del cáncer de mama y contribuirá a establecer su significado pronóstico y terapéutico.

119. (455) LA ACTIVACIÓN β -ADRENÉRGICA INDUCE CAMBIOS EN EL CITOESQUELETO DE CÉLULAS NO TUMORALES DE MAMA HUMANA MCF-10A

Gargiulo L.; Rivero E.; Romarowski A.; Buffone M.; Luthy I.; Bruzzzone A. *Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET.*

En trabajos anteriores demostramos que la activación β -adrenérgica con isoproterenol (Iso) induce la adhesión celular

en la línea MCF-10A. La familia de proteínas Rho, entre ellas Rac, se encuentra involucrada en la reorganización del citoesqueleto. El objetivo fue evaluar los cambios producidos por el Iso en el citoesqueleto y estudiar posibles vías de señalización involucradas. Para determinar el sustrato al cual el Iso induce adhesión, las células se sembraron en vidrios recubiertos con laminina, colágeno o fibronectina en presencia o ausencia de Iso 0.1 μ M. Todos los tratamientos indujeron un aumento en la adhesión celular ($p < 0.05$) comparado a los vidrios sin tratamiento. Sin embargo, el Iso indujo adhesión específica a la fibronectina ($p < 0.05$). Esto se ve acompañado de un aumento significativo del área de la célula adherida (Iso: $974,1 \pm 56,7 \mu\text{m}^2$ vs control: $333,2 \pm 22,78 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$). Estudios de inmunofluorescencia demostraron que el Iso induce un cambio en la morfología celular como consecuencia de alteraciones en el citoesqueleto. Marcación para β -tubulina demuestra una marcación difusa dentro del citoplasma. Luego del tratamiento con Iso, se observan microtúbulos individuales extendiéndose radialmente desde el área perinuclear. Además, el tratamiento con Iso disminuye las microvellosidades observadas en las células no tratadas. Por western blot se observó que el cambio en el citoesqueleto de actina que provoca el Iso, se correlaciona con un aumento en la cantidad de actina fibrilar con respecto a la globular. El Iso indujo un aumento de la fosforilación de Akt y de la fosforilación de la Ser-71 de Rac (sitio de fosforilación específico de Akt), y un aumento de la forma fosforilada de cofilin. La activación β -adrenérgica, a través de estos cambios en el citoesqueleto podría estar regulando los procesos de adhesión, como así también los efectos ya conocidos sobre proliferación y migración en células de mama humana.

120. (522) REGULACIÓN CRUZADA ENTRE TLR4 Y EL RECEPTOR DE INSULINA EN EL CONTEXTO DE INFLAMACIÓN CRÓNICA E INSULINA RESISTENCIA

Lago Huvelle M.¹; Barcos L.¹; Penas Steinhart A.²; Coluccio Leskow F.¹

IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

La diabetes es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por elevadas concentraciones de ácidos grasos en sangre y una menor sensibilidad a la insulina en sus órganos blanco, denominada resistencia a la insulina. Existe consenso en que la inflamación crónica presente en personas obesas en órganos como hígado y tejido adiposo promueve resistencia a la insulina. Si bien aún no se conoce el mecanismo, se ha reportado que una dieta rica en ácidos grasos modifica la composición de la microbiota intestinal, provocando un aumento de la concentración sanguínea de LPS. Éste, a través de la unión a su receptor TLR4, gatilla una respuesta inflamatoria que inhibe la activación de la vía de transducción de señales de la insulina. Para estudiar el efecto de la respuesta inflamatoria sobre la vía de señalización de la insulina, utilizamos el modelo de preadipocitos de ratón 3T3-L1. En primer lugar, confirmamos la funcionalidad de la vía de señalización del receptor de insulina (IR) en dichas células mediante WB e IF. Luego de estimuladas con insulina 50nM, se observó activación tanto de la vía de AKT que media la respuesta metabólica como de ERK 1/2, una proteína clave en la respuesta mitogénica. Luego se estudió el efecto del pretratamiento con LPS a distintos tiempos (1, 6, 8 y 22 horas) en la respuesta a insulina. Se observó mediante WB e IF niveles similares de activación de AKT independientemente del pretratamiento ($n=3$), en contraposición a lo reportado en otros sistemas. Por el contrario, sí se observó una disminución en los niveles de activación de ERK1/2, dependiente del tiempo de exposición al LPS. Estos datos validan a la línea celular 3T3-L1 como modelo de estudio y sugieren que la activación de TLR4 tiene efectos inhibitorios sobre la vía de señalización del IR, mediante la disminución de p-ERK 1/2.

121. (625) EXPRESIÓN DE MAPK FOSFATASAS (MKP) Y SU REGULACIÓN POR SUERO FETAL BOVINO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA DE LA LÍNEA MDA-MB-231

Nudler S.; Gorostizaga A.; Orlando U.; Mori Sequeiros García M.; Castillo A.; Podestá E.; Paz C.
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-UBA-CONICET, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Las alteraciones en la señalización mediada por MAPKs juegan un rol crítico en el desarrollo y progresión del cáncer. Hemos demostrado que en células de cáncer de mama MDA-MB-231 la inhibición de la quinasa río arriba de ERK reduce significativamente la proliferación inducida por suero fetal bovino (SFB). Dado que la actividad de MAPK es controlada no sólo por quinasas que las activan sino también por fosfatasa que las inactivan (MAPK fosfatasa, MKPs), el objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de expresión de MKPs y su regulación por SFB (10%) en células MDA-MB-231. El estudio se focalizó en MKP-1 y MKP-2, enzimas que desfosforilan a todas las MAPKs y se inducen por diversos estímulos, y en MKP-3, enzima específica para ERK1/2 e inducible sólo por estímulos proliferativos. Mediante RT-PCR semicuantitativa se analizaron los niveles del ARNm en células privadas de suero durante 24 h (C) y luego estimuladas con SFB (E) durante 60 min. (MKP-1) o 120 min. (MKP-2 y MKP-3). A diferencia de lo que ocurre en otros tipos celulares, la privación de suero no anuló completamente la expresión de MKPs, ya que en ambas condiciones se detectaron los ARNm de las tres fosfatasa. Para MKP-2 se detectaron dos transcritos, como ya fue descrito, y lo mismo se detectó para MKP-3, hallazgo novel para este tipo celular. El SFB aumentó significativamente los niveles del ARNm mayoritario de MKP-3 pero no los de MKP-1 y MKP-2. La determinación del perfil temporal de inducción del transcritto mayoritario de MKP-3 por SFB mostró un aumento dependiente del tiempo, máximo a los 120 min. ($C=0,89 \pm 0,21$, $E=2,11 \pm 0,22$, $p < 0,05$). El SFB también reguló los niveles de la proteína MKP-3. Se concluye que en células MDA-MB231, con alta proliferación dependiente de ERK, un estímulo proliferativo regula selectivamente el transcritto mayoritario de MKP-3 como mecanismo para regular la actividad de esa quinasa específicamente.

122. (661) MECANISMO DE DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR BETA3- ADRENERGICO. IMPLICANCIAS EN SU UTILIZACIÓN COMO BLANCO TERAPEUTICO.

Fazzari E.¹; Echeverría E.¹; Granja Galeano G.¹; Shayo C.²; Davio C.¹; Fernandez N.¹

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET².

Los receptores β 3-adrenérgicos (β 3AR) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G y al activarse incrementan los niveles intracelulares de AMPc. Se expresan mayormente en tejido adiposo y vejiga, y ha sido postulado como blanco para el tratamiento de la obesidad y del síndrome de vejiga hiperactiva (SVH). Reportes previos indican que en células SK-N-MC que expresan en forma nativa al receptor, el pretratamiento con isoproterenol causa una desensibilización significativa de la respuesta del receptor. Sin embargo, el β 3AR carece de sitios potenciales de fosforilación por GRK2 y PKA, las enzimas responsables de la desensibilización de los β 1AR y β 2AR. El objetivo del presente trabajo es evaluar la susceptibilidad del β 3AR de ser desensibilizado y el mecanismo involucrado, utilizando como modelo de sobreexpresión células HEK293T transfectadas. En dicho sistema, se realizaron ensayos de concentración-respuesta utilizando un agonista adrenérgico general (isoproterenol) y uno selectivo para el β 3AR (BRL37344), obteniendo respectivamente una respuesta máxima de AMPc de 44 ± 4 y $4,79 \pm 0,2$ pmol ($p < 0,001$ con respecto a las células mock). Al evaluar la desensibilización del β 3AR se observó una disminución del $38 \pm 2\%$ en la capacidad de respuesta del sistema luego de 120 minutos de pretratamiento con BRL. Resultados similares fueron obtenidos para isoproterenol. Sin embargo, ensayos de desensibilización realizados en presencia de construcciones dominantes negativas para los distintos do-

minios de GRK2 mostraron que sólo las mutantes del dominio RGS de GRK2 son capaces de inhibir en forma significativa la desensibilización en la respuesta a BRL y no a isoproterenol. Los resultados obtenidos indican que la respuesta de AMPc del β 3AR es susceptible de ser desensibilizada y sugieren que el dominio RGS de GRK2 estaría involucrado en dicho proceso. Estos resultados plantean la necesidad de repensar el uso de agonistas del β 3AR en el tratamiento de la obesidad y el SVH.

- 123. (666) POSIBLE EFECTO REGULADOR DE LAS INMUNOFILINAS DE ALTO PESO MOLECULAR SOBRE HTERT**
Susperreguy S.¹; Piwien Pilipuk G.¹; Galigniana M.^{1,2}; Lagadari M.¹
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

Las inmunofilinas de alto PM (IMMs) son una familia de proteínas solubles que se asocian a hsp90. Las IMMs FKBP51 y FKBP52 presentan una alta homología y muestran propiedades antagónicas. Sabemos que FKBP51 es un factor antiapoptótico que actúa a nivel mitocondrial y nuclear, y se encuentra altamente expresada en varios tipos de tumores. Un marcador clave para la rápida expansión clonal de células tumorales es la actividad de la enzima telomerasa, encargada de elongar los telómeros durante cada división celular. En su forma inactiva, la subunidad catalítica hTERT se asocia a hsp90, hsp70 y p23, mientras que la forma activa disocia a hsp70. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que en células Hela, tanto FKBP51 como FKBP52 coinmunoprecipitan con hTERT y por microscopía confocal pudimos observar que hTERT se localiza mayoritariamente en el núcleo y colocaliza con FKBP51 tanto en células en interface como en división. Resultados preliminares muestran además que en condiciones de estrés oxidativo FKBP51 se moviliza al núcleo, mostrando cierta colocalización con hTERT. De esta manera y empleando el proceso de estrés oxidativo como modelo de estudio, nos planteamos como objetivo evaluar la capacidad de las FKBP5 y hTERT de unirse al DNA de la región telomérica, empleando ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y analizar la posible regulación de la transcripción que estos factores puedan ejercer en esa región a través de RT-PCR. Al mismo tiempo hemos generando clones que sobre-expresen de manera estable la enzima hTERT para confirmar los resultados hallados. El conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la actividad y la localización de la enzima hTERT encargada de mantener la integridad de los telómeros, podría abrir nuevos horizontes para innovar en las estrategias terapéuticas de diferentes tipos de cáncer.

- 124. (720) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL, "TRANSCRIPATOMA", POR LA ENZIMA ACYL-COA SINTETASA-4 EN CÁNCER DE MAMA**
Orlando U.; Dattilo M.; Castillo A.; Mele P.; Solano A.; Maloberti P.; Podesta E.
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-UBA-CONICET, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La enzima acyl-CoA sintetasa-4 (ACSL4) interviene en el metabolismo del ácido araquidónico y se encuentra sobreexpresada en carcinoma de colon, hepatocelular y mama. Hemos demostrado *in vitro* e *in vivo* que ACSL4 es la enzima marcapaso en la regulación de la agresividad tumoral en células de cáncer de mama a través del incremento de leucotrienos y de prostaglandinas. El objetivo del trabajo es estudiar la regulación de la expresión transcripcional (transcriptoma) e identificar los elementos genéticos regulados por la expresión de ACSL4. Para ello se realizó la secuenciación masiva de los mRNA (RNA-Seq) en células de cáncer de mama MCF-7 conocidas por su baja agresividad y en células MCF-7 que sobreexpresan en forma estable ACSL4. Hemos demostrado previamente que la sola transfección de esta enzima le confiere a estas células la capacidad de generar tumores *in vivo*. Utilizando el TopHat y Cufflinks software, se identificaron

182 loci expresados diferencialmente con $p \leq 0.05$. Dentro de los genes expresados en forma diferencial se encuentran los genes relacionados a la agresividad tumoral y a la expresión de la ciclooxigenasa-2 y del receptor estrogénico (DNMT1, HDAC, IL20, WNT6, RBL2/p130 y Twist-1). También se analizaron los datos de RNA-Seq en términos de respuesta biológicas y las vías canónicas. Esta clasificación fue probada por el valor de p. Las vías canónicas fueron además ordenadas por la relación número de genes y número de moléculas que existen en la vía. Dentro de las biofunciones relacionadas a cáncer, los genes involucrados están relacionados a neoplasia epitelial, cáncer de gónadas y mama, y dentro de las vías canónicas las más destacadas fueron el movimiento y la migración celular. Estos resultados demuestran que la regulación de la agresividad tumoral por ACSL4 no es debida a la regulación de una simple molécula sino a la regulación global de genes involucrados en la regulación de la progresión tumoral.

CARDIOVASCULAR 1

- 125. (57) EVALUACIÓN POR ECOCARDIOGRAMA DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C SOBRE LA HIPERTROFIA Y LA FUNCIÓN CARDÍACA EN LA HIPERTENSIÓN**
Prentki Santos E.^{1,2}; Caniffi C.^{1,2}; Bouchet G.^{1,2}; Romero M.^{1,2}; Sueiro L.^{1,2}; Muñoz F.^{1,2}; Reyes A.^{1,2}; Barrionuevo E.^{1,2}; Gomez M.^{1,2}; Arranz C.^{1,2}; Costa M.^{1,2}
Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUMFEA)-CONICET-UBA².

El péptido natriurético tipo C (CNP) es sintetizado en células cardíacas. Regula la homeostasis cardiovascular mediante sus efectos sobre el endotelio, fibroblastos y miocitos. Por su acción hipotensora y cardioprotectora podría ser considerado para el tratamiento de distintas patologías cardíacas. **Objetivo:** estudiar el efecto de la administración crónica de CNP en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y Wistar normotensas (W) sobre la hipertrofia y la función del ventrículo izquierdo (VI). Ratas W y SHR de 12 semanas (n=6/grupo) recibieron infusión de CNP (0,75 μ g/hr) o solución fisiológica (SF) mediante bombas osmóticas por 14 días. Se midió la presión arterial sistólica (PAS, mmHg), se evaluó la función del VI mediante electro-ecocardiograma (frecuencia cardíaca (FC, lat/min); volumen de fin de diástole y sístole (VFD, VFS, ml); volumen sistólico (VS, ml); volumen minuto (VM, ml/min)). Se extrajo el VI para determinar su índice de masa (IMVI, peso VI (g)/longitud tibia (mm)) y el área de los miocitos (μ m²). Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, post test Bonferroni. Los resultados se expresan como media \pm ESM. PAS W: SF=118 \pm 2, CNP=122 \pm 3; SHR: SF=175 \pm 3*, CNP=159 \pm 5[#] ^{IMVI} W: SF=0,023 \pm 0,002, CNP=0,024 \pm 0,001; SHR: SF=0,032 \pm 0,001*, CNP=0,029 \pm 0,001 *Área miocitos* W: SF=349 \pm 11, CNP=337 \pm 10; SHR: SF=615 \pm 43*, CNP=561 \pm 62 *FC* W: SF=427 \pm 15, CNP=440 \pm 10; SHR: SF=435 \pm 10, CNP=434 \pm 15 *VFS* W: SF=0,05 \pm 0,01, CNP=0,04 \pm 0,01; SHR: SF=0,05 \pm 0,02, CNP=0,07 \pm 0,03 *VFD* W: SF=0,21 \pm 0,03, CNP=0,22 \pm 0,04; SHR: SF=0,16 \pm 0,02*, CNP=0,23 \pm 0,03[#] *Vs* W: SF=0,17 \pm 0,02, CNP=0,18 \pm 0,03; SHR: SF=0,11 \pm 0,01*, CNP=0,16 \pm 0,02[#] *VM* W: SF=80,80 \pm 8,00, CNP=82,40 \pm 10,32; SHR: SF=47,85 \pm 2,01*, CNP=68,80 \pm 7,35* ($p < 0,05$ vs WSF/ $p < 0,05$ vs SHRSF). La mayor PAS de las SHR está acompañada de hipertrofia y alteraciones en la función del VI. En SHR, el CNP disminuye la PAS y, si bien no se observan cambios morfológicos, el tratamiento crónico con el péptido mejora la eficiencia del VI en este modelo de hipertensión.

- 126. (78) LA DIABETES POR ESTREPTOZOTOCINA Y LA SOBRECARGA ORAL DE FRUCTOSA PRESENTAN UN PATRÓN SIMILAR DE ALTERACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL Y DE LOS PROSTANOIDES VASCULARES EN LA RATA**
Lee H.; Andrade V.; Donoso A.; Sánchez Eluchans N.; Peredo H.; Puyó A.

Cátedra de Anatomía Humana Macro y Microscópica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La estreptozotocina (STZ) en la rata produce un cuadro similar a la diabetes mellitus (DM) tipo 1 al destruir las células beta pancreáticas; mientras que la sobrecarga oral de fructosa (F) simula el síndrome metabólico asociado a la DM tipo 2. Por otra parte los prostanooides (PR) tienen efectos vasoactivos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la relación entre los mismos y la presión arterial (PA) en estos modelos. Se utilizaron tres grupos de ratas Sprague-Dawley macho: control (C, n=6), diabéticas por STZ (D, n=6) y con sobrecarga de F (FR, n=6). La DM por STZ fue inducida por una inyección i.p. de STZ 45 mg/kg en buffer citrato pH 5,5; el grupo FR bebió una solución de F al 10% p/v; el grupo C bebió agua y recibió una inyección i.p. de buffer. Los animales se sacrificaron a las 9 semanas y se midieron glucosa, triglicéridos (kits comerciales) e insulina (ELISA) en plasma y la PA sistólica (PAS) por método indirecto. Los lechos mesentéricos se incubaron y los PR liberados se determinaron por HPLC. La STZ redujo el peso de los animales (D, 333±14 g vs C, 408±14 y FR, 414±18, p<0,01); D y FR presentaron aumentos en la glucemia (D, 488±25 mg/dl y FR, 148±6 vs C, 128±6, p<0,001 y p<0,05), los triglicéridos (D, 232±14 mg/dl y FR, 152±10 vs C, 57±7, p<0,01); y la PAS (D, 138±4 mmHg y FR, 135±2 vs C, 115±1, p<0,001). Los grupos D y FR disminuyeron los PR vasodilatadores prostaglandina (PG) E₂ (D, 54±10 ng/mg de tejido y FR, 40±6 vs C, 97±7, p<0,01 y p<0,001) y 6-ceto F₁alfa, metabolito estable de la prostaciclina (D, 59±11 y FR, 51±9 vs C, 105±7, p<0,01 y p<0,001). El PR vasoconstrictor tromboxano (TX) B₂, metabolito estable del TXA₂, disminuyó sólo en D (D, 47±5 vs FR, 80±8 y C, 74±7, p<0,01). Se concluye que el aumento de la PAS en la diabetes por STZ y en la sobrecarga de F podría atribuirse en parte a las alteraciones observadas en la liberación de PR en el lecho mesentérico, ya que en ambos modelos se reduce la liberación de dos compuestos vasodilatadores.

127. (111) EFECTO DUAL DE LA PROGESTINA SINTÉTICA ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) A NIVEL DEL ENDOTELIO VASCULAR

Cutini P.^{1,2}; Massheimer V.^{1,2}

Cátedra de Bioquímica Clínica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)².

La terapia de reemplazo con estrógenos combinada con progestinas sintéticas (MPA) surge como alternativa de elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares (ECV) en la postmenopausia. Un aumento de la adhesividad plaqueta-endotelio y una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) constituyen eventos que participan de la génesis de la aterosclerosis. Contrariamente, la migración de células endoteliales (CE) cumple un rol importante en la regeneración vascular. El objetivo de esta investigación fue evaluar el mecanismo de acción de MPA sobre estos eventos bioquímicos celulares involucrados en la lesión vascular. Utilizamos cultivos primarios de CE de aorta murina. Previamente demostramos que MPA inhibe significativamente la síntesis de NO. Evaluamos la contribución del receptor de Pg y las vías mensajeras MAPK, PI3K, ciclooxigenasa (COX) y PKC. En presencia de RU486 (antagonista del receptor de Pg) se suprimió el efecto de MPA sobre la síntesis de NO (36±3, 20±2, 33±3nmol NO/mg prot; control, MPA 1nM, MPA 1nM+RU486; p<0.02). La preincubación de las células con los inhibidores selectivos PD98059 (MAPK), LY294002 (PI3K) e indometacina (COX), anula totalmente el efecto inhibitorio de MPA sobre la síntesis del vasoactivo. Sin embargo, a inhibir la vía PKC con chelerythrine la acción de MPA no se altera. En ensayos de adhesión plaquetaria, observamos que MPA aumentó el número de plaquetas adheridas a las CE (33-49% sobre el control, MPA 1-100nM; p<0.02) y potenció significativamente el efecto inducido por el agente proinflamatorio LPS (22-38% sobre LPS; MPA 1-100nM; p<0.02). Empleando la técnica de wound healing com-

probamos que MPA estimula marcadamente la migración de CE (60±7, 512±61 y 912±89 células/campo; control, MPA 1 y 100nM; p<0.02). Podemos concluir que en CE MPA ejerce un efecto dual, negativo en lo que respecta a síntesis de NO y la interacción plaqueta-endotelio, y favorable en términos de modulación positiva de la migración celular.

128. (189) SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO CARDIOVASCULAR Y CAVEOLINAS DURANTE LA DESHIDRATACIÓN EN LA ETAPA POSTNATAL

Netti V.; Iovane A.; Alencastro L.; Vatrella M.; Fellet A.; Balaszczuk A.

Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Previamente demostramos en animales de 2 y 12 meses que los cambios en el sistema del NO cardiovascular frente a la hipovolemia dependen de la edad. **Objetivo:** Evaluar los efectos de la restricción de agua sobre el NO cardiovascular en ratas de 25 y 50 días. **Métodos:** Grupos: R: restricción de agua 3 días; C: agua *ad libitum* 3 días (n = 10/ grupo). A las 72 horas se determinaron: peso, hematocrito, presión arterial sistólica (PAS) y frecuencia cardíaca (FC); se extrajeron el corazón y la aorta para evaluar la actividad de la NO sintasa (NOS) ([¹⁴C]-Arginina) y niveles proteicos de la NOS endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS) y caveolinas 1 (cav-1) y 3 (cav-3) (Western Blot). **Resultados:**

	C25	R25	C50	R50
Peso (g)	86±11	50±5*	246±15†	177±14*
Hematocrito (%)	43±1	56±1*	49±1†	62±1*
PAS (mmHg)	100±4	124±7*	116±4†	135±5*
FC (lpm)	456±15	429±16*	387±18†	405±21*

*p<0.01vs.C; †p<0.01vs.25 días

En la aurícula, la deshidratación produjo en R25 un descenso en la actividad de la NOS, menores niveles de eNOS y nNOS y aumento de cav-1. En R50 hubo un incremento en la actividad de la NOS sin cambios en los niveles de ninguna isoforma o en cav-1, pero cav-3 se incrementó. En el ventrículo, hubo un aumento de la actividad de la NOS en R25, debido a un aumento de eNOS y nNOS y disminución de ambas cav. En R50, no hubo cambios en la actividad de la NOS pero los niveles de eNOS, iNOS, nNOS y cav-1 se incrementaron y cav-3 disminuyó. A nivel vascular, el grupo R25 mostró una menor actividad de NOS, descenso de iNOS y aumento de cav-3, mientras que R50 no presentó cambios en la actividad pero hubo un aumento de iNOS, cav1 y cav-3 y disminución de eNOS. **Conclusión:** La restricción de agua indujo un estado hipovolémico en ambos grupos etarios, evidenciado por el descenso del peso y aumento del hematocrito. Cambios en las isoformas de la NOS y caveolinas en respuesta al estrés osmótico afectan a la actividad del sistema del NO cardiovascular impactando sobre la PAS y FC según la etapa de crecimiento.

129. (237) EFECTOS HEMODINÁMICOS DE LA ARGININA DEPENDIENTES Y NO DEPENDIENTES DE ÓXIDO NÍTRICO

Guridi J.^{1,2}; Borgatello C.²; Scremin O.^{2,3,4}

Universidad Nacional de Rosario¹; PROFISIO, Universidad Nacional De Rosario, Argentina²; Va Greater Los Angeles Healthcare System³; Department of Physiology, David Geffen School Of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA, USA⁴.

La administración de L-arginina disminuye la presión arterial media (PAM), presumiblemente por el exceso de síntesis de óxido nítrico (ON). Sin embargo, algunos informes indican que la D-arginina, que no es sustrato de NO sintasa (NOS), también induce hipotensión. Para aclarar este fenómeno, fueron evaluados los efectos hemodinámicos de la L y D-arginina y su modificación por la inhibición de la NOS con L-nitroarginina metil éster (L-NAME). La PAM, el gasto cardíaco (GC), volumen sistólico (VS),

la frecuencia cardíaca (FC) y la resistencia vascular sistémica (RVS) fueron registradas en ratas Sprague-Dawley bajo anestesia de uretano o ketamina, con o sin bloqueo de la síntesis de ON por L-NAME. Los dos estereoisómeros de arginina indujeron una caída relacionada con la dosis en la PAM de magnitud y tiempo similar, pero la recuperación de la hipotensión fue más lenta con L que con D-arginina. La hipotensión inducida por ambos estereoisómeros fue debido a una disminución de la RVS con aumento del GC y el VS. La administración de L-NAME indujo un aumento pronunciado en la PAM y RVS, con la disminución del GC y de la FC. La infusión de L-arginina después de L-NAME disminuyó significativamente la PAM y RVS a la dosis más alta, mientras que la D-arginina no lo hizo. Después de L-NAME, la PAM fue significativamente menor con L-arginina que bajo D-arginina en todas las dosis. Estos experimentos sugieren un mecanismo doble en el efecto hipotensor de la L-arginina: una acción independiente de ON sobre la resistencia vascular, compartida con D-arginina, y un mecanismo dependiente de ON que se hace evidente con la presencia de la inhibición de la NOS con L-NAME. Los efectos cardíacos dependientes de ON no parecen desempeñar un papel importante en la hipotensión con L-arginina.

130. (352) IMPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES ADIPOSAS QUE SOBREENPRESAN VEGF EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA EXPERIMENTAL

Olea F.¹; Hnatiuk A.¹; Locatelli P.¹; De Lorenzi A.²; Valdivieso L.²; Ramírez R.¹; Rocha E.¹; Bercovich A.³; Laguens R.¹; Crottogini A.¹

Universidad Favaloro¹; Fundación Favaloro²; Bio Sidus³.

La enfermedad vascular periférica (EVP) es una dolencia invalidante sin tratamiento específico. Las células mesenquimales del tejido adiposo (ASCs) segregan citoquinas mitogénicas que actúan parácrinamente induciendo proliferación neovascular, por lo que se han propuesto como posible terapia. Hipotetizamos que en conejos con EVP la modificación génica de las ASCs para que sobreexpresen VEGF, cuyos efectos angio-arteriogénicos hemos demostrado previamente, potenciaría el efecto neovascularizante de las ASCs protegiendo contra lesiones musculares isquémicas. Métodos: Conejos con EVP experimental del miembro posterior izquierdo recibieron alogénicamente 10^6 ASCs transfectadas con un plásmido codificante para VEGF (Grupo ASC-VEGF, n=10), 10^6 ASC no transfectadas (Grupo ASC, n=10) o PBS 2 ml (Grupo placebo, n=10) en 10 inyecciones intramusculares. Por eco Doppler se midió velocidad sistólica pico (VSP) y velocidad diastólica (VD) en ambos miembros posteriores (MMPP) previo al tratamiento y a 30 días del mismo, y se calculó el cociente (VSP-VD)/VD como índice de conductancia vascular (ICV). El día 30 post-tratamiento se realizó angiografía de MMPP para calcular densidad de colaterales (DC), y luego se sacrificó a los animales para toma de muestras del aductor, gastrocnemio y cuádriceps de ambos MMPP. Resultados: La VSP sólo aumentó en el grupo ASC-VEGF (de $11,1 \pm 3,3$ a $23,4 \pm 19$ cm/seg²; $p < 0,05$, Media \pm DS, 2-way ANOVA-Bonferroni) mientras que el ICV aumentó tanto en ASC-VEGF (de $0,88 \pm 0,33$ a $2,77 \pm 1,63$) como en ASC (de $0,79 \pm 0,44$ a $2,55 \pm 2$; ambos $p < 0,05$). Sólo el grupo ASC-VEGF mostró una DC mayor a la del placebo ($5,6 \pm 1,1$ vs. $4,5 \pm 0,6$ vasos/cm², $p < 0,04$). El% de muestras musculares patológicas fue menor ($p < 0,05$; Fisher's test) en ASC (17%) y ASC-VEGF (19%) que en placebo (40%). Conclusión: En conejos con EVP, las ASC-VEGF mejoran la hemodinamia y la colateralización más que las ASC. Sin embargo, ambos tratamientos protegen en igual medida contra las lesiones musculares isquémicas.

131. (415) ROL DE TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES EN CORAZONES DE RATAS HIPERTIROIDEAS EXPUESTAS A ISQUEMIA-REPERFUSION: ESTUDIO MECANICO-ENERGETICO

Ragone M.¹; Colareda G.¹; Bonazzola P.²; Consolini A.¹
Cátedra Farmacología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata¹; Instituto de Investigaciones Cardiológicas

"Prof. Dr. Alberto C. Taquini" (ININCA)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

El hipertiroidismo (HpT) mejoró la recuperación contráctil post-isquémica (RCPI) y la economía (Eco) en corazones de rata atontados por isquemia/reperfusión (I/R). El mNCX es esencial en HpT pues su bloqueo por clonazepam (Clzp) redujo la RCPI y la Eco con contractura diastólica (+ Δ LVEDP), mientras en eutiroides (EuT) no afectó. El objetivo actual fue determinar si el bloqueo del mNCX afecta el contenido sarco-reticular de Ca^{2+} y/o dispara la apertura del mPTP en HpT, y cuál es el rol del uniporter (UCam). Las ratas HpT se obtuvieron por inyección SC de $20 \mu\text{g/kg/día}$ de T3 durante 15 días. Los corazones de HpT y EuT se perfundieron en un calorímetro a 37°C . Se evaluó simultáneamente la RCPI (P) y el flujo de calor total (Ht) (% de preisquémicos) y la presión diastólica (LVEDP) durante una I de 20 min y R de 45 min. Para evaluar si Clzp afecta el contenido de Ca^{2+} del RS en I/R, se reperfundió con Krebs-10 mM cafeína-36 mM Na^+ y se midió el área bajo la curva (ABC) de contractura (LVP) y de Ht. Clzp $10 \mu\text{M}$ no alteró P previo a I/R pero redujo el ABC-LVP a un 60% en HpT y Eu. En cardiomiocitos de HpT cargados con Rhod-2 para microscopía confocal Clzp aumentó la F/Fo en $+0.037 \pm 0.005$. Para evaluar si Clzp activa el mPTP se perfundió ciclosporina A (CysA $0.2 \mu\text{M}$) antes y durante R: en los HpT revirtió la caída de RCPI por Clzp desde 13.4 ± 4.1 a $74.7 \pm 9.9\%$ ($p < 0.001$), mejoró la Eco y redujo la $+\Delta$ LVEDP desde $+55.4 \pm 11.9$ a -1.3 ± 1.4 mm Hg ($p < 0.001$); en los EuT la CysA no modificó RCPI ni Ht% pero aumentó LVEDP. Para evaluar el rol del UCam se pretrataron los corazones con el bloqueante Ru360 $1 \mu\text{M}$: en HpT y Eu se redujo la RCPI al 10% y la Eco, y aumentó la $+\Delta$ LVEDP. Los resultados sugieren que: a) el mNCX regula el contenido de Ca^{2+} del RS en la R de HpT y Eu; b) la apertura del mPTP determina el efecto deletéreo de Clzp en HpT; c) la actividad del UCam es esencial para la RCPI de HpT y EuT en I/R. *Becaria Post-doctoral CONICET; Subsidios: UNLP-2009-2016 y CONICET-PIP-00213-11.

132. (417) LA ASOCIACIÓN FUNCIONAL DE LA ADENILATO CICLASA SOLUBLE (SAC) Y EL COTRANSPORTADOR SODIO/BICARBONATO (NBC) CONFORMA UNA SIMBIOSIS REGULADORA DE LA CONTRACTILIDAD BASAL CARDÍACA

Ciancio M.; Orlowski A.; De Giusti V.; Aiello A.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata.

La adenilato ciclasa (AC) es la molécula efectora de uno de los sistemas más importantes de señalización intracelular, ya que el producto de esta enzima, el AMP cíclico (cAMP), modula el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo celular de los diferentes organismos, desde bacterias hasta mamíferos. La AC mejor estudiada es la que se encuentra en la membrana plasmática (mAC), que está acoplada mediante la proteína Gs a diversos receptores de mensajeros extracelulares. La activación de estos receptores en el miocito cardíaco conduce a la activación de la proteína quinasa A (PKA) por cAMP, que entre otros efectos, induce un aumento de la contractilidad. En los últimos años se ha identificado una fuente adicional de cAMP, la AC soluble (sAC), cuya actividad es regulada por el anión bicarbonato (HCO_3^-). La función de sAC en el miocardio es desconocida. En nuestro laboratorio investigamos desde hace varios años el rol del cotransportador Na^+/HCO_3^- (NBC) en el corazón, mecanismo que promueve el co-influjo de estos iones al miocito, constituyendo la principal fuente de HCO_3^- intracelular. El objetivo de este trabajo fue el estudio de la posible relación entre la actividad del NBC y la sAC y su potencial impacto en la contractilidad miocárdica. Se utilizaron miocitos ventriculares de rata en los que se midió acortamiento celular con un detector de bordes. M) produjo un efecto inotrópico. El bloqueante del NBC S0859 (10 negativo en presencia de HCO_3^- extracelular (Control: $19.1 \pm 3.2\%$ vs. S0859: $14.6 \pm 2.6\%$; $n=9$, $p < 0.05$) que no se observó en ausencia del buffer fisiológico (buffer HEPES: Control: $21.8 \pm 2.9\%$ vs. S0859: $21.3 \pm 2.9\%$; $n=7$). Este efecto inotrópico negativo M; KH7; μM fue cancelado por el inhibidor selectivo de la sAC KH7 ($11.3 \pm 0.9\%$

vs. KH7+S0859: $11.1 \pm 0.9\%$, $n=5$). KH7 *per se* produjo una disminución de la contractilidad solo en presencia de HCO_3^- (HCO_3^- : Control: $15.7 \pm 0.7\%$ vs. KH7: $11.3 \pm 0.9\%$, $n=5$, $p < 0.05$; HEPES: Control: $14.3 \pm 0.6\%$ vs. KH7: $14.2 \pm 0.6\%$, $n=4$). En experimentos paralelos se midió simultáneamente el acortamiento sarcomérico y las variaciones del calcio intracelular mediante epifluorescencia. En estos experimentos, el efecto inotrópico negativo del S0859 se asoció a una disminución del transitorio de calcio intracelular, que disminuyó $18.5 \pm 2.6\%$, $n=5$, $p < 0.05$. En conjunto estos resultados sugieren por primera vez que la sAC juega un rol preponderante en el mantenimiento de la contractilidad basal cardíaca y que depende para su actividad del influjo de HCO_3^- generado por el NBC.

133. (435) PARTICIPACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LOS EFECTOS CARDIOPROTECTORES DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN CORAZONES SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Vélez D.¹; Barreda Frank M.¹; Hermann R.¹; Savino E.^{1,2}; Varela A.^{1,2}; Prendes M.^{1,2}

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET².

El preconditionamiento isquémico (PCI) es una de las intervenciones más poderosas que disminuye el daño por isquemia-reperfusión. Muchas son las señales moleculares involucradas en las acciones protectoras del mismo. Anteriormente pudimos demostrar que la wortmanina (W.) inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), anulaba los efectos beneficiosos del PCI. El objetivo del siguiente trabajo fue investigar la participación de la autofagia (AF) en la cardioprotección ejercida por el PCI. La AF es un proceso dinámico y programado, que bajo condiciones fisiológicas se encuentra implicado en el recambio de organelas y proteínas. Es considerado un proceso de adaptación celular ante la disminución de nutrientes extracelulares o de metabolitos intracelulares. Se trabajó con corazones perfundidos Langendorff provenientes de ratas Wistar hembras (250-300g de peso corporal) alimentadas *ad libitum*. El PCI consistió en 4 ciclos de isquemia-reperfusión de 5 min de duración cada uno, antes de la isquemia sostenida. Se empleó W (100 nM) en el medio de perfusión 5 min antes del PCI. Los corazones fueron sometidos a 25 min de isquemia y 60 min de perfusión. Se evaluó la magnitud de la AF mediante la relación de LC3II/LC3I y el flujo autofágico mediante la desaparición de p62, a los 30 y a los 60 min de perfusión. Se realizaron microscopías electrónicas a los mismos tiempos para evaluar el daño mitocondrial. La estadística se hizo con ANOVA ($n=6/\text{grupo}$). Las microscopías electrónicas mostraron mayor conservación mitocondrial en el grupo sometido a PCI, mientras que los otros grupos presentaron mayor separación entre las crestas y aclaramiento mitocondrial. La relación LC3II/LC3I fue mayor en el grupo PCI ($p < 0.05$ vs C, C+W, PCI+W), como así también fue mayor la desaparición de p62 ($p < 0.05$ vs C, C+W, PCI+W). Los resultados sugieren que el PCI podría en parte disminuir el daño por isquemia-reperfusión minimizando el deterioro mitocondrial y promoviendo la AF.

134. (527) LOS CAMBIOS EN LAS CONDICIONES DE CARGA PRODUCIDOS POR LA ESTIMULACIÓN VAGAL MODIFICAN EL TAMAÑO DE INFARTO DE MIOCARDIO A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN SIMPÁTICO-PARASIMPÁTICO

Buchholz B.¹; Donato M.¹; Rey Deutsch A.¹; Goyeneche M.; Garmendia C.¹; Höcht C.²; Del Mauro J.²; Rodríguez M.¹; Gelpi R.¹

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

En un trabajo previo describimos que la estimulación vagal aumenta el tamaño del infarto (TI) por co-activación simpática. El objetivo actual fue determinar si la estimulación vagal produce cambios hemodinámicos (incremento de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo y de la presión auricular) capaces

de activar reflejos simpáticos compensadores responsables de un aumento en el TI. Un segundo objetivo fue determinar si la estimulación, aplicada en forma intermitente, evita los cambios hemodinámicos y reduce el TI. En conejos se realizó: a) isquemia miocárdica regional de 30 min y 3 hs de reperusión (I/R; $n=10$); b) estimulación continua pre-isquémica del nervio vago derecho durante 10 min (EV; $n=7$); c) se repitió el protocolo anterior, pero con el nervio vago derecho seccionado a nivel cervical (EV/SD; $n=11$); d) estimulación vagal derecha eferente previa vagotomía bilateral (EV/SB; $n=7$); e) se repitió el protocolo del grupo EV/SD pero con el corazón marcapaseado (EV/SD+MCP; $n=6$); f) se aplicó estimulación vagal derecha intermitente (10" ON/50" OFF) (EV/Int; $n=13$). La estimulación vagal incrementa el TI en los grupos EV ($70.7 \pm 4.3\%$) y EV/SD ($68.6 \pm 4.1\%$) comparado con el grupo I/R ($52.0 \pm 3.7\%$) ($p < 0.05$). Este efecto deletéreo fue abolido con la vagotomía bilateral (EV/SB), $43.3 \pm 5.1\%$ y con el marcapaseo (EV/SD+MCP), $43.5 \pm 2.1\%$. La estimulación intermitente redujo el TI a $29.8 \pm 3.0\%$ ($p < 0.05$). La estimulación continua induce bradicardia que incrementa los diámetros y las presiones de las cavidades cardíacas, y las catecolaminas plasmáticas. La deaferentación vagal abole este efecto, y el marcapaseo o la estimulación intermitente las disminuyen. Conclusión: La estimulación vagal induce bradicardia, modifica las condiciones de carga del ventrículo izquierdo y la presión auricular, y en consecuencia activa aferencias vagales que provocan co-activación simpática refleja incrementando el TI. La estimulación intermitente antagoniza el simpático y reduce el TI.

135. (529) EFECTO DEL CONSUMO DE ACEITE DE CHIA (SALVIA HISPÁNICA) EN UN MODELO DE HIPERCOLESTEROLEMIA

Sierra L.¹; Roco J.²; Pérez Abraham A.²; Alarcon G.²; Peral De Bruno M.¹; Jerez S.¹

Laboratorio de Fisiología Vascul, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO)-CONICET, Universidad Nacional de Tucumán¹; Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán².

Objetivos: Analizar efecto del consumo de aceite de chia (rico en ácidos grasos omega 3) sobre el perfil lipídico, la tolerancia a la glucosa y la función vascular en arterias aisladas de conejos hipercolesterolémicos. **Métodos:** Conejos machos fueron alimentados con dieta control (DC), adicionada con aceite de Chia (DC-AC), adicionada con 1% colesterol (HC) y adicionada con 1% de colesterol (HC) mas aceite de Chia (HC+AC) durante 6 semanas y pesados semanalmente. Se realizaron test de tolerancia a la glucosa pre y post alimentación, mediciones de presión arterial, determinaciones de Colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos y glucemia en condiciones basales. La aorta torácica fue aislada y seccionada en anillos para registrar contracciones isométricas. La función endotelial se evaluó mediante la respuesta a acetilcolina ($\text{Ach } 10^{-8}$ - 10^{-5} M). La reactividad vascular se determinó mediante estimulación con KCl 100m M, fenilefrina 5.10^{-6} M, angiotensina II (10^{-9} - 10^{-6} M) o noradrenalina (10^{-8} - 10^{-5} M). **Resultados:** La dieta rica en aceite de chia no incrementó el peso ni modificó significativamente los valores lipídicos, sin embargo produjo: A) Intolerancia a la glucosa (mg/dl), DC-AC Basal: pre 124 ± 6 vs post 127 ± 2 ; 120': pre 143 ± 4 vs post 185 ± 6 ; HC-AC, Basal: pre 113 ± 13 vs post 124 ± 6 ; 120': pre 148 ± 7 vs post 182 ± 22 ; $p < 0.05$, ANOVA. B) Mejora de la relajación a Ach en conejos con dieta HC (%) 40 ± 3 vs 27 ± 3 , $p < 0.05$, $n=8$. C) Disminución en la respuesta máxima a Ang II (mg): DC: 3512 ± 680 , DC-AC: 3464 ± 447 , DH: 5330 ± 388 , DH-AC: 2235 ± 419 ; $p < 0.05$, ANOVA. En conclusión el consumo de aceite de chia mejorará levemente la función vascular deteriorada por la hipercolesterolemia aumentando la vasorelajación y disminuyendo la respuesta a Ang II. Sin embargo la intolerancia a la glucosa constituye un efecto no deseado que podría deteriorar la función vascular a largo plazo.

136. (538) ESTRÉS OXIDATIVO Y RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA LUEGO DE UNA EXPOSICIÓN AGUDA A PARTÍCULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Marchini T.¹; Magnani N.¹; Paz M.²; Vanasco V.¹; Tasat D.³; Gonzalez Maglio D.²; Alvarez S.; Evelson P.¹

Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín³.

La exposición a partículas de contaminación ambiental (MP) se encuentra asociada a incrementos en la morbilidad y mortalidad por diversas afecciones cardiopulmonares. El estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria sistémica han sido señalados como participantes fundamentales en los mecanismos de daño observados luego de la inhalación de MP. El objetivo del presente trabajo fue evaluar dicha hipótesis, en un modelo *in vivo* de exposición aguda a MP. Una suspensión de partículas derivadas de la combustión del petróleo (Residual Oil Fly Ashes, ROFA) fue administrada a ratones Swiss hembras mediante instilación intranasal (1,0 mg/kg peso corporal). Las mediciones se realizaron en muestras de plasma, obtenidas a las 3 h del tratamiento. Se evaluó el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de carbonilos, así como la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), por técnicas colorimétricas; los niveles de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y ácido ascórbico por HPLC; y el perfil de citoquinas por ELISA. En ratones expuestos a ROFA, se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) en el contenido de TBARS y carbonilos en plasma en un 19% y 12%, respectivamente. En este grupo, los niveles plasmáticos de GSH disminuyeron un 27% y los de GSSG aumentaron un 42% con respecto al control, llevando así a una disminución en la relación GSH/GSSG del 50% (control: 10,6; $p < 0.05$). La actividad de SOD y el contenido de ácido ascórbico disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) en un 29% y 38%, respectivamente, en el grupo expuesto a ROFA. Estos cambios fueron acompañados de incrementos significativos ($p < 0,001$) en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias (TNF- α and IL-6). Los resultados muestran que la exposición aguda a ROFA produce en ratones estrés oxidativo e inflamación sistémica, lo que podría relacionarse con los efectos cardiopulmonares adversos observados luego de la exposición a MP.

137. (548) LA RESPUESTA A CALCIO DE LOS RECEPTORES DE RYANODINA CARDIACOS ES MODIFICADA EN FORMA REVERSIBLE POR EL ESTADO REDOX

Donoso P.; Finkelstein J.; Montecinos L.; Sánchez G.; Bull R.
Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Los receptores de ryanodina (RyR) son los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (RS) que gatillan la contracción muscular. En el corazón, su apertura está regulada por la corriente de entrada de calcio durante el potencial de acción. Los canales RyR incorporados en bicapas planas responden a calcio citoplasmático en forma dependiente de su estado de oxidación. No se sabe si la actividad de los RyR responde a cambios redox en el corazón completo y el propósito de este trabajo fue investigar si un estrés oxidativo moderado del corazón, produce cambios reversibles en la respuesta a calcio de estos canales. Para ello se perfundieron corazones aislados de rata mediante la técnica de Langendorff y se aislaron vesículas enriquecidas en RS de corazones controles y luego de una isquemia global de 5 minutos seguido de 1 minuto de reperfusión. Encontramos que los RyR aislados de corazones controles presentan 3 diferentes respuestas frente a calcio: activación baja (33,3% de los canales), moderada (59%) o alta (7,7%). En contraste, un solo episodio de 5 minutos de isquemia seguido de 1 minuto de reperfusión aumentó al doble la actividad de NOX2 y disminuyó la frecuencia de canales de baja actividad a un 11% y aumentó la de canales de alta actividad a un 37%. La perfusión con apocinina previo a la isquemia previno completamente este cambio en la respuesta de los canales. Asimismo, el cambio fue revertido al extender la reperfusión después de la isquemia a 15 minutos. La activación *in vitro* de NOX2 produjo un cambio similar a la isquemia en la actividad de los canales incorporados en bicapas y aumentó la velocidad de liberación de calcio de vesículas de RS; la inclu-

bación posterior de las vesículas de RS con glutaredoxina o la adición de DTT a la bicapa revirtió completamente estos efectos. Los resultados indican que la respuesta de los RyR al calcio es modulada reversiblemente en el corazón intacto por el estado redox. Fondecyt 1110257 y 1130407.

138. (675) LA REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA 1 DEL INTERCAMBIADOR NA⁺/H⁺ MITOCONDRIAL (NHE1MT) CONTRIBUYE AL REMODELAMIENTO FUNCIONAL EN MITOCONDRIAS DE CORAZONES HIPERTRÓFICOS

Vargas L.; Álvarez B.
Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata.

Introducción: La disfunción mitocondrial subyace a la causa de numerosas enfermedades cardíacas, como la hipertrofia cardíaca descompensada, el daño isquémico y la insuficiencia cardíaca. La alteración mitocondrial se caracteriza por la apertura irreversible del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM), hinchamiento mitocondrial (HM) y su posterior muerte. Recientemente, caracterizamos la expresión de la isoforma 1 del intercambiador Na⁺/H⁺ en mitocondrias aisladas de músculo cardíaco (NHE1mt), demostrando que su inhibición protege a las mitocondrias cardíacas del HM inducido por sobrecarga de Ca²⁺ y de la apertura del PTPM. **Objetivo:** Estudiar la participación de NHE1mt en procesos de disfunción mitocondrial en corazones hipertrofiados (CH). **Diseño de estudio:** Se utilizaron ratas Wistar como control de corazón normal (CN) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) como modelo de CH, ambas cepas adultos jóvenes de ~3 meses de edad. **Metodología:** Se aislaron mitocondrias de CN y CH por homogeneización y centrifugación diferencial. El HM en mitocondrias se midió como la disminución de la dispersión de luz inducida por la adición de 200 μ M de CaCl₂ y se calculó como la diferencia entre los valores antes y después del agregado de Ca²⁺. La expresión de NHE1mt en lisados de CN y CH se analizaron mediante inmunoblot. **Resultados:** Los cocientes peso corazón/peso corporal obtenidos fueron 2.8 \pm 0.2 para rata normal y 3.8 \pm 0.2 para rata hipertrofica (n=12, P<0.05). La mitocondria de CH mostró una significativa reducción del HM comparado con mitocondria de CN, 53 \pm 7% y 100 \pm 9%, respectivamente (n=5, P<0.05). Los inmunoblots revelaron una reducción en la expresión de NHE1mt en CH comparado con CN (~40% de reducción, n=5). **Conclusión:** La disminución de la expresión del NHE1mt que fue acompañada por un aumento en el umbral de la apertura del PTPM podría ser la manifestación de un mecanismo protector endógeno que participa en el remodelamiento funcional de las mitocondrias del CH.

139. (744) CAMKII Y EIF4E ESTÁN INVOLUCRADOS EN LAS ARRITMIAS POR ENVEJECIMIENTO DE DROSOPHILA MELANOGASTER

Santalla M.^{1,2}; Harnichar E.¹; Valverde C.¹; Mattiazzi A.¹; Ferrero P.^{1,2}
Centro de Investigaciones Cardiovasculares; Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires¹; Centro De Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata².

Drosophila melanogaster se ha convertido en un nuevo modelo para el estudio de enfermedades cardiovasculares, ya que existe gran homología entre sus genes cardíacos y los de mamífero. Además, la respuesta funcional del corazón ante el envejecimiento es similar a la observada en humanos. Nos propusimos estudiar mecanismos subyacentes a la generación de arritmias observadas con la edad. Específicamente quisimos determinar si la quinasa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina (CaMKII) y el factor de inicio de la traducción eucariota eIF4E, pueden actuar como moléculas arritmogénicas en el corazón de *Drosophila*. Utilizamos una línea transgénica que contiene un sistema reportero fluorescente, que detecta aumentos transitorios de Ca²⁺_i (Control, C). Mediante este sistema novedoso, no basado en medidas morfológicas, observamos en preparados semi-intactos, los aumentos de Ca²⁺_i. Para evaluar la acción de CaMKII y de eIF4E sobre la función cardíaca,

cruzamos esta línea con cepas transgénicas con inhibición de estas proteínas. Moscas C entre 70-80 días mostraron reducción de la frecuencia cardíaca comparadas con moscas C de 7 días y un aumento de la dispersión de los periodos cardíacos (Intervalo de tiempo entre dos picos del transitorio de Ca^{2+} , PC). El índice de arritmias (IA, desviación estándar del PC) se incrementó de 0.27 ± 0.02 a 0.60 ± 0.14 ($n=12$), $P < 0.05$. En moscas de 7 días, la inhibición de CaMKII, redujo la dispersión de los PC y el IA de 0.27 ± 0.02 a 0.16 ± 0.04 ($n = 18$), $P < 0.05$. Niveles reducidos de eIF4E provocaron un efecto similar sobre la dispersión de los PC y redujeron el IA de 0.27 ± 0.02 a 0.08 ± 0.01 ($n=13$), $P < 0.05$. Los resultados indican que: CaMKII es una molécula arritmogénica, como lo es en mamíferos. De modo destacable, el factor eIF4E participa en la génesis de arritmias independientemente de su función canónica como factor de traducción, transformándolo en un nuevo candidato para ser considerado en la fisiopatología de las arritmias del corazón de mamífero.

140. (831) PARTICIPACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR INHIBITORIO GABA EN EL EFECTO HIPOTENSOR DE LA ADRENALINA ADMINISTRADA A NIVEL ESPINAL EN RATAS ANESTESIADAS

Celuch S.; García M.

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Observamos previamente que la administración intratecal (it) de adrenalina (ADRE) en ratas anestesiadas producía un efecto hipotensor, el cual era prevenido por bloqueo de receptores del ácido gama-aminobutírico ($GABA_A$ y $GABA_B$) espinales. El efecto bloqueante de antagonistas de receptores GABA también fue observado en relación con otros neurotransmisores y neuromoduladores espinales hipotensores, como son el óxido nítrico, el endocanabinoide anandamida y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, sugiriendo una posible participación del GABA espinal en mecanismos regulatorios de la presión arterial. Con el fin de investigar esta posibilidad, en este trabajo se analizó si, en ratas macho Sprague-Dawley anestesiadas con pentobarbital, la respuesta hipotensora inducida por ADRE (30 nmol, it) era modificada por drogas que afectan la concentración tisular de GABA y su disponibilidad frente a los receptores. El efecto hipotensor de ADRE (-22.5 ± 4.2 mmHg, $n=4$) no fue modificado por inhibición de la recaptación de GABA con ácido nipecótico ($2.3 \mu\text{mol}$, it; $n=3$) ni por inhibición de la enzima de degradación GABA transaminasa con ácido aminooxiacético (30 mg/kg , iv; $n=5$). En cambio, la respuesta a ADRE fue antagonizada por el inhibidor de la síntesis de GABA ácido 3-mercaptopropiónico (60 mg/kg , ip) (Δ presión arterial media = -5.7 ± 3.0 mmHg; $n=5$, $p < 0.05$ vs control). Este resultado apoya la hipótesis de la participación del GABA en el efecto hipotensor de la ADRE espinal. La observación que drogas que favorecen la disponibilidad de GABA frente al receptor no hayan modificado la respuesta a ADRE podría sugerir que la dosis de ADRE ensayada estimula al máximo la neurotransmisión GABAérgica espinal.

GASTROENTEROLOGÍA 1

141. (101) CONCENTRACIONES FISIOLÓGICAS DE BILIRRUBINA NO CONJUGADA (BNC) PREVIENEN LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO (EO) EN EL HÍGADO AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA (HAPR)

Basiglio C.^{1,2}; Toledo F.¹; Arriaga S.²; Boaglio A.¹; Ochoa J.¹; Sánchez Pozzi E.¹; Mottino A.¹; Roma M.¹

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET¹; Área Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario².

En duplas de hepatocitos, demostramos que el agente pro-oxidante modelo *tert*-butilhidropéroxido (tBOOH) produce internalización endocítica de transportadores canaliculares responsables de la formación de bilis (Bsep y Mrp2), por alteración del citoesqueleto

de actina. La bilirrubina, considerada actualmente un importante antioxidante endógeno, podría limitar la colestasis por EO, como lo sugieren resultados *in vitro* de nuestro grupo. El presente trabajo tiene como objetivo confirmar la capacidad de BNC para limitar las alteraciones de la función secretora biliar inducidas por tBOOH en el HAPR, un modelo que mantiene la integridad del órgano intacto. Se evaluaron cambios temporales en: a) la relación entre glutatión oxidado (GSSG) y total (oxidado+reducido, GSHT) en bilis; b) el flujo biliar; c) la excreción biliar del sustrato de Bsep taurocolato (TC) y d) la excreción biliar del sustrato de Mrp2 dinitrofenil glutatión (GS-DNP). En tejido hepático, se evaluó por microscopía confocal la localización de Bsep y Mrp2 y del citoesqueleto de actina, por doble tinción con anticuerpos primarios y secundarios fluorescentes (para Bsep y Mrp2) y faloidina-Alexa Fluor 568 (para actina). tBOOH indujo un aumento agudo y transitorio en la relación GSSG/GSHT ($+167 \pm 28\%$) y una disminución abrupta del flujo biliar ($-71 \pm 3\%$), así como de la excreción de TC ($-46 \pm 12\%$) y de GS-DNP ($-130 \pm 37\%$). La pre-perfusión con BNC ($17 \mu\text{M}$) previno todas estas alteraciones ($p < 0.05$; $n=4$). BNC previno casi completamente la desorganización del citoesqueleto de actina y la internalización endocítica de Bsep y Mrp2 inducidas por tBOOH. Concluimos que la acción antioxidante de concentraciones fisiológicas de BNC contrarrestan la alteración de la función secretora biliar producida por EO, manteniendo la integridad del citoesqueleto y, consecuentemente, la localización de los transportadores canaliculares, lo cual podría contribuir a limitar la progresión de hepatopatías colestásicas que cursan con EO.

142. (216) PAPEL DE GALECTINA-1 EN LA REGULACIÓN DEL VOLUMEN DE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

Carabias P.; Bacigalupo M.; Manzi M.; Troncoso M.; Espelt M.

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La homeostasis del volumen celular es fundamental para el normal funcionamiento de las células. La exposición de hepatocitos y células de hepatoma a medios hipotónicos induce el aumento del volumen celular seguido de la pérdida de iones y agua provocando la disminución regulatoria del volumen (RVD) que tiende a restaurar los valores de volumen a niveles control. Dicha pérdida de iones dependería de la activación de integrinas, descriptas como osmosensores celulares. Galectina-1 (Gal1), proteína que une β -galactósidos, posee diversas funciones en la biología tumoral y modula la respuesta inmune. En células de músculo liso Gal1 interacciona y activa la integrina β_1 . En células de glioma, controla la localización celular de dicha integrina, regulando la migración celular. En el carcinoma hepatocelular (HCC) Gal1 se encuentra sobreexpresada. Previamente demostramos que Gal1 modula la adhesión de células de HCC HepG2 a través de integrinas α_1 , α_2 , α_3 , α_V y β_1 . Dado que en hepatocitos las integrinas además de su función en la adhesión, serían osmosensores, nuestro objetivo fue investigar el rol de Gal1 en la regulación del volumen de hepatocitos tumorales. Utilizando microscopía de epifluorescencia en células cargadas con calceína-AM observamos que células que sobreexpresan Gal1 (HepG2-Gal1) en medio hipotónico presentaron un RVD de $30.6 \pm 6.22\%$ a los 40 min (RVD40) con respecto al control (65.6 ± 4.44 , $p < 0.001$). En presencia de lactosa, un inhibidor de galectinas, el RVD40 de las células HepG2-Gal1 fue similar al control (60.6 ± 5.60 vs 66.5 ± 13.85). Mediante Western blot observamos una disminución de la forma activa completamente glicosilada de la integrina β_1 (120 kDa 79.28%) y un aumento de la forma precursora parcialmente glicosilada (99 kDa 232.88%) en las células HepG2-Gal1 respecto a las células control. Estos resultados indicarían que Gal-1 no solo inhibiría el RVD en células HepG2, sino que afectaría los niveles de la forma activa de la integrina osmosensora β_1 .

143. (222) LA TRANSFERENCIA GÉNICA DE AQUAPORINA-1 HUMANA (HAQP1) A HÍGADO DE RATA ATENUA LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRÓGENOS

Marrone J.; Lehmann G.; Soria L.; Molinas S.; Marinelli R. *Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.*

Nuestros estudios publicados indican que la expresión deficiente de aquaporinas (AQPs) en la membrana del canalículo biliar del hepatocito y la consecuente disminución de la permeabilidad canalicular al agua, contribuyen como mecanismo molecular determinante en la falla secretoria biliar de ratas tratadas con 17 alfa-etinilestradiol (EE). La hipótesis del presente trabajo es que un aumento de la permeabilidad canalicular al agua mediada por AQPs puede atenuar la colestasis por EE. Previamente comprobamos por inmunohistoquímica, inmunofluorescencia confocal e inmunoblotting que la administración retrobiliar del vector adenoviral AdhAQP1 a ratas EE indujo la expresión canalicular de hAQP1 en hepatocitos y un marcado incremento en la permeabilidad canalicular al agua determinada por espectrofotometría de *stopped flow*. Los presentes estudios indican que la administración de AdhAQP1 a ratas EE incrementó aprox. 50% ($P < 0,05$) el flujo biliar basal ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ peso): EE+AdhAQP1: $7,7 \pm 0,5$; EE+vector control: $5,1 \pm 0,4$; valor normal: $9,8 \pm 0,2$ y aprox. 70% ($P < 0,05$) el flujo biliar estimulado por sales biliares (SB) ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ peso): EE+AdhAQP1: $9,5 \pm 0,4$; EE+vector control: $5,6 \pm 0,5$; valor normal: $12,1 \pm 0,3$. Las ratas EE tratadas con AdhAQP1 normalizaron la significativamente disminuida eficiencia colerética de las SB (ml bilis/mmol SB excretada) estimada por administración de taurocolato (EE+AdhAQP1: $5,9 \pm 0,9$; EE+vector control: $2,5 \pm 1,0$; valor normal: $5,1 \pm 0,4$) o por depleción del pool endógeno de SB interrumpiendo la circulación enterohepática (EE+AdhAQP1: $10,3 \pm 0,8$; EE+vector control: $7,0 \pm 0,6$; valor normal: $10,4 \pm 0,7$). **Conclusión:** la transferencia adenoviral del gen de hAQP1 a hígado de rata induce la expresión canalicular de hAQP1 y un aumento de la permeabilidad al agua, esto produce una mayor eficiencia colerética de las sales biliares excretadas atenuando significativamente la colestasis inducida por estrógenos.

144. (299) EL ÁCIDO URSODEOIXICÓLICO PREVIENE LOS EFECTOS INHIBITORIOS DEL DEOXCILATO DE SODIO SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO

Rodríguez V.; Rivoira M.; Marchionatti A.; Pérez A.; Tolosa de Talamoni N.

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Biología Celular (INICSA)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba.

Previamente en nuestro laboratorio se demostró que el deoxicolato de sodio (DXCS) inhibe la absorción intestinal de Ca^{+2} . El objetivo de este trabajo fue determinar si el ácido ursodeoxicólico (UDCA) tendría capacidad de bloquear la respuesta inhibitoria del DXCS. Se utilizaron pollos de 4 semanas de edad: 1) controles, 2) tratados con DXCS (10 mM), 3) tratados con UDCA (60 $\mu\text{g}/100$ g peso corporal) y 4) tratados con UDCA+DXCS. La absorción de calcio se midió por la técnica del asa intestinal ligada *in situ*. En mucosa duodenal se analizó la expresión la génica por RT-qPCR y proteica por Western blot de Ca^{+2} -ATPasa (PMCA_{1b}), intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX1), calbindina D_{28k} (CB) y el receptor de vitamina D (VDR). Se midieron por espectrofotometría las actividades de catalasa y superóxido dismutasa (SOD), el contenido de grupos carbonilos y de glutatión, y los cambios en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. Los resultados se evaluaron mediante ANOVA a una vía, seguido del test de Bonferroni. UDCA incrementó la absorción intestinal de Ca^{+2} mientras que el tratamiento conjunto evitó el efecto inhibitorio producido por DXCS sobre la absorción del catión. UDCA aumentó la expresión génica y proteica de PMCA_{1b}, NCX1 y CB, y el tratamiento combinado impidió esta respuesta. UDCA y UDCA+DXCS incrementaron la expresión proteica del VDR. El DXCS disminuyó el contenido total de glutatión y aumentó el de grupos carbonilos y la actividad de SOD, efectos que fueron abolidos por UDCA. La alteración de la permeabilidad mitocondrial producida por DXCS se bloqueó con el tratamiento combinado. En conclusión, UDCA es un ácido biliar benéfico para la absorción intestinal de Ca^{+2} . Contrariamente,

DXCS inhibe dicha absorción mediante estrés oxidativo. El efecto estimulador del UDCA sobre la absorción intestinal de Ca^{+2} sería a través del aumento en la expresión génica y proteica de las moléculas involucradas en la vía transcelular de la absorción de Ca^{+2} .

145. (347) LA ADENILILCICLASA 6 ES RESPONSIBLE DE LOS EFECTOS DE LOS SECRETOGOGOS DEPENDIENTES DE AMP CÍCLICO A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE PKA EN CÉLULAS PANCREÁTICAS EXOCRINAS AISLADAS DE RATÓN

Sabbatini M.^{1,2}; Dalecy L.²; Lentz S.³; Tang T.⁴; Williams J.² *Department of Biological Sciences, Georgia Regents University¹; Dept Physiol, University of Michigan²; Department of Internal Medicine, University of Michigan³; Dept Medicine, University of California, VASDHS, USA⁴.*

Introducción: Las adenililciclasas (AC) son las encargadas de generar AMP cíclico (AMPc), un mensajero intracelular responsable de regular la función de numerosas células, incluidas las células exocrinas pancreáticas. Nueve isoformas de AC están asociadas a membranas. **Objetivo:** En este trabajo se estudió que isoforma de AC asociada a membranas es relevante en la función de las células exocrinas pancreáticas. **Resultados:** Se identificaron 5 isoformas, AC3, AC4, AC6, AC7 y AC9, en el páncreas, 4 de ellas se expresaron en los acinos pancreáticos aislados (AC3, AC4, AC6 y AC9), mientras que todas ellas se expresaron en los ductos pancreáticos aislados. En base a su regulación a través de señales intracelulares, AC6 parece cumplir un importante papel porque los segundos mensajeros PKA, PKC y calcio inhibieron la formación de AMPc estimulado por VIP, mientras que la calmodulina y la calcineurina no modificaron su respuesta. Los ratones con depleción genética de AC6 mostraron una reducción en la formación de AMPc y en la activación de PKA estimulados por VIP, secretina y forskolina en acinos y ductos pancreáticos aislados. La falta de AC6 redujo la liberación de amilasa estimulada por secretagogos dependientes de AMPc y anuló la secreción de fluido pancreático *en vivo* así como también en ductos pancreáticos aislados. **Conclusión:** Un número importante de isoformas de AC se expresan en acinos y ductos pancreáticos. De todas ellas la isoforma AC6 juega un papel importante en la regulación de la función de las células exocrinas pancreáticas.

GENÉTICA 1

146. (36) DETERMINACIÓN FÍSICA DE LA FASE HAPLOTÍPICA POR PCR INVERSA ALELO-ESPECÍFICA: SU APLICACIÓN A LA INVERSIÓN DEL INTRÓN 22 (INV22) Y EL STR (CA)_n DEL INTRÓN 21 DEL F8 EN FAMILIAS CON HEMOFILIA A (HA) SEVERA

Rossetti L.; Radic C.; Abelleyro M.; Marchione M.; Larripa I.; De Brasi C.

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina.

El estudio físico de haplotipos (marcadores en *cis*) se hace por PCR alelo-específica (de corta-larga distancia) o por análisis de los pares terminales de clones. Aquí presentamos una técnica nueva, *Physical Inverse-based Phasing* (PIP), capaz de determinar la fase entre la INV22 y un STR (*short tandem repeat*) (CA)_n del intrón 21 del F8 en portadoras INV22*. PIP puede haplotipar en larga distancia (5-50kb) pares de marcadores tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*), STR y RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). La HA es una coagulopatía ligada al X causada por mutaciones en el F8. Casi la mitad de las HA severas tienen la INV22 causada por recombinación homóloga. Objetivos: validar y aplicar el método PIP INV22/F8Int21(CA)_n en familias con HA severa. Se estudiaron muestras de ADN leucocitario de 27 portadoras y 4 dúos (madre portadora-hijo afectado) INV22* por IS-PCR (*inverse shifting-PCR*) amplificando por separado el alelo normal (*primers* 22B+ID) y el INV22 (*primers* 22B+ED) en un producto que incluye al STR F8Int21(CA)_n; PCR anidada y electroforesis capilar para genotipar el alelo F8Int21(CA)_n ligado. De 27 portadoras

INV22* estudiadas, 18 (67%) fueron informativas para el STR. El abordaje PIP permitió genotipar la fase INV22/*F8Int21*(CA)_n en las 18 portadoras doble informativas. La validación del método PIP fue encarada en 4 dúos informativos (madre/hijo) comparando a ciegas el resultado del alelo *F8Int21*(CA)_n asociado a la INV22 obtenido por la técnica PIP en la madre con el obtenido directamente en el hijo hemocigota dando una perfecta correlación. Por ejemplo, la madre muestra el alelo de 167pb del *F8Int21*(CA)_n asociado a la INV22 y de 163pb al alelo normal por PIP y el hijo afectado muestra el alelo de 167pb. La técnica PIP permite el estudio físico directo de la portadora de HA para determinar la fase de la INV22 y el STR *F8Int21*(CA)_n evitando el análisis de ligamiento en el árbol familiar, y se proyecta con utilidad en otras áreas de la medicina genómica.

147. (110) NEUROLOGÍA GENÓMICA PERSONALIZADA: EL FUTURO ES AHORA

Córdoba M.; González Moron D.; Rodríguez-Quiroga S.; Kauffman M.

Consultorio y Laboratorio de Neurogenética, Hospital Ramos Mejía.

Introducción y objetivos: Las nuevas técnicas de secuenciación genómica masiva han revolucionado el diagnóstico de las enfermedades neurológicas. Sin embargo tienen limitaciones intrínsecas en su metodología, respecto a la validación de los resultados y al manejo de la información incidental. Nuestro objetivo general es ilustrar mediante la presentación de tres casos clínicos el abordaje diagnóstico de la patología neurológica desde la genómica. Para ello nos proponemos: explorar herramientas bioinformáticas de anotación e interpretación funcional de variantes, describir un algoritmo de análisis para los datos obtenidos del exoma y con estos resultados correlacionar en nuestros pacientes fenotipo-genotipo-vía funcional. **Material y métodos:** Fueron incluidos 3 pacientes que concurren a la consulta con síntomas neurológicos crónicos y progresivos. Secuenciamos el exoma en los tres. Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, utilizando un algoritmo de selección, se filtraron las variantes por frecuencia poblacional, patogenicidad y modelo de herencia. Se estableció la correlación funcional con el fenotipo en cada caso y finalmente se validaron las variantes candidatas por Sanger en los afectados y se buscó su segregación en familiares. **Resultados:** Se elaboraron algoritmos de aproximación diagnóstica genómica para cada caso. En el caso 1 se llegó al diagnóstico de Leucodistrofia asociada a POLR3A con las siguientes mutaciones *c.G3781A:p.E1261K* y *c.G3014A:p.R1005H*. En el caso 2 el diagnóstico probable fue de retraso mental sindrómico secundario a la mutación *c.C5937p.R198** en homocigosis para GRIK2. Y finalmente en el caso 3 la causa de paraparesia espástica hereditaria fue el haplotipo patogénico en heterocigosis compuesta *c.6763insA* y *c.6726A>T, p.Gln2242His* en SPG11. **Conclusiones:** La aproximación diagnóstica genómica en conjunto con una completa evaluación clínica resulta útil para el abordaje de la patología neurológica permitiendo una correlación fenotipo genotipo y vía funcional afectada arribando a un diagnóstico molecular sólido.

148. (242) ENSAYOS FUNCIONALES DE UNA VARIANTE DE SECUENCIA EN UNA REGIÓN REGULATIVA DE LA TRANSCRIPCIÓN DISTAL DEL GEN CYP21A2

Bruque C.¹; Fernández C.²; Pecci A.³; Dain L.¹

Centro Nacional de Genética Médica, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Centro Nacional de Genética Médica - ANLIS² Departamento de Química Biológica, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³.

Alrededor del 95% de los casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita se deben a la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa. En trabajos previos describimos la existencia de una variante A>G en una región regulatoria del gen CYP21A2 en tres pacientes con la deficiencia. Mediante ensayos funcionales *in vitro* demostramos que dicha variante provoca una disminución en la expresión del

gen. Asimismo análisis bioinformáticos indicarían un posible sitio de unión para el receptor de Glucocorticoides (GR) en presencia de la variante hallada. El objetivo de este trabajo es iniciar el estudio de los factores involucrados en la disminución de la expresión observada. Se transfectaron 2 líneas celulares de origen adrenal H295R y Y1 con 3 vectores: conteniendo la región promotora mínima (P), secuencias regulatoria salvaje (A) y mutada (G), clonadas río arriba del gen de luciferasa. Las células fueron cultivadas en presencia de suero entero (Se) o delipidado (Sd), con 10⁻⁸ y 10⁻⁷ de dexametasona (DEX) y con 10⁻⁸ y 10⁻⁹ de cortisol (C) en Sd y luego de 48 se midió la actividad de luciferasa. Resultados preliminares con Sd mostraron en ambas líneas celulares, una disminución en la expresión de luciferasa del vector conteniendo la región regulatoria salvaje y la mutada (valores relativos de expresión ± SEM H295R, Se P: 0,018±0,001; A: 1±0024; G: 0,46±0,016. Sd P: 0,011±0,001; A: 0,235±0,011; G: 0,148±0,005; p<0,001). Los tratamientos con DEX y C no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de luciferasa entre las construcciones A y G. Las diferencias observadas en presencia de Sd indicarían la posible modulación de algún factor lipídico en la expresión del gen CYP21A2, si bien no se observó reversión del efecto de la mutante por el agregado de DEX o C.

149. (351) EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NEURONAL SOX11 EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA. SU CORRELACIÓN CON FACTORES PRONÓSTICO

Roisman A.¹; Stanganelli C.²; Palau Nagore V.¹; Bezares R.³; Slavutsky I.¹

Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET¹; Patología Molecular, IHEMA, Academia Nacional de Medicina²; Servicio Hematología, Hospital Alvarez³.

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la forma más común de leucemia en adultos en Occidente. Los marcadores pronóstico disponibles no resultan suficientes para definir con certeza formas estables o progresivas de la enfermedad en estadios tempranos de la misma. El gen *SOX11* cumple un rol crítico en la neurogénesis embrionaria y el remodelado tisular; presenta expresión aberrante en diversas neoplasias linfoides, existiendo escasa información en LLC. En este estudio se analizó la expresión de *SOX11* mediante PCR en tiempo real en 44 pacientes con LLC (28 varones; edad media: 64 años, rango 38-83 años) y controles normales. El análisis del estatus mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGHV*) se realizó por RT-PCR y secuenciación. Se efectuó análisis cromosómico con bandejo G y FISH (fluorescence in situ hybridization). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. El análisis de *SOX11* mostró sobreexpresión en el total de los pacientes con LLC (0,105±0,03) respecto de los controles (0,004±0,0022). El 53% de los casos resultaron mutados (M) y el 47% no mutados (NM). Se observó mayor expresión de *SOX11* en los pacientes con *IGHV* NM (0,20±0,07) respecto de aquellos con *IGHV* M (0,02±0,008) (p<0,018), así como una correlación positiva entre los niveles de transcripto y el porcentaje de homología de *IGHV* (r=0,465; p=0,001). Los pacientes con baja expresión de *SOX11* mostraron una frecuencia significativamente mayor de delección 13q14 por FISH, relacionada a buen pronóstico (p=0,036), así como asociación con estadios clínicos iniciales de la enfermedad (p=0,037). A nivel citogenético, los casos con altos niveles de transcripto presentaron mayor proporción de desbalances cromosómicos con pérdida de material genético (p=0,004). Nuestros resultados indican asociación entre la expresión de *SOX11* y factores pronóstico de la LLC, sugiriendo a este gen como un probable marcador molecular en esta patología.

150. (422) DISGENESIA GONADAL XY COMPLETA (DGC XY): IDENTIFICACIÓN DE DOS MUTACIONES NOVELES EN EL GEN SRY

Fernández M.¹; Bruque C.¹; Granados P.¹; Nadra A.²; Luna M.¹; Alba L.¹

Centro Nacional de Genética Médica¹ Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

El gen SRY (Sex-determining Region) codifica para un factor de transcripción que inicia la cascada de la determinación testicular en mamíferos. La región codificante consta de un único exón e incluye el dominio conservado HMG (High Mobility Group), el cual es la región funcional de unión e interacción con el ADN. En el 10-15% de los pacientes con DGC XY se han identificado mutaciones inactivantes del SRY, la mayoría residen en el dominio HMG y han sido relacionadas con falla en el desarrollo gonadal. El objetivo de este estudio fue la búsqueda de mutaciones en el gen SRY en dos pacientes con cariotipo 46,XY, y características clínicas y de laboratorio compatibles con Síndrome de Swyer. El motivo de consulta en ambos casos fué amenorrea primaria y ausencia de caracteres sexuales secundarios. Se determinó la presencia del gen SRY, se realizó la secuenciación del mismo en ambas pacientes y en 150 hombres de población general a partir de ADN de leucocitos de sangre periférica. Se encontraron dos sustituciones noveles p.Y69C y p.Y74C, ambas en la región HMG-box. En hombres de población general, no se encontraron los cambios descriptos. Las sustituciones fueron analizadas con el programa *foldx3.0* para determinar los posibles efectos sobre la estabilidad proteica y/o la interacción entre la proteína SRY y su ADN blanco, sobre una estructura del complejo SRY-ADN obtenida mediante espectroscopía de RMN (PDB ID: 1HRY). Del análisis se desprende que la mutación p.Y69C estaría causando una desestabilización de la proteína ($\Delta\Delta G$ de $1.52 \pm 0,04$), mientras que la mutación p.Y74C estaría afectando el reconocimiento específico de SRY por la región HGM, sin desestabilizar significativamente la proteína. Se propone que las sustituciones encontradas, al interferir en la interacción del complejo SRY-ADN, interrumpirían el inicio de la cascada del desarrollo gonadal masculino y serían la causa del fenotipo observado.

151. (646) NUEVA GRAN DELECCIÓN EN EL GEN PBG-D EN UNA FAMILIA ARGENTINA CON PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

Cerbino G.; Gerez E.; Guolo M.; Battlle A.; Parera V.; Rossetti M.

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es un desorden genético, autosómico dominante, causado por una deficiencia parcial de la Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D), tercera enzima de la vía biosintética del hemo. La PAI es la más frecuente de las porfirias hepáticas agudas, presentando crisis neurológicas y neuroabdominales recurrentes e intensas, con riesgo de vida. Estos ataques están relacionados con un aumento de producción y excreción de ácido δ -aminolevulínico (ALA) y PBG. El diagnóstico preciso de PAI es crucial para la prevención de ataques agudos en individuos sintomáticos y asintomáticos. En este trabajo se analizó bioquímica y genéticamente una paciente con sintomatología clínica de PAI con el objetivo de confirmar el diagnóstico y determinar la mutación responsable del desencadenamiento de la porfiria. Se realizaron los estudios bioquímicos de rutina. Los resultados en orina fueron: ALA: 47,7 mg/24h (VN: 4mg/24h); PBG: 318 mg/24h (VN 2mg/24h); Porfirinas totales en orina: 2225 μ g/24h (VN: 250 μ g/24h). En sangre el valor de la PBG-D fue de 44,57 U/ml GR (VN: 81,51 \pm 11,96 U/ml GR). El diagnóstico genético se realizó por Long-PCR a partir de ADN aislado de linfocitos de sangre periférica en la paciente y 5 familiares. Los resultados del gel de agarosa revelaron la presencia de 2 fragmentos: uno de tamaño esperado de 5,5 kb y otro de 300 pb. Ambas bandas se purificaron y se secuenciaron automáticamente. Los pacientes que presentaron la doble banda mostraron una aparente homocigosis de 2 de los 6 SNPs variables en la población argentina. El fragmento de 300 pb contenía los extremos 5' y 3' del fragmento de 5,5 kb sugiriendo una delección de 5227 pb. La secuenciación directa del gen completo no mostró ninguna mutación. El estudio de sus familiares puso de manifiesto la ausencia de segregación mendeliana, confirmando dicha delección en el gen PBG-D.

152. (727) ANÁLISIS DE REGIONES SUBTELOMÉRICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE MLPA: DETECCIÓN DE MICRODELECIONES, MICRODUPLICACIONES Y REORDENAMIENTOS DESBALANCEADOS E IDENTIFICACIÓN DE CROMOSOMAS MARCADORES

Cantarella F.; Samara M.; Alanis R.; Espeche L.; Lopez S.; Moya G.; Ferreiro V.

Genos S.A.

El análisis de regiones subteloméricas por la técnica de MLPA (amplificación múltiple de sondas ligadas) consiste en una semicuantificación de productos de amplificación por PCR de sondas hibridizadas con secuencias específicas para cada una de las regiones subteloméricas. Presentamos cuatro casos pediátricos de edades que abarcan desde los dos meses hasta los dos años de vida. Se presentan con un amplio espectro clínico que incluye retraso del lenguaje o del crecimiento, cardiopatía congénita y dismorfias, entre otras. En dos de ellos el cariotipo resultó normal, uno presentó un segmento cromosómico extra en Xq y en otro fue hallado un cromosoma marcador no identificado por técnicas de bandedo G y FISH para 22q11.2. El análisis molecular por la técnica de MLPA con los kits comerciales PO36 y PO70 (MRC Holland) permitió 1: En los dos primeros casos detectar una microdelección y una microduplicación en las regiones subteloméricas del brazo largo de los cromosomas 11 y 3 respectivamente. 2: Identificar que el segmento cromosómico extra en el derivado de X corresponde a un fragmento del brazo corto del cromosoma 6, ya que el estudio molecular revela ausencia del segmento subtelomérico distal de Xq y una duplicación de éste segmento en la región distal de 6p, siendo este hallazgo un reordenamiento desbalanceado. 3: Identificar el cromosoma marcador como +idic(22;22)(pter->q11.1::q11.1->pter), las 4 copias de 22q fueron determinadas por el valor del cociente de dosis de la región 22p-22q11.1 obtenido en el análisis (DQ: 2). En todos los casos los hallazgos fueron consistentes con la clínica de los pacientes. El estudio molecular de las regiones subteloméricas por la técnica de MLPA, resultó una valiosa herramienta para identificar la alteración genética en pacientes pediátricos con clínica indeterminada y cariotipo normal o no concluyente.

153. (741) ESTUDIO DE LA RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN 275 PACIENTES CON LA FORMA NO CLÁSICA DE HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

Taboas M.¹; Buzzalino N.¹; Fernández C.¹; Belli S.²; Stivel M.²; Oneto A.²; Alba L.¹; Dain L.¹

Centro Nacional de Genética Médica¹; División Endocrinología, Hospital Durand².

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita es una enfermedad autosómica recesiva producida en el 95% de los casos por déficit de 21-hidroxilasa. Puede manifestarse en forma severa o clásica (C), o moderada o no clásica (NC). En un estudio previo se genotipificó un grupo de afectados mediante el estudio de las 10 mutaciones más frecuentes y/o secuenciación completa del gen CYP21A2 y se hallaron mutaciones en el 100% de los alelos de pacientes C y en el 75% de los NC. El objetivo de este trabajo fue evaluar si los valores hormonales difieren entre los pacientes NC totalmente genotipificados, y aquellos que no y que por lo tanto son hiperandrogénicos. Se incluyeron 275 pacientes NC con valores de 17OHP basal > 2 ng/ml y post ACTH > 10 ng/ml o bien 17OHP basal > 6 ng/ml sin prueba de ACTH, DHEA-S normal, testosterona (T) y androstenediona (A) elevadas. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a su genotipo en: 1- mutación leve en ambos alelos; 2- mutación leve en uno y severa en otro; 3- mutación leve en un solo alelo; 4- mutación severa en un solo alelo; 5- sin mutación en ambos alelos. Para cada grupo se consignaron los valores hormonales de 17OHP basal y post ACTH, DHEA-S, T y A. Los datos se analizaron por el test de Kruskal-Wallis. Los resultados obtenidos indican que no hay diferencias significativas entre los grupos estudiados para A, T y DHEA-S. Sin embargo, en el caso de 17OHP basal, se observan diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 entre ellos y con cada uno de los demás (valores en ng/ml; X \pm ES: Grupo 1- 15,8 \pm 1,2; 2- 25,5 \pm 2; 3- 7,6 \pm 2,4; 4-

6,1±0,7 Y 5- 7,5±0,9; p<0.05). Al estudiar la 17OHP post ACTH, no se observaron diferencias significativas entre los grupos 1 y 2, pero sí entre ellos y el resto (Grupo 1- 37,6±6,9; 2- 40±4,1; 3- 15,9±1,7; 4- 17,3±2,3; 5- 17,9±2,4; p<0.05). Nuestros resultados demuestran que probablemente los criterios bioquímicos de inclusión para los pacientes NC deben ser reevaluados.

HEMATOLOGÍA 1

154. (83) REGULACIÓN DE ZEB1 POR NOTCH1 EN LEUCEMIA LINFÁTICA AGUDA T

Cavallo N.; Llorens M.; Perrone A.; Cabanillas A.
Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox) es un factor de transcripción (FT) involucrado en la diferenciación de células derivadas de mesodermo y en la Transición Epitelio-Mesenquimática (EMT), proceso relacionado a la metástasis de tumores sólidos. Recientemente se asoció ZEB1 a patologías hematológicas de linfocitos T (LiT), pero su función aún no ha sido bien caracterizada. En el proceso de EMT se ha asociado a ZEB1 con la vía de señalamiento de Notch1. Notch1 tiene un rol crítico en el desarrollo normal de LiT y también en Leucemia Linfática Aguda T (LLA-T). Más del 50% de los pacientes con LLA-T presentan mutaciones activantes de Notch1. Nuestro objetivo fue evaluar si existe una correlación entre ambos factores en leucemias. Para ello se evaluó la expresión proteica basal de ZEB1 y Notch1 por western blot en diferentes líneas celulares humanas de leucemia aguda y se determinó que la línea celular de LLA-T (Jurkat) presenta mayor expresión de ambos factores comparado con las líneas celulares mieloides. Para evaluar si hay dependencia funcional entre ZEB1 y Notch1 en LLA-T se inhibió la vía Notch1 en células Jurkat, usando un inhibidor de gamma secretasa (GSI) por 3 y 8 días y se evidenció una disminución en la expresión de ZEB1 del 50% al 8º día. GSI también produjo disminución de la expresión de Akt fosforilado. Para evaluar si la vía de PI3K es intermediaria de la acción de Notch1 sobre ZEB1, se incubaron células Jurkat con el inhibidor de PI3K, LY294002 y se observó disminución en ZEB1 sin modificar Notch1. Además, se evaluó la acción de Notch1 sobre el promotor de ZEB1 por ensayos de genes reportadores en HEK293T con un vector que expresa la porción activa de Notch1 (EF.hICN1.CMV.GFP) y el promotor de ZEB1 (Z1p1000Luc). Notch1 produjo un aumento de la actividad del promotor de ZEB1, lo cual se revirtió al inhibir la vía de PI3K. Por lo tanto se concluye que Notch1 regularía a ZEB1 en LLA-T y este efecto sería mediado por PI3K.

155. (233) LA REGULACIÓN DE LAS RESPUESTAS PLAQUETARIAS GATILLADAS POR LIGANDOS DE RECEPTORES TIPO TOLL (TLR) 2 Y 4 DESENMASCARA UN NUEVO ROL NO GENÓMICO DEL FACTOR NUCLEAR-KAPPAB

Rivadeneira L.¹; Carestia A.¹; Etulain J.¹; Pozner R.¹; Fondevila C.²; Negrotto S.¹; Schattner M.¹
Laboratorio de Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹; Servicio de Hematología, Clínica Bazterrica, Buenos Aires, Argentina².

Previamente demostramos que el factor nuclear-kappaB (NF-kB) es un mediador involucrado en la activación plaquetaria gatillada por agonistas clásicos. Dado que en células nucleadas la activación del NF-kB es una señal rioabajo en la transducción de la señal de los receptores tipo toll (TLRs) y que las plaquetas participan en la respuesta inmune en parte a través de la activación del TLR2 y 4, en el presente trabajo estudiamos el rol del NF-kB en la activación plaquetaria mediada por dichos receptores. La estimulación de plaquetas con Pam3CSK4 (Pam) o LPS, ligandos del TLR2 y 4 respectivamente, indujo la degradación del inhibidor (IkB) y la fosforilación de la subunidad p65 del NF-kB (western blot). Ambas respuestas fueron inhibidas por anticuerpos bloqueantes de los TLRs y aumentadas por concen-

traciones subumbrales de trombina. Además, el Pam gatilló la agregación plaquetaria (turbidimetría), la unión del fibrinógeno (citofluorometría (CF); C:8±1, Pam:123±19 media de intensidad de fluorescencia, n=3), la liberación de ATP (luminiscencia; C:0±0,1, Pam:3,4±0,3uM, n=3) y del factor von Willebrand (FvW) (ELISA; 1,4±0,1 veces respecto del control (VdC), n=5), la expresión de P-selectina (CF; C:9±0,5, Pam:42±4,5%, n=5), la formación de agregados plaquetas-leucocitos (CF, C:16±2, Pam:38±3,6%, n=5) y la expresión del CD40L (CF; C:1±0,1, Pam:25±6% n=5). El LPS estimuló la liberación de FvW (1,7±0,2 VdC, n=5) y potenció la agregación y liberación de ATP inducida por trombina. Todas las respuestas fueron inhibidas por el tratamiento de las plaquetas con dos inhibidores estructuralmente no relacionados del NF-kB, Bay 11-7082 y Ro 106-9920. Estos datos sugieren que las respuestas inducidas por Pam o LPS en plaquetas son mediadas por el NF-kB, revelan otro rol no genómico del NF-kB en plaquetas e identifican a esta molécula como un potencial blanco para inhibir la activación plaquetaria en enfermedades infecciosas e inflamatorias.

156. (395) ROL DE LA VÍA DE LA MIOSINA EN EL EFECTO DEL ANAGRELIDE SOBRE EL MEGACARIOCITO

Espasandin Y.; Glembofsky A.; Marta R.; Lev P.; Goette N.; Molinas F.; Heller P.
Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari" (IDIM)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los mecanismos por los cuales el anagrelide (A) disminuye las plaquetas en la Trombocitemia Esencial no son claros. Previamente demostramos que además de inhibir la megacariocitopoyesis, el A inhibe la fase final de producción plaquetaria o trombopoyesis, caracterizada por la formación de proplaquetas. Postulamos que el A activaría la vía de la miosina, uno de los pocos reguladores negativos que modula ambos procesos, lo cual explicaría la acción inhibitoria del A sobre los mismos. Estudiamos el efecto del inhibidor de miosina, blebistatina (B), en la acción del A sobre megacariocitos (MK) derivados de cordón umbilical. En la etapa de MKpoyesis, la B (días 7-10 de cultivo) indujo polilobulación en cultivos sin A y parcialmente en cultivos con A, MK estadio II+III (inmunofluorescencia con CD41 y Hoechst) en Control (C), A, B y B+A, 8.9± 2.8, 6.9±3.8, 48.3±27.4, 26.8±10.4%, p=0.001 (p<0.05: A vs B), pero fue incapaz de inducir maduración en MK con A, fluorescencia CD42b (citometría de flujo) en C, A, B y B+A, 56±2, 42.2±5.8, 70.8±10.5, 43.9±22.6, p>0.05, sugiriendo desacople entre maduración y poliploidización. El tratamiento de MK maduros (día 13) con B revirtió parcialmente la inhibición del A sobre la trombopoyesis, % proplaquetas (microscopio invertido) en C, A, B y B+A 2,1±0,9%, 0,86±0,2%, 4,81±0,4%, 2,57±0,07%, p<0,0001 (p<0.05: C/A, C/B, A/B, A/B+A). La incubación de MK maduros con A indujo fosforilación (Western blot) de la cadena regulatoria de miosina (MLC), que activa la miosina. En conclusión, el efecto inhibitorio del A sobre las proplaquetas se debe, al menos en parte, a activación del circuito inhibitorio pMLC/miosina, resaltando su importancia en la regulación de la trombopoyesis y ampliando el espectro de drogas que inhiben la producción plaquetaria por esta vía (ej: trombocitopenia secundaria a inhibidores HDAC). Respecto al efecto del A sobre la MKpoyesis, se requieren otros estudios para establecer el mecanismo subyacente a su acción en esta etapa.

157. (533) REGULACIÓN DE FERROPORTINA EN INFLAMACIÓN CRÓNICA EN MODELOS DE RATÓN CON Y SIN EXPRESIÓN DE HEPICIDINA

Danna M.; Giorgi G.; Roque M.
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur.

La inflamación tiene un efecto potente sobre la homeostasis del Fe controlando su biodisponibilidad sistémica y celular a través de la acción de hepcidina sobre el exportador ferroportina (FPN). Objetivo: profundizar los efectos de la inflamación crónica sobre la exportación de Fe mediada por el eje hepcidina-FPN estudiando FPN

duodenal y esplénica en una cepa *Knock-out* para hepcidina y *Wild type* (WT). Cepas de ratones usadas: **a)** WT CF1; **b)** WT C57BL6; **c)** KO para hepcidina. Inflamación crónica en: **a)** CF1: 3 dosis de Turpentina c/7 días; **b)** C57BL6/KO: una dosis de *B.abortus*. FPN esplénica y duodenal se analizaron por inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF); Hepcidina hepática en C57BL6 por RT-PCR. El ARNm de hepcidina aumentó en ratones C57BL6 inflamados. FPN (IHQ e IF), se detectó en: **a)** *Enterocitos de CF1* y *C57BL6 no inflamados*: intracelular y basolateral; y en *KO* intensa expresión intracelular, basolateral y apical; **b)** *Enterocitos de CF1* y *C57BL6 inflamados*: menor expresión; sin cambios en *KO*; **c)** *Bazo de CF1*, *C57BL6* y *KO no inflamados*: intensa expresión en macrófagos de la pulpa roja y alto contenido de hemosiderina en WT-CF1; **d)** *Bazo de CF1* y *KO inflamados*: sin cambios; en la cepa WT-C57BL6: menor expresión. La disminución de FPN duodenal en inflamación crónica en presencia de hepcidina (cepas CF1/C57BL6) representaría una estrategia metabólica para disminuir el consumo de Fe dietario. La intensa expresión de FPN duodenal en ausencia de hepcidina (cepa KO) en la inflamación crónica, muestra que el control de la exportación duodenal de Fe depende de hepcidina. En bazo de la cepa WT-C57BL6, el control de la exportación sería dependiente de hepcidina; mientras que en la cepa WT-CF1, el exceso de Fe regularía a FPN, aun en presencia de hepcidina. Nuestros estudios del eje FPN-hepcidina en bazo y duodeno en inflamación crónica, mostraron que la regulación de FPN es mediada por la vía dependiente de hepcidina y por la señal específica ejercida por el Fe tisular.

158. (603) EL INHIBIDOR DE HISTONAS DESACETILASA, ÁCIDO VALPROICO, INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE BNIP3 EN LAS CÉLULAS RAJI PERO NO LOGRA REVERTIR LA RESISTENCIA A LA COMBINATORIA MG132 CON TRIÓXIDO DE ARSÉNICO

Cavaliere V.¹; Lombardo T.^{1,2}; Costantino S.¹; Papademetrio D.¹; Álvarez E.¹; Blanco G.^{1,2}
Instituto de Estudios de La Inmunidad Humoral "Prof. Dr Ricardo Margni" (IDEHU)-CONICET; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Laboratorio de Inmunotoxicología, LaITO.

BNIP3 es una proteína de la familia Bcl-2 con un rol crítico en el balance muerte/sobrevida celular y en la resistencia a drogas citotóxicas. Su silenciamiento epigenético constituye un marcador tumoral, siendo en parte responsable de fallas en la quimioterapia. Previamente observamos que la línea U937 (leucemia promonocítica) expresa BNIP3 y no así la línea Raji (linfoma de Burkitt) y demostramos que la combinatoria MG132+ATO es sinérgica en U937 y antagónica en la línea Raji. El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de expresión de ARNm para BNIP3 en células U937 y Raji con y sin tratamiento con la droga epigenética ácido valproico (AVP) y determinar además su influencia sobre el antagonismo MG132+ATO en Raji. La expresión de ARNm de BNIP3 se determinó por RT-PCR semicuantitativa y la de la proteína por western blot. El efecto citotóxico por citometría de flujo y el coeficiente de interacción (CI) por el método de Chou-Talalay. El AVP incrementó los niveles de ARNm (1,5 en Raji y 1,9 en U937 vs basal) y de proteína en ambas líneas. En U937 se observó que la expresión basal de ARNm aumentó por tratamiento con MG132 (1,8-2,3 vs basal, para 0,5-1,5 μ M) pero no en Raji. Resultados similares se obtuvieron al evaluar la expresión de la proteína. La combinatoria subcitotóxica AVP (3 mM) con MG132 (0,5-1,5 μ M) moduló los niveles de ARNm en Raji de manera dosis dependiente (1,3-1,9 vs basal). Más aún, el antagonismo MG132+ATO se incrementó en presencia de AVP 3 mM (CI>1,5 vs CI>0,25, rango: EC50 a EC90) en la línea Raji. En conclusión, el AVP desilenciaría a BNIP3 en Raji permitiendo un incremento de su expresión post tratamiento con MG132 de manera dosis dependiente. Esto se asemejaría a la situación basal de U937 donde la combinatoria MG132+ATO es sinérgica. Sin embargo, MG132+ATO con AVP aumentó el antagonismo en Raji, sugiriendo que la expresión diferencial de BNIP3 no bastaría para explicar el efecto antagónico de MG132+ATO en las células Raji.

159. (621) INGRESO AQUÍ EL TITULOROL DE REL-B EN LA SOBREVIDA DE LINFOMAS DE TIPO HODGKIN

Ranuncolo S.¹; Pittaluga S.²; Jaffe E.²; Lewis B.²
Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"; National Cancer Institute National Institutes of Health, USA.

The REL family of transcription factors plays major roles in diverse cell processes and tumor etiology. Despite considerable evidence supporting the role of the REL members in the immune system and lymphomagenesis, it is not clear if each REL controls unique targets in distinct subsets of B cell-derived lymphomas or whether each is redundant. We delivered specific shRNAs to knock down each REL member in representative non-Hodgkin (NHL) and Hodgkin lymphoma (HL) cell lines. All NHL and HL cell lines were dependent on RelA and c-Rel for survival but only HL cells were sensitive to RelB depletion. ChIP-seq analysis uncovered an extensive nonoverlapping REL networks and that RelB directly controlled cell cycle regulators and apoptosis inhibitors including BCL2 and BCLx. However, the RelB shRNA in HL cells does not kill these cells by apoptosis. Electron microscopy revealed intact nuclei with considerable numbers of cytosolic vacuoles, indicative of autophagy. Secondly, ATG7, a key player in the autophagosomes development, is induced. We found that HL cell lines and primary tumors stably expressed NIK and that HL cell lines are missing either TRAF2 or TRAF3 protein (NIK negative regulators). Unexpectedly, RelB shRNA resulted in the re-expression of TRAF2 and degradation of NIK protein. Lastly, both NIK shRNA and a small molecule inhibitor of NIK had the same phenotype as the relB shRNA. These data shed light on unexplored aspects of HL biology. We found that HL is the only GC derived malignancy that relies on RelB for viability, and thus differentiates Hodgkin lymphoma from non-Hodgkin lymphomas. These data argue that each REL member has specific and unique functions and gene targets, as we predicted from the lack of similarities in their transactivation domains. Furthermore, the RelB dependency in HL suggests that NIK is an attractive therapeutic target and the possibility of targeting NIK enzymatic activity in HL patients with diminishing side effects.

NEFROLOGÍA 1

160. (309) ESTUDIOS DE REGENERACIÓN CELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES HUMANAS

Márquez L.¹; Ibarra F.^{1,2}; Repetto H.³; Silberstein C.¹
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Laboratorio de Riñón Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Universidad de Buenos Aires; Servicio de Pediatría, Hospital Nacional Profesor A. Posadas, Buenos Aires, Argentina.

La capacidad de recuperar la función renal luego de una lesión depende de la habilidad de los túbulos renales de regenerarse. Es posible que en el proceso de regeneración tubular renal se desencadenen diferentes mecanismos dependiendo del tipo y extensión de la lesión. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de regeneración tubular renal en cultivos primarios de células epiteliales tubulares de corteza renal humana (CERH), expuestos al daño ocasionado por la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) ó agua oxigenada. Los cultivos primarios de CERH se obtuvieron a partir de nefrectomías realizadas en el Hospital Nacional Prof. A. Posadas. Las incubaciones con Stx2 (10 ng/ml, 1h) ó agua oxigenada (1 mM, 3hs) inhibieron significativamente ($p < 0.05$) la tasa de proliferación celular evaluada por la incorporación de bromodeoxiuridina, la tubulogénesis en cultivos tridimensionales y estimularon la apoptosis. Una significativa reducción del porcentaje de células progenitoras, CD133 positivas, se observó luego de la exposición de CERH a Stx2, mientras que el agua oxigenada no alteró esa población celular. Tanto Stx2 como agua oxigenada inhibieron la migración y proliferación celular evaluada por el ensayo de cicatrización de herida. Sin embargo, la pre-incubación de las CERH en condiciones de arresto de crecimiento, revirtió el

efecto producido por el agua oxigenada, luego de 20 hs en medio suplementado con 5% suero, pero no revirtió el efecto citotóxico de Stx2. El arresto de crecimiento por 24hs indujo significativamente la expresión de vimentina, evaluada por western blot, respecto a la incubación en medio suplementado. Contrariamente, la incubación con Stx2 inhibió significativamente la expresión de vimentina. Los resultados evidencian que el arresto de crecimiento indujo la desdiferenciación de las CERH permitiendo revertir el efecto producido por el agua oxigenada, mientras que el daño producido por Stx2 impidió la desdiferenciación y regeneración celular.

161. (619) LA INHIBICIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO DE LA MEDULA EXTERNA RENAL (ROMK) INHIBE LA EXPRESIÓN GENICA DE ROMK1 Y ALFA-1 NA-K-ATPASA (A1-NKA): EFECTO DE LA GONADECTOMÍA

Guevara D.; Oddo E.; Muchnik C.; Toledo J.; Ibarra F.; Azurmendi P.; Arrizurieta E.

Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Universidad de Buenos Aires.

El ROMK es necesario para el transporte transepitelial de cloruro de sodio por el asa ascendente de Henle. En resultados previos mostramos que el bloqueo de ROMK por Glibenclamida (Gli) en animal entero disminuye la reabsorción de Na⁺ y la excreción de K⁺, sin cambios en la presión arterial y con un descenso plasmático de K⁺ y aldosterona. En el presente trabajo evaluamos su efecto sobre la expresión génica de ROMK y a1-NKA en el modelo de inhibición por Gli y el posible rol de regulador de las hormonas sexuales. Se estudiaron ratas espontáneamente hipertensas de ambos sexos (SHR) de 12 semanas de vida, la mitad con gonadectomía (Gx) al destete; a las que se les administró solución glucosada al 4% con o sin Gli (10 mg/kg p.c.) por vía oral los 3 días previos al estudio. La cuantificación de ARNm de ROMK1 y a1-NKA se realizó por PCR en tiempo real con Sybr Green extrayendo el ARN total de corteza y médula renal y posterior obtención de cADN para cada rata, los resultados se expresaron como la tasa de cambio de ARNm de los genes blanco con respecto al de B-Actina. Los resultados se analizaron por test de student o ANOVA multifactorial, según correspondiera. Los niveles de ARNm de ROMK1 y a1-NKA fueron mayores en médula respecto de corteza en todos los grupos (p<0,001), mientras que Gli los disminuyó sólo en médula (de 0.0030±0.0004 a 0.0008±0.0002, p<0.0001), sin diferencias por sexo. La Gx amplificó la respuesta medular a Gli en ROMK1 (de 0.0036±0.0008 a 0.0006±0.0001 en Gx y de 0.0025±0.0004 a 0.0010±0.0003 en no-Gx, p<0.05), sin cambiar la de a1-NKA. La expresión de ARNm de ambos genes en médula es directamente proporcional (R: 0.79, p<0.001). Estos estudios sugieren que la inhibición crónica de ROMK inhibe su expresión y de a1-NKA en médula renal, por mecanismos directos o indirectos pero con una relación directa entre ellos. A su vez existiría una interacción entre la expresión de ambos transportadores con la presencia de hormonas sexuales.

162. (630) ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO DURANTE LA FASE AGUDA DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

Ferraris J.^{1,5}; Ferraris V.¹; Sorroche P.¹; Saez S.¹; Acquier A.^{2,3}; Ginaca A.⁴; Mendez, C.^{2,3}

Hospital Italiano¹, Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-UBA-CONICET², Cátedra De Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires³, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez⁴ Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁵.

La forma típica del síndrome urémico hemolítico (SUH) se asocia a la infección intestinal por cepas de E. Coli productoras de toxina shiga. Si bien se ha demostrado la activación del sistema del complemento (SC) en las formas atípicas de SUH, la participación del SC en el SUH endémico no ha sido suficientemente explorada. El objetivo del presente estudio ha sido evaluar el estado de activación de las vías clásica y alterna del SC durante la fase aguda del SUH. Se realizó un estudio longitudinal que incluyó 18 pacientes (M/F: 8/10; 32,4 ± 5,4 meses de edad) y

6 controles sanos de igual edad. Las muestras de sangre se obtuvieron en forma diaria desde la internación hasta el alta y se determinaron los niveles de C3 y C4 por nefelometría y de C3c por inmunofijación, en suero, y los de Sc5b-9, Bb y C4d en plasma por inmunoensayo. Los niveles de C3 y C4 al ingreso fueron comparables a los de los controles (133,6 ± 10,5 vs 127,8 ± 9,0; 26,9 ± 2,9 vs 22,4 ± 1,7 mg/dl, respectivamente) mientras que Bb, Sc5b-9 y C3c resultaron significativamente elevados en todos los pacientes (6,9 ± 1,3 vs 1,3 ± 0,2; 651,2 ± 130,9 vs 334,8 ± 40,6 ug/ml y 24,9 ± 4,4 vs 12,3 ± 1,4% of C3, respectivamente, p<0,05). A su vez, los niveles de Bb fueron significativamente más elevados en los pacientes oligúricos (n=13) que en los no oligúricos (n=5) (8,4 ± 1,6 vs 3,3 ± 0,4 ug/ml) aunque tanto los niveles de Bb como de Sc5b-9 se normalizaron durante la primera semana de enfermedad. Se detectaron correlaciones positivas entre los valores de C3 y C4, C3c y Bb, C3c y Sc5b-9, Bb y Sc5b-9, nitrógeno ureico en sangre y Bb, lactato deshidrogenasa y Bb, y negativa entre el número de plaquetas y Bb (p<0,05). Nuestros resultados demuestran la activación de la vía alterna del complemento durante la fase aguda del SUH y sugieren un rol patogénico del sistema de complemento en la generación de la trombocitopenia, anemia hemolítica y fallo renal agudo que ocurren durante la fase aguda de la enfermedad.

163. (687) ALTERACIÓN DE LA RELACIÓN L-DOPA/DOPAMINA COMO MARCADOR PRECOZ DE DAÑO RENAL EN RATAS HIPERTENSAS POR SOBRECARGA DE FRUCTOSA.

Rukavina Mikusic N. Kouyoumdzian N; Kravetz M; Gorzalczy S; Del Mauro J; Lee H; Pandolfo M; Trida V; Hocht C; Puyó A; Fernández BE; Choi M.

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El modelo de hipertensión arterial por sobrecarga de fructosa en la dieta (HTA/SF) produce cambios metabólicos, insulinoresistencia y daño renal. Hipótesis: Estos cambios se asocian a modificaciones del sistema dopaminérgico renal que contribuyen a la retención de sodio y desarrollo de HTA y preceden a la microalbuminuria urinaria. Objetivos: Determinar alteraciones en la producción renal de dopamina (DA) mediante el cociente L-dopa/DA y su relación con la natriuresis, presión arterial sistólica (PAS) y aparición de microalbuminuria. Se usaron ratas Sprague Dawley macho. Grupos: Control (agua para beber); SF: con F al 10%P/V para beber, tratadas durante 4, 8 y 12 semanas (n=4 por grupo y período). Se determinó en orina de 24 hrs: L-dopa y DA (por HPLC), diuresis, sodio y creatinina y en plasma: triglicéridos, glucemia, colesterol e insulinemia. La PAS se midió por método indirecto. Resultados (±ESM): SF incrementó PAS (mmHg, C4: 121±8 vs F4: 145±1*; C8: 130±4 vs F8: 161±10*; C12: 133±5 vs F12: 163±4*), triglicéridos (mg/dl, C8: 44±8 vs F8: 116±10*; C12: 68±30 vs F12: 153±12*), la relación L-dopa/DA (C4: 0.49±0.05 vs F4: 1.9±0.09*; C8: 0.53±0.06 vs F8: 2.35±0.1*; C12: 0.54±0.07 vs F12: 2.57±0.2*), la diuresis (ml/24 hrs, C4: 11.79±1.42 vs F4: 24.54±2.05*; C8: 9.98±1.01 vs F8: 23.52±1.9*; C12: 11.55±1.6 vs F12: 28.37±2.07*) y disminuyó la excreción urinaria de sodio (mEq/24 hrs, C4: 1.01±0.05 vs F4: 0.83±0.04*; C8: 1.02±0.08 vs F8: 0.72±0.05*; C12: 1.04±0.08 vs F12: 0.64±0.04*). *p<0.05, #p<0.01. La microalbuminuria inducida por SF se observó a la semana 12 (C12: 13.11±1.4 vs F12: 57.6±2.5*). LA SF produjo un aumento progresivo de la relación L-dopa/DA desde la 4ª semana, que acompañó al incremento de la PAS con disminución de la natriuresis y fue precoz a la aparición de microalbuminuria en la 12ª semana. Conclusión: la relación L-dopa/DA urinaria puede ser un marcador aún más precoz que la microalbuminuria para detectar el daño renal en la HTA/SF.

164. (774) LA EXPRESIÓN RENAL DE ANP Y HIF-1α COMO MECANISMO DE ADAPTACIÓN EN RESPUESTA A UNA DIETA HIPERSÓDICA

Kouyoumdzian N.¹; Della Penna S.¹; Cao G.⁴; Gorzalczy S.²; Trida V.³; Toblli J.⁴; Rosón M.¹; Fernández B.¹

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Farma-

ología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Cátedra de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Hospital Alemán, Buenos Aires⁴.

Introducción. En el riñón, una ingesta elevada de sal favorece la hipoxia, el estrés oxidativo y la fibrosis. Está descrito que el péptido natriurético auricular (ANP) y el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) son factores que ejercen un efecto citoprotector. **Hipótesis y objetivo.** Probar la hipótesis de que el ANP y HIF-1 α renal endógeno podrían estar aumentados en ratas alimentadas crónicamente con una dieta hipersódica para contrarrestar el estrés oxidativo y la fibrosis en el riñón. **Metodología.** Se utilizaron ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta hipersódica (8% de NaCl) (HS) o normosódica (0,4% de NaCl) (NS) durante 3 semanas, con o sin la administración de tempol (T), un inhibidor de estrés oxidativo, en el agua de bebida (1mM). Se registró la presión arterial media (PA) y la excreción urinaria de sodio (UV_{Na}). Se midió la expresión de ANP, HIF-1 α , P47phox (marcador de estrés oxidativo) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1) (marcador de fibrosis) en tejido renal. **Resultados.** El grupo HS mostró un aumento de la PA, de la UV_{Na}, de la inmunexpresión de p47phox, HIF-1 α en todos los segmentos del nefrón, y de ANP y TGF- β 1 en la rama ascendente gruesa de Henle (AGH), túbulo colector cortical (TCC) y glomérulos. La administración de tempol junto con la sobrecarga de sodio aumentó aún más la natriuresis, previno el incremento en la PA, en la expresión de HIF-1 α excepto en la rama gruesa ascendente, de p47phox y de ANP (% glomérulo; NS: 6.7 \pm 0.8, HS: 16.7 \pm 1.9*, NS-T: 3 \pm 0.5, HS-T: 4 \pm 1, AGH; NS: 0.5 \pm 0.2, HS: 2.7 \pm 0.5*, NS-T: 0.2 \pm 0.2, HS-T: 0.2 \pm 0.2; TCC; NS: 3.9 \pm 0.5, HS: 7.3 \pm 0.5*, NS-T: 2.1 \pm 0.5, HS-T: 3 \pm 0.5; *p<0.01). **Conclusiones:** Estos resultados sugieren que la producción endógena de HIF-1 α y ANP en respuesta a una sobrecarga de sodio constituyen un mecanismo de adaptación en el riñón para prevenir o atenuar los efectos perjudiciales del estrés oxidativo en el desarrollo de fibrosis.

MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR 1

165. (19) DISEÑO DE UN NUEVO MATERIAL IMPLANTABLE PARA SU APLICACIÓN EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO CON POTENCIAL EFECTO ANTIOXIDANTE Gravina A.¹; D' Elía N.¹; Sartuqui J.¹; Ruso J.²; Messina P.¹ CONICET- Bahía Blanca Instituto de Química del Sur¹; Departamento de Física Aplicada, Universidad De Santiago de Compostela, España².

En la ciencia de los biomateriales empleados en la regeneración de tejido óseo es esencial desarrollar dispositivos implantables que sean tanto biocompatibles como bioactivos. Además, es sabido que la presencia de especies reactivas de oxígeno que conducen al estrés oxidativo celular y, consecuentemente al retardo en el tiempo de curación de la herida en el sitio de implantación, puede controlarse usando nanopartículas de CeO₂ -capaces de alterar su estado de oxidación (de III a IV)-. Nuestro objetivo es desarrollar un material que combine la resistencia mecánica del Ti y la capacidad de óxido-reducción del Ce pensando en su potencial aplicación en implantes óseos y dentales. Para la síntesis de los materiales de TiO₂ y Ce-TiO₂ se emplearon microemulsiones W/O como agentes directores de estructura, usando Ti(IV) Isopropóxido y valerianato de Cerio (Ce(Val)₃) como precursores de Ti y Ce respectivamente. Las micrografías SEM mostraron que la morfología del material difiere cuando es sintetizado en presencia de Ce(Val)₃, dando lugar a una superestructura fibrilar en contraste con la topografía irregular que presenta el TiO₂ puro. Se realizaron ensayos de bioactividad sumergiendo los materiales preparados en Suero Fisiológico Simulado, observándose la formación de una capa de Hidroxiapatita similar a la ósea sobre la superficie de los mismos. Mediante espectroscopía UV se estudió la cinética de decaimiento del ONOO⁻. Los resultados muestran que la presencia de CeO₂ sumada a la morfología fibrilar del material acelera la cinética de degradación del ONOO⁻. En este

trabajo presentamos un método original y sencillo para obtener un material cuya morfología fibrilar está combinada con la propiedad del Ce para incrementar la bioactividad del material y la reducción de especies radicalarias responsables del estrés oxidativo. Ambas características favorecerían la exitosa integración ósea del implante y la regeneración del tejido huésped.

166. (281) ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN DE REDES DE POLICAPROLACTONA Y ÁCIDO POLILÁCTICO CON POLIACRILATO DE HIDROXIETILO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Fernández J.¹; Vikingsson L.²; Oberti T.¹; Gómez Ribelles J.^{2,3}; Cortizo A.¹

Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral¹; Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, Universitat Politècnica de Valencia, España²; Ciber en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Valencia, España³.

Ingeniería de tejido óseo-cartilaginoso utiliza diversos materiales, como por ejemplo polímeros, para generar matrices o scaffolds que sirvan de soporte para las células y una vez implantado en el sitio de lesión promueva y guíe la reparación ósea y cartilaginosa. En particular, se sintetizaron redes de cadenas poliméricas de poli epsilon caprolactona (PCL) o ácido poliláctico (PLA) entrecruzadas con poli 2-hidroxietil acrilato (PHEA) generando hidrogeles con distinta capacidad de retención de agua, afectando de esta forma la cinética de degradación. La combinación de un poliéster biodegradable y un polímero hidrofílico puede dar un material con mayor velocidad de degradación que el poliéster puro. La degradación se estudió en buffer fosfato (PBS), en medio de cultivo DMEN con enzima lipasa (25 UI/ml), ambas condiciones durante 42 días a 37°C. Las muestras fueron cortadas, secadas en vacío, pesadas (W₀) e incubadas a distintos tiempos y condiciones. Luego de cada tiempo de degradación, 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}). Este mismo procedimiento se llevo a cabo en agua para conocer la hinchabilidad en este medio. 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 resultados muestran la red PLA-PHEA tiene posee mayor velocidad de degradación respecto a la red de PCL-PHEA tanto en PBS como con lipasa, observado por un mayor%Hinc en ambos medios y en un mayor%W. Además, ambos geles se degradaron a una velocidad mayor que los poliésteres solos. Nuestros resultados demuestran el armado de redes tridimensionales de poliésteres conteniendo PHEA, como componente hidrofílico, aumenta la velocidad de degradación de los materiales.

167. (304) EFECTO CARDIOPROTECTOR DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL ESTROMA MEDULAR GENÉTICAMENTE MODIFICADAS EN UN MODELO OVINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Locatelli P.¹; Hnatiuk A.¹; Olea F.¹; Ramírez R.¹; Cerda M.²; De Lorenzi A.²; Sepulveda D.¹; Laguens R.¹; Crottogini A.¹ Universidad Favaloro¹; Hospital Universitario de la Fundación Favaloro².

Introducción. Las células mesenquimales de médula ósea (MSCs) han demostrado ser beneficiosas en el infarto agudo de miocardio (IAM). Por otro lado, hemos demostrado que la inyección intramiocárdica de un plásmido codificante para VEGF165 humano (pVEGF) en ovejas con IAM disminuye el tamaño del IAM y mejora la función ventricular izquierda (VI). El objetivo fue testear la hipótesis de que las MSCs transfectadas con pVEGF (MSCs-pVEGF) tendrían un efecto beneficioso mayor que ambas terapias individuales sobre el tamaño de IAM y la función VI a un mes del tratamiento. **Métodos.** Ovejas adultas con IAM experimental se randomizaron para recibir en el borde del IAM 2x10⁷ MSCs-pVEGF alogénicas (n=6), 2x10⁷ MSCs (n=6), 3,8 mg de pVEGF alogénicas (n=6) o

placebo (PBS, n=6) en 10 inyecciones intramiocárdicas. A los 4 y 30 días post-IAM se cuantificó el tamaño de IAM por resonancia magnética y la función VI por ecocardiografía. En 16 animales adicionales (n=4/grupo) sacrificados a 10 días post-tratamiento se midió densidad arteriolar y capilar. Resultados. A los 30 días, el tamaño de IAM disminuyó en los grupos MSCs-pVEGF (de 13±5% a 9±4% de la masa VI, p<0,01, X±DS, 2-way ANOVA-Bonferroni) y VEGF (de 14±6% a 11±3%, p<0,05), pero no en MSCs (de 11±3% a 8±3%, p=NS) ni placebo (13±4% a 12±5%, p=NS). La fracción de eyección VI sólo mejoró en el grupo MSCs-VEGF (de 33,9±10 a 53,4±7%, p<0,01) por disminución del volumen de fin de sístole (de 42±10 a 33±8 ml, p<0,05). En el grupo MSCs-VEGF la densidad capilar (2575±522/mm²) y arteriolar (24±8/mm²) fue mayor (p<0,05) que en el placebo (1719±158/mm² y 6±2/mm², respectivamente). Conclusión: En ovejas con IAM de un mes de evolución, tanto la inyección intramiocárdica de MSCs modificadas para sobreexpresar VEGF como la inyección del pVEGF desnudo disminuyen el tamaño del IAM. Sin embargo, sólo las primeras mejoran la función VI e inducen angio-arteriogenesis.

168. (381) EL PREACONDICIONAMIENTO ÁCIDO INCREMENTA LAS RESPUESTAS PROANGIÓGENICAS DE LOS PROGENITORES ENDOTELIALES

Mena H.¹; Fondevila C.²; Boisson-Vidal C.³; Schattner M.¹; Negroto S.¹

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹; Servicio de Hematología, Clínica Bazterrica, Buenos Aires, Argentina²; Inserm U765, Universidad Paris Descartes, París, Francia³.

Previamente demostramos que la acidosis induce apoptosis de células CD34+. Considerando que los progenitores endoteliales (PE) son una subpoblación de estas células y participan en la revascularización tisular en sitios de injuria/isquemia, en el presente trabajo estudiamos el efecto del pH ácido en la biología de los PE. Los PE fueron obtenidos a partir de células CD34+ humanas cultivadas durante 14 días en medio EGM2. El pH del medio (normal 7.4) fue ajustado con una solución isotónica de HCl a 6.6. Se realizaron 5-7 ensayos independientes (*P<0.05, ANOVA). Cuando las respuestas funcionales de los PE fueron evaluadas a pH ácido se observó una inhibición (expresada como% vs 7.4) en la proliferación (26±2*, fosfatasa ácida), migración (61±3*, cámara de Boyden), reparación de heridas (69±2*, daño de monocapa) y formación de túbulos (77±1*, Matrigel). Sin embargo, cuando los PE fueron expuestos durante 6 hs a pH 6.6 y luego el pH fue restaurado a valor normal (preacondicionamiento) tanto la proliferación (como la formación de túbulos se encontraron aumentadas respecto del control (126±3* y 152±4*% respectivamente). En estas condiciones, se observó un aumento en la quimiotaxis mediada por SDF-1 (148±5% de aumento vs 7.4) y la expresión de su receptor CXCR4 (127±11%, citometría de flujo), sin modificación en los niveles de VEGF y su receptor KDR. La capacidad de regeneración tisular fue evaluada en un modelo de isquemia de miembro inferior en ratones inmunodeficientes. Los PE preincubados durante 6 hs a pH 7.4 o 6.6 fueron trasplantados por vía intravenosa. Luego de 14 días, el% de recuperación del flujo sanguíneo (Doppler) en ratones no trasplantados fue 32±6%, en los animales que recibieron PE cultivados a pH 7.4 fue 37±7% y en los trasplantados con PE preacondicionados fue 55±4% (n=6 por grupo). Nuestros resultados indican que el preacondicionamiento ácido incrementa las respuestas proangiogénicas in vitro y la capacidad regenerativa in vivo de los PE.

169. (491) ESTUDIO DEL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DEFENSA ANTE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y CON EL REMODELADO DE LA CROMATINA POR PARTE DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN FUNDAMENTALES DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Solari C.¹; Waisman A.¹; Cosentino S.¹; Luzzani C.¹; Losino N.¹; Vázquez Echegaray C.¹; Romorini L.²; Questa M.²; Miriuka S.²; Barañao L.¹; Guberman A.¹

Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-UBA-CONICET¹; Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, Fleni².

Las células madre (CM) embrionarias (CME) y las CM pluripotentes (CMP) inducidas (CMPi) poseen dos propiedades fundamentales: la autorrenovación y la pluripotencia. Estas propiedades son mantenidas por una serie de factores de transcripción (FT) específicos, siendo los más importantes Oct4, Sox2 y Nanog. Nuestra hipótesis es que estos FT regulan la expresión de genes involucrados en diversos mecanismos celulares, centrándonos en el estudio de la regulación de la estructura de la cromatina, ya que durante la diferenciación ocurren cambios en su organización; y en la defensa frente al estrés oxidativo, dado que la estabilidad genómica es esencial en CMP para evitar la propagación de daños genéticos. En este trabajo estudiamos los genes *Myst2*, *Myst3*, *Myst4*, *Prmt8*, *Atf7ip*, *Taf15*, *Sod1*, *Sod2*, *Txn1*, *Txn2*, *Gpx1*, entre otros. En primer lugar, realizamos un análisis *in silico* de las regiones promotoras en busca de secuencias consenso de unión de dichos FT. Encontramos que estos genes poseen hasta 13 sitios de unión para cada FT, y sitios para por lo menos dos de estos FT en una región analizada de 5 kpb. Luego estudiamos el perfil de expresión mediante RT-qPCR en CME y en CMPi, tanto en estado indiferenciado como durante la diferenciación, utilizando distintos protocolos de diferenciación. Algunos genes como *Prmt8*, *Sod1* y *Sod2*, se reprimieron notoriamente durante la diferenciación. En conjunto, estos resultados sugieren que los mencionados genes podrían ser regulados por dichos FT. Actualmente, nos encontramos estudiando esta regulación, mediante dos estrategias. Analizamos los niveles endógenos de estos genes en sistemas heterólogos transfectados con los FT, y diseñamos construcciones reporteras para ensayos de luciferasa abarcando distintas regiones de los promotores. El estudio de esta regulación contribuirá a la comprensión de los mecanismos que poseen las CM para mantener sus propiedades fundamentales y la integridad de su genoma.

170. (703) MICROARNs INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS A MESODERMO TEMPRANO Y CARDIOMIOCITOS

Garate X.; Romorini L.; Neiman G.; Blugermann C.; Scassa M.; Sevelev G.; Miriuka S.

Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, Fleni, Buenos Aires.

Las células madre embrionarias humanas (CME) y pluripotentes inducidas (CMPi) poseen dos características fundamentales: auto-renovación y pluripotencia. Los microARNs son pequeños ARN esenciales para la regulación de la expresión génica en la pluripotencia (*mir302* y *mir145*) y en la cardiomiogénesis (*mir1*, *mir133*, *mir206* y *mir208*). Sin embargo, no se conoce la dinámica de expresión de los mismos a lo largo de la diferenciación de CME y CMPi hacia cardiomiocitos. Nuestro objetivo fue determinar el perfil de expresión de los microARNs involucrados en la regulación de dicho proceso. Células H9 (CME) y FL1 (CMPi) se diferenciaron mediante un protocolo que comprende la formación de cuerpos embrioides y la estimulación con BMP4, Activina A e IWR1. En el día 14 de la diferenciación observamos en las células H9 cambios significativos en los niveles de expresión (RT-qPCR) de *mir302* y *mir145* (0,27±0,05; 115,48±24,83 veces vs día 0, respectivamente). A su vez, los niveles de expresión de *mir1*, *mir133*, *mir206* y *mir208* aumentan a lo largo de la diferenciación (373,29±100,88; 373,82±80,88; 16,85±3,41 y 615,77±134,86 vs día 0, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron con las células FL1. Una familia de procesos celulares relevantes para el desarrollo embrionario es la transición epitelio-mesenquimal (EMT), siendo la formación del mesodermo un ejemplo de la misma. Por ello, analizamos qué microARNs estarían involucrados en la EMT que ocurre durante la diferenciación de CME a mesodermo temprano. De los microRNAs analizados en una población de progenitores

mesodérmicos (día 3.5 de la diferenciación) observamos un cambio significativo en los niveles de expresión del mir205 (0,14±0,04 veces vs día 0). Podemos concluir que durante la diferenciación de CME y CMPI a cardiomiocitos la expresión de ciertos microARNs asociados a cardiomiogénesis aumenta marcadamente. Además, identificamos al mir205 como un microARN que podría modular la transición EMT de CME a mesodermo.

FISIOLOGÍA CELULAR 1

171. (141) CNBP, UN MEDIADOR DE LA MANIFESTACIÓN DEL SÍNDROME DE TREACHER COLLINS (TCS), ES REGULADO POR ESTRÉS OXIDATIVO

Coux G.; Mouguelar V.; Calcaterra N.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario.

El TCS es un desorden autosómico dominante del desarrollo craneofacial que involucra mutaciones en el gen *TCOF1* y que presenta expresividad variable (severidad de la manifestación) en los sujetos afectados. Existe un conocimiento limitado de los mecanismos moleculares responsables de la manifestación del TCS y se ha sugerido la intervención del estrés redox en su etiología. Recientemente, informamos que es posible lograr peces con fenotipos tipo-TCS mediante el knockdown de la expresión del ortólogo del gen *TCOF1* en pez cebra. Estos peces presentaron una marcada disminución de CNBP, una proteína esencial para el desarrollo craneofacial. Esto sugiere a CNBP como un potencial blanco de regulación del producto de *tcof1* e involucrada en el TCS. El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta de CNBP frente al estrés oxidativo, un posible factor para explicar la variabilidad en la severidad del TCS. A tal fin, embriones del pez cebra fueron expuestos a concentraciones variables de peróxido de hidrógeno (0 a 5 mM). En estos embriones se estudió: viabilidad, expresión del ARNm de CNBP (mediante RT-qPCR) y de la proteína (immunoblot). La viabilidad de los embriones fue similar a la de los controles hasta 3 mM de H₂O₂ ($P=0.439$). La expresión proteica de CNBP disminuyó progresivamente con la concentración de H₂O₂, representando el 50% ($P<0,05$) del control a 50 μ M H₂O₂. Sin embargo, a esta concentración de H₂O₂, la expresión del mRNA de CNBP no se alteró significativamente, sugiriendo la participación de mecanismos post-transcripcionales de regulación. La pre-incubación de embriones con el inhibidor de proteasoma MG132 sugirió que esta vía estaría involucrada en la degradación de CNBP. Estos datos nos permiten concluir que CNBP es afectada por el estrés oxidativo, el cual induce una caída en sus niveles vía proteosoma. Este comportamiento en un contexto del TCS podría ser clave para la comprensión de la expresividad variable del síndrome.

172. (310) PATRÓN DE INVASIÓN DE ESFEROIDES MULTICELULARES DE LA LÍNEA LM3 INMERSOS EN MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE COLAGENO I

Schiappacasse A.¹; Guerra L.¹; Calvo J.³; Marshall G.²; Suarez C.²

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad De Buenos Aires¹; Departamento de Computación, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET³.

El desarrollo de modelos in vitro capaces de evidenciar más adecuadamente el comportamiento real de la célula tumoral, especialmente si se centran en etapas clave de la tumorigénesis como ser la migración e invasión tumoral, resulta de gran importancia en la investigación del cáncer. Esferoides multicelulares sembrados en matrices tridimensionales de gel desarrollan patrones de invasión celular que varían dependiendo de la línea celular y de las características de la matriz, lo cual puede tener implicancias en el comportamiento y malignidad que presenta ese tumor in vivo. En este trabajo se analiza el comportamiento de la línea LM3 (tumor mamario murino) en cuanto a su capacidad de migración celular

(modelo de cierre de heridas) y de invasión microtumoral (modelo de esferoides multicelulares inmersos en matriz de colágeno I). En los primeros se determinó que esta línea logra un 38.6 +/- 4.9% de cierre de la herida original en 6 hs. En los segundos se analizó el patrón de invasión temporal y se lo comparó con el de otras líneas celulares presentes en bibliografía. Se encontró un patrón característico consistente en células invasivas no organizadas en ramas definidas como se observa en otros casos sino cubriendo toda el área periférica al esferoide. El nivel de invasión inicial parece ser menor que el de la línea U87EGFR (glioblastoma) aunque luego se incrementa rápidamente (área invadida al 4to día del 2139 +/- 241% con respecto al área inicial de invasión a las 24 hs de siembra). Estos resultados colocarían a la línea LM3 como una línea útil no solo para ensayos de migración celular sino también para estudios de invasión microtumoral.

173. (386) EXPRESIÓN DEL EJE MIO-DIFERENCIADOR MYOCD/SRF EN CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS Y SU ALTERACIÓN EN RESPUESTA A LPS

Leimgruber C.¹; Quintar A.¹; Peinetti N.¹; Miano J.²; Maldonado C.¹

Centro de Microscopía Electrónica (INICSA)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Cardiovascular Research Institute, University of Rochester, USA².

La dediferenciación de las células musculares lisas prostáticas (CMLp) se ha reportado en el desarrollo de cáncer, hiperplasia nodular y prostatitis, indicando la relevancia del fenotipo normal en la homeostasis glandular. El sistema Miocardina/Factor de respuesta al suero (MYOCD/SRF) es responsable de la inducción de genes contráctiles y se ha descrito principalmente en CML vasculares; sin embargo, no se ha estudiado en próstata. Recientemente, demostramos que LPS induce dediferenciación de CMLp por lo que el sistema MYOCD/SRF, podría estar implicado en este mecanismo. Nuestro objetivo fue analizar la expresión de MYOCD/SRF en CMLp y su modificación en respuesta a los cambios fenotípicos inducidos por LPS. Cultivos primarios de CMLp de ratas Wistar se estimularon con 1 μ g/ml de LPS (CMLp-LPS) o su vehículo (CMLp-Ctrl) por 48hs y procesaron para determinar la expresión de MYOCD/SRF por RT-PCR y qPCR. Se analizó la expresión de marcadores de fenotipo muscular alfa-actina de músculo liso (ACTA2) y calponina, y de fibroblastos vimentina por inmunofluorescencia y western blot. Análisis estadístico ANOVA-TUKEY. Las CMLp-Ctrl expresaron MYOCD/SRF, fueron positivas para ACTA2 y calponina y negativas para vimentina, indicando un fenotipo muscular diferenciado. LPS disminuyó la expresión de MYOCD y SRF ($p<0,01$), correlacionándose con disminución del nivel de ACTA2 ($p<0,01$) y calponina ($p<0,001$) e incremento de vimentina ($p<0,01$), indicando pérdida de fenotipo contráctil. Además, LPS indujo expresión de metaloproteasa 2 MMP2 ($p<0,05$) y tenascina-C ($p<0,05$) ambos marcadores de estroma reactivo, que junto a la co-expresión de ACTA2 y vimentina son características de miofibroblastos. Estos hallazgos indican que el eje MYOCD/SRF está presente en las CMLp y estaría involucrado en el mantenimiento del fenotipo contráctil. Asimismo, su expresión se altera ante la respuesta de las CMLp a LPS adquiriendo características de miofibroblastos de estroma reactivo.

174. (394) AKAP350 CENTROSOMAL EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD ANTERO-POSTERIOR DURANTE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS HEPG2

Tonucci F.; Ferretti A.; Favre C.; Larocca C.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario.

Introducción. AKAP350 es una proteína de anclaje de PKA que se localiza en el aparato de Golgi (AG) y en los centrosomas, organelas esenciales en la polarización celular durante la adquisición de un fenotipo migratorio (polaridad antero-posterior). Durante el establecimiento de la polaridad migratoria, el AG se reorganiza, orientándose hacia el frente de la herida, proceso que requiere de la integridad centrosomal. Estudios nuestros y

de otros grupos demostraron que la localización de AKAP350 tanto en el Golgi como en los centrosomas es necesaria para una migración celular eficiente. **Objetivo.** Estudiar el mecanismo por el cual AKAP350 centrosomal participa en la migración celular. **Metodología.** Utilizamos células HepG2 con disminución en la expresión de AKAP350 centrosomal, por expresión estable del dominio de localización centrosomal de AKAP350 fusionado a GFP (AKAP350CTD). Realizamos el análisis cuantitativo de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia en ensayos de "Wound-Healing" a 6 y 24 h, con el fin de evaluar eficiencia migratoria y polarización del AG, centrosomas y citoesqueleto de actina de las células en el borde de la herida. **Resultados:** 1. Las células AKAP350CTD mostraron una inhibición en la migración celular a 24 h (-75%*), que no fue evidente a las 6 h; 2. A las 6 h se observó una disminución en el número de células con polarización del AG (-56*) que se mantuvo a las 24 h (-78%*). 3. A las 24 h, las células AKAP350CTD evidenciaron una disminución en el citoesqueleto de actina en el leading edge (-16%*) y en centrosomas polarizados (-40%). **Conclusión:** AKAP350 centrosomal participa en el establecimiento de la polaridad antero-posterior durante la migración celular, en un proceso que involucra la reorganización del AG hacia el frente migratorio. * $p < 0,05$

175. (452) LA DELECCIÓN DEL GEN TRISTETRAPROLINA (TTP) DURANTE LA LACTANCIA INDUCE LA INVOLUCIÓN TEMPRANA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

Goddio M.¹; Pérez Cuervo L.¹; Tocci J.¹; Giacollo A.³; Veggetti M.¹; Meiss R.²; Kordon E.¹

LEGMA, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE) – CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires²; Bioterio Central, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina³.

El desarrollo de la glándula mamaria es un proceso complejo, de múltiples etapas. Del embarazo a la lactancia, el crecimiento lobulillo-alveolar es seguido por la diferenciación completa de epitelio mamario, lo que permite la producción y secreción de proteínas de la leche. Al destete se produce un cambio rápido en la señalización de supervivencia a muerte celular que lleva a la involución de la glándula, e implica una amplia remodelación y respuesta inmune innata en el tejido. Tristetraprolina (TTP) es una proteína de unión al ARN mensajero que inhibe la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y genes asociados con la invasividad. Nuestros resultados muestran que la expresión TTP está asociada al grado de diferenciación de células normales y neoplásicas. En particular, encontramos que TTP muestra el nivel más alto de expresión durante la lactancia. Con el fin de entender el rol fisiológico de esta proteína, desarrollamos un ratón doble transgénico donde el gen de TTP es deletado en el tejido de la glándula mamaria luego del parto. Ratones transgénicos C57BL/6 que expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la proteína de la leche WAP se cruzaron con ratones transgénicos C57-BL/6 que poseen con el gen de TTP flanqueado con dos sitios loxP. La recombinación mediada por Cre dio como resultado la delección del gen TTP en el epitelio de la glándula mamaria. Se analizaron cortes de tejidos tomados a diferentes tiempos de lactancia y de involución de la glándula mamaria. En tinciones con Hematoxilina-Eosina detectamos alteraciones morfológicas de las células a partir de la segunda semana de amamantamiento. Además, por RT-PCR cuantitativa detectamos aumento de expresión de citoquinas inflamatorias (como TNF alfa) y cambios a nivel de la expresión de metaloproteasas. Estos resultados indican que TTP modula los niveles de diversas proteínas asociadas a la involución mamaria, lo que muestra su relevancia en el mantenimiento de la lactancia.

176. (583) ROL DE LA AQP2 EN LA ACTIVACIÓN DE LA MAQUINARIA REGULADORA DE VOLUMEN DEPENDIENTE DEL INTERCAMBIADOR NHE2 DURANTE EL CICLO CELULAR

Rivarola V.; Di Giusto G.; Fernández J.; Ford P.; Capurro C.

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Previamente mostramos en células renales que la expresión del canal de agua acuaporina 2 (AQP2) induce una aceleración del ciclo celular mediada por un acortamiento en el tiempo de tránsito por las fases S y G2/M. Esta aceleración involucra una coordinada modulación del volumen celular que tiende a aumentar durante la progresión del ciclo celular. Nuestra hipótesis plantea que la AQP2 formaría parte de un "complejo funcional de sensado" requerido para la activación de las respuestas reguladoras de volumen. El objetivo de este trabajo fue investigar si la proliferación aumentada en presencia de AQP2 involucraba la participación de la isoforma 2 del intercambiador Na^+/H^+ (NHE2), principal responsable de la activación de la maquinaria reguladora ante un incremento de volumen (RVI). Para ello se utilizaron dos líneas celulares de túbulo colector cortical: WT-RCCD₁ que no expresa AQPs y AQP2-RCCD₁ que expresa constitutivamente AQP2 en la membrana apical. Se utilizaron células no sincronizadas (mayoritariamente en G1) o sincronizadas en la fase S del ciclo celular. Se realizaron estudios funcionales de cinética de ciclo celular (pulso-caza de BrdU), de medición de volumen celular y de inmunofluorescencia. Los resultados muestran que, las células que expresan AQP2 presentan una expresión aumentada de NHE2 en la membrana plasmática ($p < 0.01$ $n=7$). Solo en presencia de AQP2, la inhibición del NHE2, disminuye un 28% la incorporación de BrdU ($p < 0.01$ $n=9$) y aumenta el tiempo de tránsito a través de las fases S (3 horas, $p < 0.05$ $n=9$) y G2 (1.5 horas, $p < 0.05$ $n=9$). Paralelamente se observó que en las células que expresan AQP2 se activa en un 60% la maquinaria de RVI ($p < 0.05$ $n=8$) durante la fase S. En conjunto estos resultados sugieren que la proliferación aumentada en presencia de AQP2 se debería a la activación de la maquinaria de RVI dependiente de NHE2.

177. (606) CANAL REGULADOR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA (CFTR) EN CÉLULAS BEWO DE TROFOBLASTO HUMANO, Y SU RELACIÓN CON LA MIGRACIÓN CELULAR

Marino G.; Palma A.; Kotsias B.

Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Universidad de Buenos Aires.

El CFTR está disminuido en placentas con preeclampsia, donde se observa una menor invasión de las células trofoblásticas y la presencia de acidosis extracelular. Nuestro objetivo fue estudiar si el CFTR es funcional en células trofoblásticas BeWo, y si su activación afecta la migración de estas células en condiciones fisiológicas y de acidosis extracelular. Utilizamos técnicas electrofisiológicas (*patch clamp*, configuración célula entera), de biología molecular y de reparación de la herida. 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 μM , 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 μM): 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. Evaluamos la participación del CFTR en la capacidad migratoria de las células realizando una herida en monocapas (1% de suero) y midiendo el porcentaje cicatrizado a las 5-6h. Las células BeWo cultivadas a pH 7.4 estimuladas con forskolina (20 μM) cubrieron una mayor superficie de las heridas ($24.0 \pm 2.9\%$) ($n=6$, $p < 0.01$) que sin el activador ($11.2 \pm 0.7\%$) o coadministrando con CFTR_{inh}-172 (2 μM) ($13.9 \pm 1.7\%$). El inhibidor sólo no afectó la reparación de la herida ($9.2 \pm 0.3\%$). En condiciones de acidosis (pH 7.2) la migración fue menor ($16.0 \pm 1.0\%$) con respecto a las células con forskolina a pH fisiológico. Concluimos que las células BeWo expresan el canal CFTR, el cual es funcional, presentando una participación en el proceso migratorio de las células trofoblásticas. Nuestros resultados suman evidencias al comienzo de la fisiología del transporte placentario en condiciones normales y en la preeclampsia.

178. (658) REGULACIÓN DE VOLUMEN EN CARDIOMIOCITOS ATRIALES DE RATÓN EN CULTIVO

Cacace V.¹; La Padula P.¹; Finkelsteyn A.²; Tasso L.³; Costa L.¹; Bonazzola P.¹; Fischberg J.¹
Instituto de Investigaciones Cardiológicas (INICA)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto del Cálculo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)-CONICET³.

La regulación del volumen celular en cardiomiocitos está implicada en ciertas patologías cardíacas tales como hipoxia e isquemia. Sin embargo, de nuestro conocimiento, no existen reportes previos de incremento regulatorio de volumen (RVI) en células cardíacas expuestas a medios hipertónicos. Con el objeto de evaluar los cambios de volumen de cardiomiocitos expuestos a soluciones hipo e hiperosmóticas y posibles mecanismos implicados, miocitos atriales murinos de línea celular HL-1 fueron cultivados sobre cubreobjetos. Las células fueron equilibradas en solución de Ringer por 30 min a 37 °C. El cambio en el volumen celular fue determinado por un método de dispersión luminosa (Am J Physiol. 1993. 265 C1412-23). Se implementaron desafíos osmóticos con soluciones de Ringer 20% hipotónicas y 20% hipertónicas. Para inhibir el cotransportador Na⁺K⁺2Cl⁻, se utilizó bumetanida 50 μM. En condiciones hipotónicas, el incremento de volumen tuvo una duración de 1,02±0,18 min (n=6), mientras que en condiciones hipertónicas la disminución de volumen duró 0,94 ± 0,24 min (n=4). La regulación de volumen se completó en un lapso de 5-10 min en Ringer 20% hipertónico, y de 7-12 min en Ringer 20% hipotónico. Durante la fase regulatoria, la recuperación fue de 79,2 ± 8,9% y de 65 ± 15,3% a los 5 minutos de exposición a soluciones hiper e hipotónicas respectivamente. La presencia de bumetanida indujo una inhibición parcial de la recuperación de volumen en condiciones hipertónicas. En conclusión, los cardiomiocitos HL-1 regulan su volumen por decremento regulatorio de volumen (RVD) en hipotonicidad, o por RVI en hipertonicidad. Dado que la recuperación del volumen en hipertonicidad es inhibida por bumetanida, el cotransportador Na⁺K⁺2Cl⁻ estaría involucrado en los mecanismos regulatorios por RVI en los miocitos atriales, como se ha descrito en otros tipos celulares. *Subsidio CONICET PIP 01688.*

179. (711) DISMINUCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE HIERRO EN CÉLULAS CHO DEBIDO A LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA P₅-ATPASA ATP13A2

Rinaldi D.; Martínez Cuesta L.; Corradi G.; Adamo H.; De Tezanos Pinto F.
Departamento de Química Biológica, Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Las ATPasas de tipo P son transportadores de membrana energizados por la hidrólisis de ATP. Se han dividido en cinco subfamilias denominadas P₁-P₅. Las P₅-ATPasas se expresan solamente en eucariotas y se desconoce el sustrato que transportan. Se identificaron 5 genes humanos denominados *ATP13A1-ATP13A5*, que pertenecen a las P₅-ATPasas. Mutaciones en el gen *ATP13A2* causa una forma de Parkinson¹. Recientemente demostramos que la expresión heteróloga de la *ATP13A2* en células CHO (*CHO-ATP13A2*) aumenta la incorporación de espermidina². La marcación de células *CHO-ATP13A2* con un marcador específico de lisosomas y endosomas tardíos, mostró un aumento del tamaño de estas vesículas. Además encontramos que las células *CHO-ATP13A2* son más resistentes al tratamiento con FeCl₃. Esto sugiere que el aumento de tamaño de las vesículas ácidas permite una mayor acumulación de poliaminas u otras sustancias capaces de quelar el hierro, manteniéndolo en un estado redox inactivo; o que el incremento de la macroautofagia inducida por la expresión de la *ATP13A2*³ modificaría el transporte de hierro intracelular, facilitando su eliminación. Por esto medimos el contenido de hierro de células *CHO-ATP13A2*

mediante tinción de Perl y ferrocina. Encontramos que células *CHO* expresando una mutante inactiva de la *ATP13A2* (*CHO-508*) acumuló 100 nmol de Fe/mg prot, mientras que células *CHO-ATP13A2* acumularon 50 nmol de Fe/mg prot, durante 24 hs de incubación con 0,25mM FeCl₃. La cinética de entrada de hierro fue similar en ambos tipos de células. Estos resultados sugieren que la *ATP13A2* protege de la citotoxicidad inducida por hierro favoreciendo su eliminación.

180. (725) ALTERACIONES DEL METABOLISMO OXIDATIVO Y DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN LA HIPERPLASIA HIPOFISARIA INDUCIDA POR ESTRÓGENO

Sabatino M.¹; Remor A.²; De Paula Martins R.²; Da Silva L.²; Da Luz Scheffer D.²; Silveira P.²; Torres A.¹; Latini A.²; De Paul A.¹
Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba¹; Laboratorio de Bioenergética e Estresse Oxidativo, CCB, Universidade Federal Santa Catarina, Brasil².

En estudios previos, en un modelo de hiperplasia hipofisaria experimental, detectamos signos de senescencia celular sugiriendo su contribución en la naturaleza benigna de los adenomas hipofisarios. Además, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial favorecen la senescencia celular y, considerando que las mitocondrias son blanco de los efectos del estrógeno, nos propusimos evaluar el metabolismo y dinámica mitocondrial durante el desarrollo de la hiperplasia hipofisaria inducida con estrógeno por 10, 20, 40 y 60 días en ratas macho Wistar (cápsulas vacías se implantaron en controles). Análisis estadístico: ANOVA-Fischer test (p<0,05). Los niveles de lactato plasmático no se modificaron por el tratamiento estrogénico. Sin embargo, ya a partir de 10 días de estrogenización, se detectó un aumento significativo del contenido mitocondrial determinado por la actividad de citrato sintasa en extractos hipofisarios (p<0,05), probablemente inducido por el aumento agudo del metabolismo oxidativo, caracterizado por el incremento de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria (CR) detectado luego de 10 días de tratamiento estrogénico. Estos efectos fueron seguidos por aumentos sostenidos, a partir del los 20 días de estrogenización, de la actividad del complejo IV de la CR y de la creatina quinasa, demostrando una readaptación del metabolismo mitocondrial, frente a mayores demandas energéticas. En paralelo, este aumento de la actividad mitocondrial, fue acompañado por inducción de estrés oxidativo, evidenciado por reducción de la actividad de la glutatión reductasa y por aumento de proteínas carboniladas. La pérdida del estado redox celular provocó una pérdida de la dinámica mitocondrial con aumento del contenido de Mfn-1, siendo así favorecida la fusión mitocondrial. Estas adaptaciones observadas durante el desarrollo de la lesión hiperplásica probablemente podrían favorecer al proceso de senescencia celular contribuyendo así a regular el crecimiento de la glándula.

NEUROCIENCIAS 1

181. (28) EL ANTAGONISTA SELECTIVO DEL RECEPTOR PARA GLUCOCORTICOIDES (RG) CORT108297 PREVIENE ANORMALIDADES DEL HIPOCAMPO EN LA NEURODEGENERACIÓN DEL WOBBLER Y EN RATONES CONTROLES TRATADOS CON CORTICOSTERONA

Meyer M.¹; Gargiulo-Monachelli G.^{1,3}; Hunt H.⁴; González Deniselle M.^{1,2}; De Nicola A.^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET¹; Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; Servicio de Neurología, Hospital Fernández³; CORCEPT Therapeutics, California, USA⁴.

La neuropatología de la mutación Wobbler (Wr) presenta signos comunes con la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), observándose además déficit de neurogénesis, astrogliosis del

hipocampo e hipercorticoidismo. Dado que los glucocorticoides aumentan la vulnerabilidad del hipocampo, estudiamos si el modulador de GR CORT108297 con afinidad nula por receptores de otros esteroides, restaura parámetros hipocámpales del Wr. Wr genotipificados de 3 meses recibieron vehículo o 3.5 mg/día/ 4 días de CORT 108297, determinándose los neuroblastos doble-cortina (DCX+) en la capa granular del giro dentado y astrogliosis por conteo computarizado. El número de células DCX+ del Wr (4571 ± 342 por giro dentado) fue menor a controles NFR/NFR (7757 ± 609, $p < 0.01$), mientras que se regularizaron en el grupo Wr + CORT108297 (6977 ± 413, $p < 0.01$ vs. Wr). CORT108297 no cambió la hipercorticosteronemia del Wr (control: 91 ± 26; Wr: 453 ± 105; Wr + CORT108297: 372 ± 60 ng/ml). La astrogliosis hipocámpal GFAP+ del Wr (1157 ± 96 astrocitos/mm²) fue también regularizada por CORT108297 (782 ± 59; $p < 0.01$). En ratones controles NFR/NFR, el número de neuroblastos DCX+ (9343 ± 1277 por giro dentado) se redujo cuando recibieron corticosterona 5 mg/día/ 5 días (5681 ± 520, $p < 0.05$) y restauró al recibir corticosterona + CORT108297 (9278 ± 783, $p < 0.01$ vs. corticosterona). La normalización de progenitores neuronales y astrogliosis por el CORT108297, sugiere que la activación de los RG esta involucrado en los cambios del hipocampo del Wr. Los resultados brindan expectativas terapéuticas para las alteraciones del hipocampo de pacientes con ELA.

182. (40) EXPRESIÓN TEMPORAL DE CITOQUINAS Y EFECTOS MODULADORES DE PROGESTERONA EN LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO

Coronel M.¹; Labombarda F.^{2,3}; De Nicola A.^{2,3}; González S.^{1,3}

Laboratorio de Nocicepción y Dolor Neuropático, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³.

Las lesiones del sistema nervioso producen dolor neuropático refractario a los tratamientos disponibles. Dado que la activación glial y la producción de factores proinflamatorios refuerzan circuitos neuronales de dolor y representan blancos terapéuticos, evaluamos el efecto de Progesterona (PG), esteroide neuroactivo, sobre la conducta neuropática y la expresión temporal de citoquinas en un modelo de dolor crónico por injuria espinal. Ratas macho Sprague-Dawley controles (C) o con hemisección espinal fueron inyectadas diariamente con PG (16 mg/kg sc; HX+PG) o vehículo (HX). La conducta neuropática (alodinia) se evaluó utilizando los tests de von Frey y Choi. Los animales se sacrificaron a diferentes días post lesión (1d, 14d o 28d). Los ARNm de IL1 β , IL6 y se determinaron por RT-PCR en tiempo real y se cuantificaron las TNF α células inmunoreactivas para GFAP (astrocitos) y OX42 (microglia). PG previno el incremento de los ARNm de las 3 citoquinas inducido por la injuria a 1d y 14d ($p < 0.001$ vs HX, $p > 0.05$ vs C) y disminuyó el número de células GFAP y OX42 positivas en la fase aguda y a 28d post lesión ($p < 0.01$ vs HX, $p < 0.01$ vs C). En concordancia, PG previno el desarrollo de alodinia mecánica y térmica ($p < 0.01$ vs HX, $p > 0.05$ vs C). Además, evaluamos si la administración de PG por sólo 14 d resultaba efectiva en el largo plazo. A los 28d, la respuesta de los animales HX+PG resultó claramente no alodínica, aún suspendido el tratamiento ($p < 0.01$ vs HX, $p > 0.05$ vs C). En estos animales la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA y de la enzima proteína quinasa C gamma (PKC γ), moléculas claves para la activación neuronal y el comportamiento alodínico, resultó significativamente menor a los HX ($p < 0.01$) y similar a la del grupo C ($p > 0.05$). En conclusión, nuestros datos sugieren que PG, administrado durante la fase proinflamatoria, resulta eficaz para prevenir el desarrollo de dolor crónico luego del daño medular (Fundación MAPFRE, PIP CONICET 112-20110100576).

183. (70) ORIGEN DE LA CONEXIÓN NEUROINMUNE SIMPÁTICA EN EL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA MUCOSA NASAL (NALT) DEL HÁMSTER

Scacchi Bernasconi P.; Marafetti L.; Romeo H.
Facultad de Medicina, Universidad Católica Argentina.

En los roedores, las estructuras equivalentes al adenoides humano, están constituidas por el tejido linfoide asociado a la mucosa nasal (NALT). Estos tejidos consisten en dos agregados linfoides de forma tubular que se encuentran localizados bilateralmente en la entrada de los conductos nasofaríngeos, y constituyen una primera línea de defensa ante potenciales infecciones. Aunque, tanto las características morfológicas como su función inmunológica, han sido caracterizadas, no existe información disponible sobre la presencia y el origen de fibras nerviosas autonómicas simpáticas en el NALT. Se utilizó el hámster (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental. La inyección del trazador neuronal Fluro-Ruby (FR) en el ganglio cervical superior (GCS) revela la presencia de fibras nerviosas FR-fluorescentes en el NALT ipsilateral al GCS inyectado pero no en el NALT contralateral. Utilizando técnicas inmunocitoquímicas y un anticuerpo anti-VMAT2, marcador específico de la inervación simpática, caracterizamos la distribución de la inervación sobre las distintas estructuras anatómicas que conforman el NALT. Todas las neuronas del GCS expresan una marcada inmunoreacción para VMAT2. En el NALT, fibras nerviosas VMAT2 inmunoreactivas (VMAT2-ir) se distribuyen ampliamente sobre la vasculatura y el subepitelio. Se detectó también la presencia de fibras VMAT2-ir, aunque con menor densidad, sobre los componentes linfoides del NALT. La existencia de fibras VMAT2-ir en contacto directo con células potencialmente inmunocompetentes se visualizó con una gran magnificación en los nódulos linfoides. Finalmente, la ablación quirúrgica unilateral del GCS (GCSx) provoca la completa desaparición de las fibras nerviosas VMAT2-ir en todos los compartimientos del NALT. El efecto de la GCSx solo se verifica en el NALT ipsilateral. Esta investigación nos permite establecer el origen de la inervación simpática así como la existencia de una conexión neuroinmune en el NALT del hámster.

184. (80) N-BUTIL-1,2,3-OXATIAZOLIDIN-4-ONE-2,2-DIÓXIDO: UN NUEVO COMPUESTO ANTICONVULSIVANTE CON EFECTOS ANTIDEPRESIVOS. POSIBLE ROL DE LOS CANALES DE SODIO

Pastore V.^{1,2}; Wasowski C.¹; Bruno-Blanch L.²; Marder M.¹
Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica¹; Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata².

Introducción: La epilepsia es el trastorno neurológico serio más frecuente que afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo. A partir del diseño racional de nuevos fármacos anticonvulsivos se han sintetizado heterociclos de denominación general 1, 2, 3 oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido, de los cuales el compuesto N-butil-1,2,3-oxatiazolidin-4-ona-2,2-dióxido (NBOD), un bioisómero de la trimetadona (anticonvulsivante clásico) surgió como el más promisorio. La NBOD mostró propiedades anticonvulsivantes en los ensayos MES (maximal electroshock seizure) y scPTZ (pentileneetetrazol subcutáneo), en ratones, con ED₅₀ de 0.06 mg/kg y 18 mg/kg, respectivamente. La depresión es común en los pacientes con epilepsia y se correlaciona con una pobre calidad de vida. La búsqueda continua de drogas más seguras y efectivas con propiedades tanto anticonvulsivantes como antidepresivas es imperativo y constituye un reto para la química medicinal. **Objetivos** Determinar si la NBOD presenta efectos antidepresivos y estudiar su mecanismo de acción. **Diseño del Estudio:** Se utilizaron ratones Swiss macho de 2 meses y medio de edad, inyectados intraperitonealmente (i.p.) con vehículo, imipramina (20 mg/kg, referencia) o NBOD (3, 10, 30 mg/kg). Se realizaron los siguientes ensayos: nado forzado (FST), suspensión por la cola (TST), laberinto en cruz elevado (EPM) y actividad locomotora. Para bloquear la acción antidepresiva se utilizó veratrina, un activador selectivo de los canales de sodio. **Resultados:** La NBOD produce efectos antidepresivos, bloqueados por veratrina, en el FST y TST, los modelos más utilizados para evaluar esta actividad en roedores, sin modificar la actividad locomotora ni los

niveles de ansiedad en el EPM. **Conclusiones:** La NBOD es un compuesto promisorio con acción dual como anticonvulsivante y antidepressivo en cuya acción estarían involucrados los canales de sodio.

185. (91) LA EXPOSICIÓN A ISQUEMIA IN VIVO E IN VITRO INDUCE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TOLL-LIKE 4 (TLR4) EN CÉLULAS GLIALES.

Rosciszewski G.¹; Villareal A.¹; Lukin J.¹; Thierry R.²; Ramos A.¹
Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. E. de Robertis" (IBCN)-CONICET¹; Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suiza².

Las células de la glía reaccionan ante una injuria con un mecanismo genérico denominado gliosis reactiva (GR). Aunque la GR puede ser benéfica para la sobrevida neuronal, la conversión de la glía hacia un fenotipo proinflamatorio induce neurodegeneración. Los receptores tipo toll (TLR) responden a moléculas liberadas por las células en necrosis (DAMP) y podrían estar involucrados en la GR. Para estudiar la participación de los receptores tipo toll 4 (TLR4) en este fenómeno utilizamos ratas cepa Wistar sometidas a una isquemia cortical y cultivos primarios de células gliales expuestas a una privación de oxígeno y glucosa (OGD) o transfectados con plásmidos que inducen la expresión de TLR4 y TLR2. La isquemia cerebral indujo la expresión de TLR4 en neuronas y células de la glía de la penumbra isquémica. La máxima expresión se observó a los 7 días post-isquemia (7DPI). Estudios de comaración y microscopía de fluorescencia demostraron que tanto astrocitos como microglia expresan TLR4 en estas condiciones. In vitro, la exposición de cultivos gliales a OGD indujo la expresión de TLR4, TLR2, el adaptador MyD88 y el gen NFκB dependiente IκB. La expresión de TLR4 o TLR2 en astrocitos naïve indujo un aumento de la sensibilidad a ligandos tipo DAMP (HMGB1) o PAMP (LPS), un aumento de la localización nuclear de p65 (subunidad de NFκB) y cambios morfológicos compatibles con un fenotipo GR. Nuestros resultados indican que TLR4 se induce en la isquemia cerebral y que su presencia incrementa la sensibilidad de la glía a ligandos tipo DAMP, induciendo una activación sostenida de NFκB y cambios morfológicos gliales, lo que indicaría su participación en el fenómeno de GR. Subsidios: PICT 2008-1590, PIP CONICET 1728, UBACYT

186. (113) VARIACIONES ABSOLUTAS Y PORCENTUALES DE SUPERFICIES DEL LÓBULO PREFRONTAL DE AMBOS SEXOS EN IMAGENES PARASAGITALES DE RESONANCIA MAGNÉTICA RELACIONADAS A SU DIMENSIÓN Y A LA EDAD (20 A 84 AÑOS)

Merlo A.; Albanese A.; Mino J.; Gomez E.; Albanese E.
Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, Buenos Aires.

En trabajos previos mostramos que superficies del lóbulo prefrontal (LPF) de 61 a 84 años en ambos sexos disminuyen significativamente. **Objetivo:** Determinar en imágenes parasagitales de resonancia magnética (IPRM) del LPF variaciones de valores absolutos y porcentuales de superficies que lo integran, en relación al sexo y a la edad (20 a 84 años) y a la superficie total del LPF homolateral. **Material y método:** Usando reparos anatómicos se delimitaron y midieron de dorsal a ventral en IPRM del LPF de cada hemisferio las superficies que denominamos dorsal (D), media (M) y ventral (V) y se calculó el aporte porcentual de D, M y V al total (D+M+V) homolateral. Los valores absolutos y porcentuales, por sexo, se correlacionaron (r de Pearson) con la edad y los aportes porcentuales con la superficie total (D+M+V) homolateral. **Resultados:** Las r entre valores absolutos de D, M y V y edad son negativos. Para D+M+V y edad los r (p<0.01) en el hemisferio derecho e izquierdo femenino son -0.68 y -0.63 y en el masculino -0.61 y -0.67. Los r entre porcentajes D, M y V y edad en ambos sexos son estadísticamente significativos. Los del grupo femenino en el hemisferio derecho son -0.42; -0.30 y 0.43 y en el izquierdo -0.32, -0.31 y 0.36. Los r del grupo masculino en el hemisferio derecho son -0.42, -0.41 y 0.56 y en el izquierdo -0.55, -0.30 y 0.62. Los r entre porcentajes D, M y V y superficie

total homolateral son estadísticamente significativos. Los del grupo femenino en el hemisferio derecho son 0.30; 0.31 y -0.32 y en el izquierdo 0.30; 0.32 y -0.34. Los r del grupo masculino en el hemisferio derecho son 0.57; 0.38 y -0.69 y en el izquierdo 0.40; 0.30 y -0.42. **Conclusión:** En ambos sexos de 20 a 84 años las superficies del LPF caen en valor absoluto con modificación de sus cantidades relativas (baja el% de D y M y sube el% de V). Estos resultados son coherentes con los observados al aumentar la superficie del LPF (sube el% de D y de M y baja el% de V).

187. (154) EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE VITAMINA E EN MIGRAÑA EXPERIMENTAL CON CAPSAICINA

Balceda A.¹; Baez M.^{1,2}; Buonanotte F.³; Buonanotte C.³; Taran M.¹; Scribano-Parada M.^{1,3}; Blencio S.¹; Saadi N.¹; Moya M.¹

Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud Humana, Universidad Nacional de La Rioja²; Servicio de Neurología, Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba³.

En migraña, los procesos que promueven los cambios oxidativos e inflamatorios vasculares sistémicos tendrían un importante papel en el mecanismo de mantenimiento del status crónico de la misma. La elevación persistente de marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo en sangre periférica en sujetos migrañosos ha dirigido el interés de numerosas investigaciones en torno a posibles tratamientos farmacológicos capaces de retrotraerlos con la intención de modificar los accesos de dolor. El objetivo fue analizar los efectos de vitamina E (VE) sobre los niveles plasmáticos elevados de fibrinógeno (F) (marcador inflamatorio) y óxido nítrico (NO) (marcador oxidativo) en migraña experimental en ratas. Se utilizaron 36 ratas machos Wistar en 3 grupos de 12: Control (A), Activación trigeminal (B) y tratado con VE 125 UI/día/rata (C). La activación trigeminal se realizó mediante 3 inyecciones, una cada 72 hs de capsaicina 1 mM en aferencias trigeminales temporomandibulares. La administración de VE se realizó 10 días a partir de la primera inyección de capsaicina. La determinación de F (mg/dl), según la técnica de Ratnoff y Menzic, y de NO (mM) mediante reacción de Griess se cuantificaron por espectrofotometría. Los resultados se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks modificada y el análisis de la varianza (ANAVA). Se estableció una p<0.05 para todos los casos. En (B), F aumentó significativamente (253 ± 12mg/dl) vs. el control (A) (193 ± 7 mg/dl) (p<0.05); en (C) VE disminuyó F a valores control. NO disminuyó en (B) (10,09 mM ± 0,71) significativamente con respecto al control (A) (22,80 mM ± 2,83), en (C) sus valores no mostraron diferencia significativa con (A). En migraña experimental, VE tendría un efecto protector ante los cambios oxidativos vasculares al reducir la concentración de F y restituir la biodisponibilidad de NO.

188. (227) EFECTO PROTECTOR DE LA SIMVASTATINA SOBRE LA LÍNEA NEURONAL HUMANA SHSY-5Y A CONTAMINANTES PARTICULADOS

Ferraro S.¹; Yakisich J.²; Tasat D.³

Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente, Universidad Nacional de San Martín¹; Comisión de Investigaciones Científicas²; Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires³.

Estudios epidemiológicos han asociado la contaminación ambiental aérea (gases y material particulado-MP-) con efectos adversos sobre la salud contribuyendo con el 6% de la mortalidad anual. A nivel cerebral, la exposición a MP esta asociado a un bajo coeficiente intelectual, autismo y a enfermedades neurodegenerativas. ROFA (Residual Oil Fly Ash), un conocido MP, induce la generación de anión superóxido (O₂⁻) y la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNFα). El objetivo de este trabajo fue evaluar en un sistema *in vitro* basado en la línea celular de neuroblastoma humano SHSY-5Y, el efecto protector de la simvastatina (SV) sobre los efectos adversos de la exposición a ROFA. La SV es una droga con propiedades antiinflamatorias,

inmunomoduladoras o antiproliferativas. Los cultivos celulares fueron pretratados con SV (1 μ M) durante 6 días y luego expuestos a ROFA (1-5-10 μ g/ml) durante 24 hs. Se evaluaron viabilidad celular (MTT), O_2^- (test del NBT), óxido nítrico (NO), IL-6, TNFa y apoptosis mediante inmunocitoquímica de dos marcadores apoptóticos (caspasa 3 y PARP clivados). ROFA disminuyó la viabilidad del cultivo celular siendo significativo para la mayor dosis analizada (C:0,901 \pm 0,01 vs R10:0,68 \pm 0,06 UA, $p < 0,01$); incrementó la generación de O_2^- (C: 13,1 \pm 3,8% vs R1: 68,9 \pm 3,8%, R5: 74,9 \pm 4,9%, R10: 62,4 \pm 5,7%, $p < 0,01$) y provocó la inducción de apoptosis (aumento en la marcación inmunocitoquímica). No se observaron diferencias en los niveles de NO ni en la liberación de TNFa y IL-6. El pretratamiento con simvastatina fue capaz de disminuir el impacto causado por ROFA, para la viabilidad celular (Sv+R10: 0,85 \pm 0,03 UA vs R10, $p < 0,01$), en la generación de O_2^- (Sv+R1: 37,2 \pm 1,9%, Sv+R5: 34,5 \pm 2,4%, Sv+R10: 40,7 \pm 2,8% vs R1, R5 y R10 respectivamente, $p < 0,01$) y en la inducción de apoptosis (ausencia de marca inmunocitoquímica). En conclusión, el pretratamiento con simvastatina reduce el efecto adverso provocado por ROFA sobre la línea neuronal humana SHSY-5Y.

189. (263) ESTUDIO DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DEL COBRE: DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN CORTEZA, HIPOCAMPO Y CUERPO ESTRIADO DE CEREBRO DE RATA

Saporito Magriñá C.; Musacco Sebío R.; Semprín. J.; Araujo J.; Repetto M.

Cátedra de Química General e Inorgánica, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El cobre (Cu) es un biometal esencial en numerosos procesos biológicos, presenta el fenómeno de hormesis: a concentraciones bajas produce deficiencia, y a concentraciones elevadas es tóxico para el organismo. El objetivo de este trabajo es determinar las áreas del cerebro afectadas en la toxicidad mitocondrial del cobre para caracterizar los cambios bioquímicos asociados al daño oxidativo. Ratas Sprague Dawley machos (150 g, 40 días de edad) recibieron Cu(II) en el agua de bebida (0,5 g/L) durante 21 días. Se sacrificaron los animales, se obtuvo el cerebro y se separó el hipocampo, la corteza y el cuerpo estriado para posteriormente aislar las mitocondrias de las mismas. En mitocondrias aisladas se midió el consumo de oxígeno y la actividad de los complejos I y II. Después de la sobrecarga de Cu, el consumo de oxígeno (Δ_{O_2}) de las mitocondrias de corteza cerebral con malato-glutamato como sustrato aumentó 13% en el estado 3 (control, 76 \pm 3 ng-atO/min.mg proteína, $p < 0,01$) y 19% en el estado 4 (Control, 13,5 \pm 0,5 ng-atO/min.mg proteína $p < 0,01$). En condiciones similares, en mitocondrias de hipocampo y en mitocondrias de cuerpo estriado no se vieron cambios significativos en el Δ_{O_2} . La actividad del complejo mitocondrial I-III solo se vio afectada en el cuerpo estriado, disminuyendo un 13% a los 14 días (control, 270 \pm 18 nmol/min.mg proteína). La actividad del complejo II se vio aumentada en corteza a los 14 días en un 32% (control, 75 \pm 13 nmol/min.mg proteína, $p < 0,05$), en hipocampo a los 14 días aumentó 22% (control, 75 \pm 2 nmol/min.mg proteína, $p < 0,01$) y en cuerpo estriado aumentó 25% (control, 75 \pm 4 nmol/min.mg proteína, $p < 0,01$). El cobre afecta selectivamente el consumo de oxígeno mitocondrial y la actividad de complejos de la cadena respiratoria en las distintas áreas cerebrales. Las alteraciones en la actividad de los complejos podrían ser consecuencia de una funcionalidad mitocondrial alterada a causa del efecto del metal sobre las proteínas y sobre las membranas.

190. (286) DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEURITIS ÓPTICA

Aranda M.; Sande P.; Dorfman D.; Rosenstein R. *Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

La neuritis óptica (NO) es una neuropatía aguda inflamatoria y desmielinizante del nivel del nervio óptico que puede provocar un déficit visual permanente. La búsqueda de modelos experimen-

tales para el estudio de la NO ha sido hasta ahora relativamente poco fructífera, lo que ha limitado la investigación en el área. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de NO en ratas, a través de la microinyección de LPS en el nervio óptico. Se utilizaron ratas *Wistar* macho adultas que recibieron una inyección LPS (4,5 mg en 1 μ l) en el nervio óptico, a nivel superficial y a 2 mm por detrás del globo ocular. Los nervios contralaterales se inyectaron con vehículo. Se analizó la función de la vía visual a través del registro de potenciales visuales evocados (VEPs) y la función retiniana mediante el registro de electroretinogramas (ERGs) escotópicos y de Potenciales Oscilatorios (POs). En comparación con los nervios inyectados con vehículo, la amplitud de los VEPs disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en los días 1, 4, 7 y 21 post-inyección de LPS, sin afectar el ERG, ni los POs. No se observaron diferencias en la estructura de la retina. El estudio histológico del nervio óptico indicó una marcada desorganización axonal, y un aumento en la inmunomarcación para la proteína gliofibrilar ácida (marcador de astrocitos) y para Iba-1 (marcador de microglía activada) en cortes longitudinales de nervio óptico a los 4 y 7 días post-inyección de LPS, respecto a los nervios ópticos inyectados con vehículo. El transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina colérica entre la retina y el colículo superior disminuyó notablemente en los nervios ópticos inyectados con LPS. En suma, estos resultados indican que la inyección de LPS produce alteraciones locales a nivel del nervio óptico que reproducen características centrales de la NO humana. Este modelo podría constituir una herramienta útil en la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad.

191. (350) EL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT1 DE ANGIOTENSINA II PREVIENE EL DÉFICIT COGNITIVO Y LOS CAMBIOS INFLAMATORIOS Y MORFOLÓGICOS EN UN MODELO ANIMAL DE DEMENCIA TIPO ALZHEIMER

Marinzalda M.¹; Casarsa B.¹; Bregonzio C.²; Baiardi G.¹ *UCC-IByT-CONICET¹; Departamento de Farmacología, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba².*

El Sistema Renina-Angiotensina cerebral participa en funciones cognitivas superiores tales como el aprendizaje y la memoria y en mecanismos fisiopatológicos mediados por procesos inflamatorios. En el presente trabajo se estudió el rol de la angiotensina II cerebral en un modelo animal de demencia provocado por la inyección intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ). Ratas macho *Wistar* de peso 290-340 g fueron tratadas vía oral con un bloqueante de los receptores AT1 (candesartan, 3 mg/kg) o vehículo; y con un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (captopril, 30 mg/kg) o vehículo 12 días previos y durante 13 días posteriores a la administración de dos dosis de STZ ICV (3 mg/kg) con un intervalo de 48 hs entre ambas. 11 días posteriores a la primera inyección de STZ se realizó la prueba del laberinto de Morris para evaluar la memoria de trabajo. Luego de la realización del test se procedió a la extracción de los cerebros con el fin de evaluar el volumen de los ventrículos laterales, previa extracción del líquido cefalorraquídeo, donde se midió por el método de ELISA TNF α como marcador de inflamación. Los resultados fueron analizados por ANOVA I y II. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. La STZ provocó un deterioro en la memoria de trabajo así como un aumento en el volumen de los ventrículos laterales y un aumento en los niveles de TNF α del líquido cefalorraquídeo. Tanto el bloqueante de los receptores AT1 como el inhibidor de la ECA lograron prevenir el déficit cognitivo observado en la prueba de Morris. Por otro lado, candesartan, además logró prevenir la dilatación de los ventrículos laterales y el aumento del TNF α , lo cual no se observó en los animales tratados con captopril. Por lo que concluimos que los receptores AT1 de angiotensina II cerebral cumplen un rol clave en los procesos inflamatorios tempranos que conducen al deterioro en la memoria de trabajo inducidos por la inyección ICV de STZ.

192. (391) SISTEMA GÉNICO REGULABLE BIDIRECCIONAL PARA TIMULINA Y GFP: CARACTERIZACIÓN IN VIVO DE SU FUNCIONALIDAD Y REGULABILIDAD

Zappa Villar M.*^{1,2}; López León M.*^{1,2}; Pardo J.^{1,2}; Reggiani P.^{1,2} (*Igual Participación)
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP)-CONICET¹; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata².

La timulina posee actividad inmunomoduladora; es capaz de modular procesos inflamatorios a nivel central, periférico y local, y procesos analgésicos en el SNC. Recientemente hemos implementado exitosamente terapia génica neuroendocrina con esta hormona en modelos animales de timodeficiencia. Con el fin de disponer de una herramienta más flexible y sofisticada que nos permita ampliar nuestros estudios sobre los efectos terapéuticos de la timulina con una mejor manipulación y control sobre su producción, construimos un sistema génico bidireccional regulable Tet-Off que simultáneamente expresa el gen del *meFTS* (análogo de timulina) y de la proteína verde fluorescente (GFP), ambos bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina (DOX), denominado RAd-(GFP-TRE-FTS)-(tTA). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar dicho sistema en el cerebro (i.c.v.), hipófisis y músculo (i.m.) de la rata, evaluando su funcionalidad y regulabilidad. El adenovector (RAd) se administró bilateralmente en los ventrículos laterales (2×10^8 pfu/rata), en la adenohipófisis (4×10^7 pfu/rata) y en el músculo tibial (1×10^8 pfu/rata). La expresión de GFP se determinó por observación microscópica y la timulina fue medida por un bioensayo de rosetas. El RAd mostró ser activo en todos los tejidos estudiados. En el músculo estriado se logró una expresión a largo plazo de los transgenes; observándose un aumento de timulina sérica ($P < 0.05$ vs. RAd-control) hasta el día 45 post-inyección y de la expresión de GFP (75-100% de los cortes de músculos vs. 5-33% con agregado de DOX) detectada hasta el día 15 post-inyección. En las hipófisis y en el epéndimo se observó fluorescencia de GFP hasta el día 5 y 20 post-inyección, respectivamente. Asimismo, dicho sistema Tet-Off manifestó una eficiente regulación de la expresión génica en el músculo y cerebro de la rata por el agregado de DOX. La expresión de la GFP permitió identificar fácilmente la coexpresión de timulina recombinante.

193. (406) EFECTO DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2Y1 SOBRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS EN LA REGENERACIÓN RETINIANA

Bejarano C.; Battista A.; Faillace M.
Laboratorio de Neurociencia, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires e Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET.

Durante el proceso de regeneración retiniana, una población de células de Müller reingresa al ciclo celular, entre 24-72h posteriores al daño, para generar células progenitoras neuronales y gliales (CP) que continúan proliferando, migran y se diferencian en los distintos tipos celulares. Se estudió el rol de los nucleótidos extracelulares endógenos (NE) y del receptor purinérgico P2Y1 (P2Y1R) en la regulación de la proliferación de las posibles células de Müller y de las CP luego de inyecciones intravítreas con ouabaína $12 \mu\text{M}$ (OUA), que provoca muerte celular en todas las capas de la retina del pez cebra (*Danio rerio*). Un lote de peces fue inyectado con: OUA el día 0 (lesionado), solución fisiológica (SF) de 1-3 días postlesión (dpi) y SF+BrdU ($20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) de 4-7 dpi. Otro lote de peces fue inyectado con: SF de 0-3 dpi (control salino) y SF+BrdU de 4-7 dpi. Un tercer grupo fue inyectado con: OUA el día 0, MRS2179 (antagonista del P2Y1R) de 1-3dpi y MRS2179+BrdU de 4-7dpi. Otros grupos de peces, se lesionaron con OUA o SF y se inyectaron con BrdU 5 h previas al sacrificio a los 2 y 6 dpi. Se realizó inmunofluorescencia doble para detectar células positivas para BrdU y el P2Y1R sobre cortes de tejido a 2, 6 y 7 dpi. Se detectaron y cuantificaron los niveles de ARNm de los receptores purinérgicos mediante las técnicas de RT-PCR estándar y cuantitativa. Los NE actuarían sobre los P2Y1R ubicados en la membrana de algunas de las CP para inducir su actividad proliferativa. Además, los niveles del ARNm y la proteína del P2Y1R mostraron un incremento significativo durante la etapa proliferativa. A su vez, se observó un cambio en la distribución espacial del

P2Y1R. Por otro lado, existe una disminución significativa de la proliferación en el lote tratado con MRS2179. Se propone que los NE actuando vía el P2Y1R son señales necesarias para inducir la proliferación de posibles células de Müller (2 dpi) así como de CP (6 y 7 dpi) durante el pico de proliferación.

194. (461) EXPRESIÓN Y ROL FUNCIONAL DEL RECEPTOR NICOTÍNICO ALFA 7 NEURONAL EN CÉLULAS CITO-TÓXICAS NATURALES

Zanetti S.¹; Dionisio L.¹; Ziblat A.²; Zwirner N.²; Bouzat C.¹
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET².

El receptor nicotínico alfa7 ($\alpha 7$) se encuentra en sistema nervioso donde media la entrada de calcio en respuesta a acetilcolina (ACh) e interviene en cognición, plasticidad sináptica, y neuroprotección. Además, se lo ha detectado en células no neuronales como los linfocitos T y macrófagos, donde su rol es menos claro. En este trabajo investigamos la expresión de $\alpha 7$ y su posible rol funcional en células citotóxicas naturales (NK) humanas. Mediante PCR y PCR en tiempo real detectamos expresión de mRNA $\alpha 7$, indicando que estas células también expresan $\alpha 7$. Dicha expresión aumenta aproximadamente 3 veces en células NK activadas durante 48 h con IL-12, IL-18 e IL-15. En esta condición, las células NK también expresan colina acetiltransferasa, enzima involucrada en la síntesis de ACh. Para determinar la presencia del receptor en membrana plasmática evaluamos la unión de α -bungarotoxina-Alexa488 (α -Bgt, antagonista específico de $\alpha 7$) por microscopía confocal y citometría de flujo. Observamos que las células NK en reposo unen α -Bgt, pero la intensidad de fluorescencia aumenta luego de la estimulación. Además, mediante microscopía confocal y utilizando la sonda Fluo-3/AM detectamos un aumento de la fluorescencia de 1,5-2,5 veces con respecto al basal luego del agregado de nicotina (agonista nicotínico) en células NK activadas, demostrando así que los canales de $\alpha 7$ son funcionales dado que median ingreso de calcio. Por último, al incubar células NK con IL-12, IL-18 e IL-15 observamos una disminución en la producción de IFN- γ en presencia $10 \mu\text{M}$ de nicotina. Este efecto se incrementa en presencia de PNU-120596, que actúa como potenciador de $\alpha 7$. Estos resultados sugieren que las células NK expresan receptores $\alpha 7$ que modularían la funcionalidad de las células NK durante su activación por citoquinas de relevancia durante el diálogo recíproco con células dendríticas, lo que podría repercutir en la inmunidad anti-tumoral y anti-viral, donde las células NK juegan un rol clave.

195. (487) ANÁLISIS DE SEÑALES ACTIGRÁFICAS OBTENIDAS EN PLATAFORMAS EN MOVIMIENTO MEDIANTE TÉCNICAS DE FILTRADO SELECTIVO

Gallardo J.^{1,3,7}; Diez J.²; Cardinali D.^{2,3}; Pérez Chada D.⁴; Golombek D.^{3,5}; Nicola Siri L.⁶; Vigo D.^{2,3}
UdeMM¹ Pontificia Universidad Católica Argentina²; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³; Universidad Austral⁴ Universidad Nacional de Quilmes⁵; Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos⁶ Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires (UTN FRBA)⁷

La actigrafía es un método de monitoreo no invasivo de períodos de actividad y descanso. Esta información es analizada a través de algoritmos que determinan patrones de sueño – vigilia, en conjunto con información obtenida a través de agendas de sueño. Presenta especial aplicación para el estudio de trastornos del sueño por alteraciones del ritmo circadiano como avances y retrasos de fase o trabajo en turnos. Estos últimos se ven en profesionales de la industria del transporte. En ellos, la actigrafía obtenida en vehículos en movimiento es muy difícil de interpretar, debido a los movimientos generados durante la circulación del vehículo. Se presenta aquí un algoritmo de filtrado que permite separar la señal generada por un sujeto de la generada por el vehículo en movimiento. El algoritmo se basa en la descomposición en valores singulares de la matriz obtenida de la señal y la determinación

del número mínimo de estos valores, necesarios para componer una nueva señal filtrada. Se aplicó este algoritmo al estudio de 16 periodos de sueño y 16 periodos de actividad obtenidos de 16 señales actigráficas de conductores de larga distancia. Los datos de actividad-reposo se cotejaron con los obtenidos luego del análisis visual de las señales por dos expertos independientes. Se evaluó el nivel de concordancia de los datos mediante el índice Kappa de Cohen. Se observaron 30 coincidencias, con una sensibilidad y especificidad del 94%, y un índice Kappa de $0,875 \pm 0,086$. Este nivel de concordancia es considerado como "muy bueno". Se logró desarrollar un algoritmo que filtra la señal de actigrafía del conductor de la ocasionada por el movimiento del vehículo, minimizando los tiempos y facilitando el análisis. Futuros estudios deberán determinar la validez de la técnica contrastándola con polisomnografía, considerado el gold-standard para la determinación de periodos de sueño.

196. (513) ESTUDIO SOBRE LA PROBABILIDAD DE HEREDAR CONJUNTAMENTE DEGENERACION DE RETINA Y CATARATAS EN PERRO

Sande P.¹; Lagioiosa J.²; Álvarez J.²; Rosenstein R.¹
Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET¹; Práctica Privada².

Diversas evidencias indican que algunas razas de perro tienen alta incidencia de enfermedades hereditarias, en particular cataratas y degeneración retiniana (DHR). El registro de electroretinogramas (ERGs) es un método diagnóstico para analizar la función de la retina. El objetivo de este trabajo fue caracterizar una población de perros con cataratas de acuerdo con la raza, edad y presencia de DHR, así como determinar la probabilidad de asociación de cataratas y DHR con la edad y la raza. Se registraron ERGs en 312 perros con cataratas bilaterales, sin alteraciones del reflejo pupilar u otras alteraciones del globo ocular (glaucoma, uveítis o desprendimiento de retina). Los perros fueron clasificados según la raza en: Cocker Spaniel, Caniche, Fox terrier y otras razas; según la edad en: jóvenes (0 - 3 años), adultos (4 - 7 años) y gerontes (mayores de 8 años), y según el ERG en: plano, subnormal o normal. Los datos se analizaron con el programa PROC LOGISTIC, SAS, versión 9.1.3. Los resultados indican que un 40% de la población analizada presentaban DHR. De esta población, 59,8% eran Cockers, 41,5% Caniches, 23% Fox terriers y 18,4% pertenecían a otras razas. Según la edad, 46,7% eran gerontes, 40,2% adultos y 7,9% jóvenes. La asociación de DHR y cataratas para los Cockers fue de 2,66 ($p < 0,001$), para los Caniches: 1,57 ($p < 0,05$), para los Fox terriers: 0,59 ($p < 0,001$) y para otras razas: 0,41 ($p < 0,001$). La probabilidad estimada para cada grupo etario fue: 2,55 ($p < 0,001$); 1,50 ($p < 0,01$) y 0,26 ($p < 0,01$) para gerontes, adultos y jóvenes, respectivamente. Estos resultados avalan la alta incidencia de DHR en Caniches y Cockers con cataratas, así como en perros mayores de 4 años con cataratas. Caniches y Cockers con cataratas tienen mayor riesgo de desarrollar DHR, en tanto que esta asociación no fue evidente en Fox terriers. Por último, los pacientes gerontes tienen un mayor riesgo de desarrollar DHR.

197. (574) FORMAS FOSFORILADAS DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES EN LA RETINA

Marquioni Ramella M.¹; Marazita C.¹; Galigniana M.²; Suro A.¹
Universidad Austral¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

El receptor de glucocorticoides (GR) puede ser fosforilado en diversas serinas. A nivel de Ser²¹¹ (p-Ser²¹¹-GR), la fosforilación requiere la unión al ligando, que no es necesaria para la fosforilación de Ser²⁰³ (p-Ser²⁰³-GR). Previamente sugerimos que los glucocorticoides (GC) podrían tener un efecto directo sobre los segmentos externos de los fotorreceptores, por lo que aquí analizamos estas formas fosforiladas bajo distintas condiciones

de iluminación. Se emplearon ratones Balb-c, hembras, de 5-7 semanas de edad, criados bajo iluminación cíclica (12 hs 60 lux: 12 hs oscuridad). Se tomaron muestras a mediodía y después de exposición a oscuridad prolongada (OP, 7 días). Se hicieron Western blots de retinas totales o de segmentos externos (SE) aislados en horario diurno. También se efectuaron estudios inmunoenzimáticos o inmunofluorescentes, utilizándose anticuerpos contra GR, p-Ser²¹¹-GR, p-Ser²⁰³-GR, FKBP52, una inmunofilina asociada a GR, y tubulina. En los Western blots de retinas enteras se observó inmunorreactividad (IR) para GR, p-Ser²⁰³-GR y p-Ser²¹¹-GR, pero en los SE sólo se visualizaron GR y p-Ser²⁰³-GR. En los cortes de retina se observó GR-IR en todos los núcleos celulares y en los terminales sinápticos de la capa plexiforme externa (CPE). La p-Ser²¹¹-GR-IR era exclusivamente nuclear. No se detectaron cambios significativos asociados a la iluminación. p-Ser²⁰³-GR-IR apareció en los SE y en la CPE, junto con FKBP52-IR. Ambos marcadores se modificaron según las condiciones de iluminación, aumentando después de OP. La presencia de GR- y p-Ser²⁰³-GR-IR apoya la hipótesis de una acción directa de los GC sobre los SE y el pedículo sináptico de los fotorreceptores. Los cambios inducidos por la oscuridad sugieren que p-Ser²⁰³-GR podría modular la supervivencia de los fotorreceptores en ambientes fototóxicos, tal vez en forma no-genómica.

198. (611) EFECTO DE TIANEPTINA SOBRE RECEPTORES DE GLUCO- Y MINERALO- CORTICOIDES EN AMÍGDALA, EN RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS CRÓNICO Y SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA

Trujillo V.; Durando P.; Suárez M.
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Los receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) participan en el estrés y la ansiedad. La amígdala es una estructura clave en la regulación de la ansiedad en la cual se expresan GR y MR. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del tratamiento crónico con el antidepresivo tianeptina (10mg/Kg) sobre la expresión de MR y GR en la amígdala bajo estrés crónico. Se utilizaron ratas Wistar machos, separadas de la madre diariamente durante 4,5hs en las primeras 3 semanas de vida y sometidas durante 24 días a estrés crónico variable a partir del día postnatal 50. Los GR y MR fueron determinados por inmunohistoquímica en los núcleos medial y central amigdalinos. En la amígdala medial se encontró una interacción triple entre separación materna, estrés y tratamiento con el antidepresivo en la inmunoreactividad a GR (IR-GR), observándose en los animales criados con madre (CM), que tanto el estrés como la tianeptina aumentaron la IR-GR ($p < 0,05$). En animales separados de la madre (SM) y estresados hubo una disminución de las células IR-GR ($p < 0,05$) y tianeptina aumentó esa IR-GR, aunque provocó una disminución en aquellos no estresados ($p < 0,05$). La inmunoreactividad a MR (IR-MR) no se vio alterada, pero sí el balance MR/GR, donde el estrés disminuyó esta relación ($p < 0,05$). Además, en los SM, tianeptina aumentó el balance de receptores ($p < 0,05$). En la amígdala central no se encontraron efectos significativos. Nuestros resultados demuestran que los animales estresados como adultos presentan una regulación diferencial a nivel de los GR y MR del núcleo medial de la amígdala, dependiendo de los eventos de la vida temprana. En tanto el efecto de tianeptina depende del estado del animal, así cuando las células IR-GR están aumentadas, tianeptina las disminuye y por el contrario cuando las células IR-GR están disminuidas, las aumenta, corrigiendo de esta forma el desbalance de receptores MR/GR y atenuando la desregulación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal

199. (671) EFECTOS DE LA SOMATOSTATINA Y EL VÁPREÓTIDO SOBRE LA ACTIVIDAD ATPÁSICA DE CORTEZA CEREBRAL

Lopez Ordieres M.¹; Kemmling A.¹; Gutnisky A.²; Rodríguez De Lores Arnaiz G.²
Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹; Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis", Facultad De Medicina, UBA².

La somatostatina es un factor hipotalámico que inhibe la liberación de la hormona del crecimiento de la pituitaria anterior. Los receptores de somatostatina se caracterizaron estudiando las distintas afinidades a péptidos análogos, por ejemplo el vaporeótido, que se comporta como agonista de los receptores sst1, sst2 y sst5. El principal sistema de transporte activo en las células animales, es la bomba de sodio; en la membrana plasmática, la enzima Ca^{2+} -ATPasa sirve para promover la salida y regular la entrada de calcio de las células. Dado que la actividad de ATPasa puede ser modificada por diferentes sustancias, es el objetivo de este trabajo, investigar el efecto de la somatostatina y el vaporeótido sobre la actividad de ATPasa de la corteza cerebral. Los resultados mostraron que la presencia de vaporeótido en un rango de concentración de $1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M producía la inhibición de la actividad de Na^+ , K^+ -ATPasa con una $\text{CI}_{50} = 7,87 \times 10^{-7}$ M, pero sin modificar la actividad de Ca^{2+} -ATPasa. La administración de vaporeótido (100 mg / kg, ip) producía un 25% de estimulación de la actividad de Na^+ , K^+ -ATPasa, una disminución de la actividad de Mg^{2+} -ATPasa y ningún cambio de la actividad Ca^{2+} -ATPasa. Además, la presencia somatostatina en un rango de concentración de $1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M no producía ningún cambio en la actividad de Na^+ , K^+ -ATPasa de membranas sinaptosomales de corteza cerebral, sin embargo $1,0 \times 10^{-6}$ M somatostatina inducía una disminución de la unión específica [^3H]-ouabaina del 16%. Ensayos realizados empleando Na^+ , K^+ -ATPasa de corteza cerebral de cerdo mostraron que la actividad de esta enzima disminuía un 28% por vaporeótido, y una estimulación del 35% por somatostatina. Los resultados presentados sugieren una interacción característica entre la somatostatina y el vaporeótido en relación con las ATPasas de la corteza cerebral, lo que conduce a que sus actividades basales hayan resultado diferencialmente modificadas por la presencia o administración de estos péptidos.

200. (696) INHIBICIÓN DE LA LIBERACIÓN DE FACTORES PRO-INFLAMATORIOS EN RATONES TRANSGÉNICOS TIPO ALZHEIMER TRATADOS CON MINOCICLINA

Navas M.; Mestre B.; Bruno M.

Laboratorio de Neurociencias, Universidad Católica de Cuyo, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

En la actualidad, no existe un tratamiento eficaz para detener la progresión o evitar la aparición de la enfermedad de Alzheimer (EA). Se trata de una enfermedad multifactorial, y en éste sentido varios factores se han relacionado con la etiología, pero el grado de contribución de cada factor sigue siendo controversial. El conocimiento actual de los cambios celulares tempranos en cuanto al inicio y progresión de la patología es limitado, pero la evidencia experimental acumulada sugiere que los procesos neuroinflamatorios crónicos son eventos previos a la aparición del deterioro cognitivo. En estudios recientes hemos demostrado los efectos neuroprotectores que confiere el tratamiento con minociclina en nuestro modelo de ratón transgénico de EA. Sin embargo, el mecanismo por el cual éste derivado tetracíclico con propiedades anti-inflamatorias y neuroprotectoras ejerce su acción no se conoce aún. Por tal motivo, ratones transgénicos y no transgénicos fueron administrados por 30 días con una dosis de 50mg/kg/día vía intraperitoneal para luego analizar, en zonas del cerebro afectadas por la patología, si el mecanismo de control de liberación de citocinas pro-inflamatorias (provenientes de microglia) por parte de minociclina estaba relacionado a una inhibición de la vía de señalización de caspasa-3/7. Análisis del material de hipocampo y corteza de los animales transgénicos tratados vs. transgénicos controles sin tratamiento evidenció un efecto anti-inflamatorio con disminución de iNOS e IL-1B, dos efectores importantes de la vía de caspasas mencionada. En la actualidad más componentes de la misma vía están siendo investigadas, como por ejemplo caspasa 3 clivada, NFk beta-p65 y PARP.

201. (714) DÉFICIT EN LA INTERACCIÓN MADRE-CRÍA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO

Uccelli N.^{1,2}; Codagnone M.^{1,2}; Podestá M.^{1,2}; Reinés A.^{1,2}

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. de Robertis" (IBCN)-CONICET¹; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires².

La administración prenatal de ácido valproico (VPA) es ampliamente aceptada como modelo experimental de autismo ya que simula varias de las características conductuales y neuroanatómicas descriptas en la patología. En el marco de éste modelo aún se desconoce el rol maternal durante la instauración del fenotipo conductual. En este trabajo nos propusimos caracterizar el comportamiento maternal de las hembras VPA en días postnatales (DPN) tempranos. Entre DPN 5 y 6 se evaluó el comportamiento maternal en ausencia de perturbación externa. Las hembras VPA no presentaron diferencias respecto del control en la frecuencia de ocurrencia de aquellas actividades dirigidas hacia las crías tales como el contacto nutritivo y no nutritivo, acicalamiento, acarreo y agrupamiento. Además, el número de actividades no relacionadas con las crías como auto-acicalamiento y alimentación y el de aquellas dirigidas hacia el entorno, como construcción del nido y excavación, tampoco presentaron diferencias. Entre los DPN 3 y 4 se evaluó la actividad maternal en presencia de perturbación externa (*Pup retrieval test*). El 60% de las hembras VPA falló en devolver las crías al nido en el tiempo estipulado y aquellas que lograron realizarlo, triplicaron el tiempo de agrupamiento. Al evaluar las conductas maternas en esta prueba, la cantidad de actividades dirigidas hacia las crías por las hembras VPA no varió, aunque el patrón conductual fue diferente. Mientras que las hembras control realizaron actividades claves de cuidado maternal, las hembras VPA evidenciaron conductas de bajo compromiso. Nuestros resultados indican que las hembras VPA presentan inalterada su capacidad de cuidado maternal aunque frente a un desafío que requiere de la interacción entre las crías y la madre poseen un pobre desempeño. Este déficit podría representar una manifestación más del fenotipo conductual de las crías VPA debido a una falla en la comunicación.*Ambos autores contribuyeron igualmente

202. (814) LA INHIBICIÓN AGUDA DEL METABOLISMO HIPOCAMPAL DE ALLOPREGNANOLONA PROVOCA UN DETERIORO EN LA MEMORIA EN RATAS HEMBRAS

Escudero C.¹; García S.^{1,2}; Giuliani F.¹; Guiñazú T.¹; Yunes R.^{1,2}; Cabrera R.¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), Universidad de Mendoza, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET¹; Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza².

Dentro de los neuroesteroides más estudiados está la Allopregnanolona (Allo). Allo es sintetizada a partir de 5α -dihidroprogesterona por la enzima 3α -hidroxiesteroide oxidoreductasa (3α -HOR). Este derivado de progesterona (P) influye sobre una amplia gama de comportamientos tales como el comportamiento sexual y afectivo, la respuesta al estrés y diferentes fenómenos cognitivos. Recientemente demostramos, utilizando el test de evitación pasiva step down (tarea SD), que estrógeno (E) y P tienen efecto amnésico en ratas hembras y que este puede ser revertido por la acción del neuroesteroide Allo (Escudero y col., 2012). Objetivo: Identificar variaciones en el comportamiento y la actividad enzimática de la 3α -HOR en hipocampo de ratas OVX-EP tras la inhibición aguda del metabolismo de Allo. Materiales y Métodos: Se procedió a la inhibición de la síntesis de Allo con Indometacina (Indo). Se realizó la inyección de Indo $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a ratas OVX-EP-Allo 15 min previos al entrenamiento en la tarea SD y se recolectaron los datos del desempeño de estas ratas. Además se determinó la actividad enzimática de 3α -HOR en dicho grupo utilizando un método espectrofotométrico. Resultados: La inhibición aguda de la biosíntesis de Allo provocó una reversión significativa del efecto amnésico producido por Allo en la memoria de ratas OVX-EP ($p < 0,001$). Estas ratas también mostraron una disminución significativa en la actividad enzimática de 3α -HOR ($p < 0,001$). Conclusiones: 1-El grupo OVX-EP presenta una marcada disminución de la actividad enzimática de la 3α -HOR, la

cual es revertida por Allo. 2- La inhibición aguda de la 3α -HOR con Indo revierte el efecto promnésico de Allo observado en el grupo OVX-EP. 3- El efecto promnésico de Allo va acompañado de un aumento en la actividad biosintética de la 3α -HOR a nivel hipocámpal. Finalmente creemos que los resultados obtenidos ayudan a dilucidar el rol que este neuroesteroide tiene en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria.

203. (840) EFECTO DE LA DELECCIÓN DE CONEXINA 43 EN LA GLÍA ENVOLVENTE OLFATORIA SOBRE EL MANTENIMIENTO DE LA VÍA AFERENTE OLFATORIA

Piantanida A.; Rela L.

Neurociencia de Sistemas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El epitelio olfatorio produce neuronas sensoriales olfatorias (NSO) durante la vida adulta, las que extienden axones a lo largo del nervio olfatorio. Este nervio es altamente plástico y puede regenerar luego de un daño. El crecimiento axonal y la plasticidad del nervio olfatorio se atribuye a la glía envolvente olfatoria (GEO) asociada a las NSO, que promueve el crecimiento axonal in vitro y en modelos animales de daño a la médula espinal. La GEO expresa conexina 43 (Cx43), una proteína formadora de uniones comunicantes (*gap junctions*) también presente en la glía radial e involucrada en la formación de circuitos corticales durante el desarrollo. Nuestra hipótesis sostiene que la Cx43 participa en el mantenimiento y regeneración del nervio olfatorio. Nuestro primer objetivo fue evaluar si la Cx43 es necesaria para la integración de NSO al circuito olfatorio, utilizando ratones genéticamente modificados que permiten reducir experimentalmente la expresión de Cx43 en la GEO, mediante la tecnología Cre-lox inducible. En segundo lugar evaluamos si la degeneración-regeneración posteriores a un daño se asocian con cambios plásticos en la expresión de conexinas en la GEO, utilizando el modelo de daño al epitelio olfatorio inducido por metimazol. Nuestros resultados muestran que una reducción del 85% en la expresión de Cx43 en la GEO ($1,0 \pm 0,4$ vs. $6,8 \pm 1,1$ unidades arbitrarias; test de Mann Whitney, $p < 0,05$) se asocia con una disminución del 40% en el porcentaje de neuronas positivas para tirosina hidroxilasa en el bulbo olfatorio, un marcador sensible al input sensorial ($5,6 \pm 0,4$ vs. $9,4 \pm 1,4\%$; test de Mann Whitney, $p < 0,01$). Estos resultados son la primera evidencia de la importancia de conexinas gliales en la formación de circuitos olfatorios y es de relevancia para comprender la fisiología de la GEO, a la luz de su potencial utilidad clínica en terapias de trasplante autólogo para regeneración del sistema nervioso.

FARMACOCINÉTICA 1

204. (200) PROLONGACIÓN DEL INTERVALO QTC POR DEXTROPROPOXIFENO: CORRELACIÓN CON CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS

Keller G.^{1,2}; Ponte M.³; Sparanochia C.⁴; Bagnes C.⁵; Bellosio W.⁶; Fernandez N.⁷; Olivera N.⁷; Quiroga P.⁷; Diez R.¹; Girolamo G.¹

Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Urgencias, Hospital General de Agudos Donación Francisco J. Santojanni.²; Departamento de Medicina Interna, Hospital General de Agudos "Cosme Argerich"³; División Cardiología, Hospital Militar de Campo de Mayo⁴; Unidad de Oncología, Hospital General de Agudos "Dr. Enrique Tornú"⁵; Sección Farmacología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires⁶; CENATOXA, Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁷.

Introducción: El síndrome de QT largo es un efecto adverso serio que motivó el retiro de productos en EEUU por FDA (donde se usaban dosis más elevadas). En Argentina, los productos con dextropropoxifeno (DP) se encuentran bajo vigilancia pro-activa, para incrementar los datos relativos a seguridad de la dosis au-

torizada localmente. Métodos: Se realizó ECG basal y durante el tratamiento a pacientes que recibieran DP en goteo continuo. La cuantificación en plasma se efectuó por Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas (GC-MS). RESULTADOS: Se incluyeron 20 pacientes (50% hombres). La edad [promedio \pm DS (Rango)] fue 70 ± 17 (29-17) años. A nivel basal, los pacientes tenían [parámetro: promedio \pm desviación estándar (rango)]: Sodio (mEq/L) 138 ± 5 (131-146), Potasio (mEq/L) 4 ± 1 (3-6), Calcio (mEq/L) 5 ± 1 (4-6), y electrocardiograma con intervalo R-R' (mseg) 779 ± 176 (540-1120), frecuencia cardíaca (lpm) 80 ± 18 (53-111), intervalo QT (mseg) 379 ± 44 (320-460), intervalo QTc (mseg) 432 ± 5 (421-440). Al momento de realizar un control intratratamiento, los pacientes habían recibido un goteo continuo de DP a una dosis de 130 ± 25 (100-150) mg, durante un promedio de 5 ± 1 (3-6) días. El dQTc promedio fue -2 ± 12 (-24 a +29) mseg. Intra-tratamiento, presentaron [parámetro: media \pm desviación estándar (rango)]: Sodio (mEq/L) 140 ± 5 (133-146), Potasio (mEq/L) 4 ± 1 (3-6), Calcio (mEq/L) 5 ± 0 (4-6), y electrocardiograma con R-R' (mseg) 792 ± 176 (520-1080), frecuencia cardíaca (lpm) 79 ± 17 (55-115), QT (mseg) 380 ± 43 (300-440), QTc (mseg) 429 ± 8 (416-450). Respecto a prolongación del QTc, solo 1 paciente presentó $QTc > 450$ (♂), y ninguno presentó $QTc > 500$ o $\Delta QTc > 30$ ó > 60 . Las concentraciones de DP y nor-DP fueron: 159 ± 11 (142-170) y 88 ± 8 (76-102) respectivamente. DISCUSIÓN: Los resultados corroboran que el DP no presenta un riesgo elevado de prolongación del intervalo QTc a las dosis utilizadas en la práctica clínica cotidiana en Argentina.

205. (266) EL ENALAPRIL NO MODIFICA LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA DE LA CEFALEXINA EN CANINOS

Rebuelto M.; Prados A.; Monfrinotti A.; Kreil V.; Paes J.; Porta N.; Hallu R.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Algunos fármacos, como los antibióticos beta-lactámicos y los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, son absorbidos mediante el transportador intestinal de dipéptidos PEPT1. El objetivo de este estudio fue determinar si la administración conjunta de enalapril modifica la farmacocinética de la cefalexina luego de su administración por vía oral a caninos sanos. Se trabajó con 6 perros mestizos sanos. Cada perro recibió una dosis única de 25 mg/kg de una suspensión de cefalexina (G1) o cefalexina a los 20 minutos de administrada una dosis oral única de 0.5 mg/kg de enalapril (G2), con un periodo de lavado de 2 semanas entre cada experiencia. Se extrajeron muestras de sangre mediante un catéter colocado en la vena cefálica antebraquial derecha a tiempos predeterminados luego de la administración del antibiótico. Las concentraciones plasmáticas de la cefalexina se determinaron mediante el método microbiológico. Las curvas de disposición plasmática se analizaron con un modelo no compartimental (Pc-Nonlin software). Los parámetros farmacocinéticos se compararon mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas ($p \leq 0,05$). Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar. G1: concentración máxima (C_{max}) = $27,66 \pm 4,20$ mg/ml, Tiempo máximo (T_{max}) = $1,41 \pm 0,58$ h, área bajo la curva extrapolada al infinito (ABC_{0-inf}) = $110,8 \pm 10,98$ mg-h/mL, vida media de eliminación ($T_{1/2}$) = $1,55 \pm 0,12$ h, constante de eliminación (l) = $0,44 \pm 0,03$ h⁻¹, tiempo medio de residencia (MRT) = $3,19 \pm 0,39$ h. Grupo 2: C_{max} = $26,51 \pm 6,04$ mg/ml, T_{max} = $1,58 \pm 0,58$ h, ABC_{0-inf} = $110,6 \pm 17,64$ mg-h/mL, $T_{1/2}$ = $1,62 \pm 0,22$ h, l = $0,43 \pm 0,06$ h⁻¹, MRT = $3,46 \pm 0,55$ h. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros farmacocinéticos entre los 2 grupos, por lo tanto, no se necesitarían cambios en la dosificación de la cefalexina cuando se administra en forma conjunta con enalapril. Aprobado por CICUAL, FCVet, UBA. Subsidio UBACYT 20020100100698 (2011-2014)

206. (291) BCRP RESTRINGE EL PASAJE DE ZIDOVUDINA AL CEREBRO FETAL EN RATAS DISMINUYENDO SU TOXICIDAD

Filia M.¹; Marchini T.²; Di Gennaro S.¹; Minoia J.¹; Copello G.³; Diaz L.³; Evelson P.²; Rubio M.¹; Peroni R.¹

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-

CONICET-UBA¹; Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET-UBA²; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET-UBA³.

Ambros L.
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Previamente demostramos que la administración oral crónica del inhibidor nucleosídico de la transcriptasa reversa zidovudina (AZT) aumenta la expresión del transportador de eflujo BCRP placentario al término de la preñez en rata. Objetivos: Determinar si BCRP modula la distribución de AZT al cerebro fetal y si esta modulación tiene efectos sobre la citotoxicidad de AZT en comparación con la lamivudina (3TC) que no es sustrato del transportador. Métodos: Se administraron 60 mg/kg de AZT ó de 30 mg/kg de 3TC p.o. una vez al día durante 10 días a ratas hembra Sprague-Dawley preñadas. El día 21, se determinó la expresión de BCRP, la función mitocondrial y los niveles de oxidación lipídica en cerebro fetal. Luego de una administración iv de AZT (60 mg/kg), se extrajeron muestras de sangre materna y de cerebro fetal a distintos tiempos y se cuantificó la droga por HPLC-UV. Cuando fue requerido, se administró el inhibidor selectivo de BCRP gefitinib (GFT) (60 mg/kg p.o., 2 h antes) Resultados: Se observó un aumento de la expresión de BCRP en cerebro fetal en el grupo AZT ($p < 0,05$). Por otro lado, alteraciones de la función mitocondrial ($p < 0,05$), y daño oxidativo a lípidos ($p < 0,01$) fueron halladas en el grupo 3TC pero no con AZT. Si bien el perfil plasmático de AZT en las madres se mantuvo constante en todos los grupos, la distribución de AZT al cerebro fetal disminuyó significativamente en el grupo tratado crónicamente con AZT ($p < 0,05$) y los niveles se recuperaron cuando los ensayos se realizaron en presencia de GFT ($p < 0,05$). Conclusiones: La menor toxicidad en el cerebro fetal de AZT en comparación con su congénere 3TC podría deberse al hecho de que BCRP restringe la distribución de AZT al tejido.

207. (349) EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE FORMULACIONES PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL DE NEVIRAPINA

Cohen M.¹; Bernabeu E.²; Höcht C.¹; Taira C.¹; Chiappetta D.²

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Farmacotecnia I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

La nevirapina (NEV) es un agente antirretroviral utilizado en el tratamiento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humano (VIH). NEV presenta baja solubilidad acuosa y una biodisponibilidad oral cercana a 90%, la cual disminuye con el aumento de dosis debido a limitaciones en su absorción. El polietilenglicol es un excipiente ampliamente usado para formular soluciones y aumentar la solubilidad de fármacos hidrófobos. El objetivo del presente trabajo fue la comparación de la biodisponibilidad oral de NEV desde una suspensión y una solución acuosa de polietilenglicol 400 (PEG400) 50% v/v en ratas. Se utilizaron ratas Wistar en ayunas, a las cuales se administró una dosis de NEV (8 mg/kg) en suspensión (n=6) o solución PEG (n=6), cuantificándose el nivel plasmático de NEV a diferentes puntos temporales. La biodisponibilidad oral de las formulaciones fue comparada mediante la estimación de parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis no compartimental. La concentración plasmática máxima (C_{max}) de NEV fue mayor luego de la administración de solución PEG en comparación a la suspensión (3,0±0,3 µg/ml vs. 1,9±0,2 µg/ml, $P < 0,05$). El área bajo la curva de los niveles séricos de NEV en las primeras 4 horas (AUC₀₋₄) fue significativamente superior en ratas que recibieron la solución PEG respecto de la suspensión (8,1±0,9 µg²/h/ml vs. 5,5±0,6 µg²/h/ml, $P < 0,05$). No se detectaron diferencias significativas en la semivida de eliminación de la NEV entre las formulaciones estudiadas. En conclusión, la solubilización de NEV en una solución acuosa de PEG400 50% v/v permite mejorar la biodisponibilidad oral del antirretroviral, especialmente en las primeras horas luego de su administración.

208. (397) CINÉTICA COMPARATIVA DE LA AMOXICILINA DE DEPÓSITO ADMINISTRADA POR VÍA SUBCUTÁNEA E INTRAMUSCULAR

Las preparaciones denominadas de larga acción o depot permiten alargar el intervalo entre tomas, ya que la modificación en la tasa de absorción, mediante procedimientos de farmacotecnia, logra que las concentraciones plasmáticas del fármaco en cuestión se mantengan por más tiempo que las formulaciones convencionales. Sin embargo, en algunos casos las concentraciones plasmáticas pueden ser bajas o presentar alta variación entre individuos. La vía de administración puede afectar en forma significativa la absorción de principios activos formulados como de larga duración, generalmente indicados para inyección intramuscular (im) o subcutánea (sc), por ello el clínico puede dudar entre utilizar una u otra. En el presente trabajo se comparó la disposición de la amoxicilina trihidrato (15 mg/kg, según indicado por el prospecto) formulada como de liberación prolongada (suspensión 150 mg/ml; Duphamox LA, Fort Dodge, Buenos Aires, Argentina), administrada por las vías im y sc a 6 caninos adultos. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular izquierda hasta las 30 h post inyección. Las concentraciones plasmáticas fueron determinadas mediante el método microbiológico. La curva estándar fue validada para las concentraciones 0.391-50 mg/ml. Las curvas de disposición de cada animal se analizaron mediante métodos no compartimentales. Se observaron diferencias significativas (test de Wilcoxon, $p < 0,05$) para los siguientes parámetros farmacocinéticos (media ± desvío estándar): área bajo la curva extrapolada al infinito: 73.8 ± 13.1 versus 88.3 ± 17.0 µg·h/ml y tiempo medio de residencia: 6.9 ± 2.7 versus 10.3 ± 6.1 h, para las vías intramuscular y subcutánea, respectivamente. No se observaron diferencias para la vida media (4.1 ± 2.4 versus 6.3 ± 4.4 h), concentración máxima (9.5 ± 2.8 versus 9.0 ± 3.0 µg/ml) ni para el tiempo máximo (2.6 ± 2.0 versus 4.3 ± 0.8 h), para las vías intramuscular y subcutánea, respectivamente. Se concluye que la vía de administración puede afectar la disposición de los preparados formulados para mantener la liberación prolongada de la amoxicilina en caninos.

209. (472) DESARROLLO DE FORMULACIONES INTRANASALES PARA SU USO EN PACIENTES CRÍTICOS

Kravetz M.¹; Martínez O.³; Otamendi E.¹; Lazarowski A.¹; Buontempo F.¹; Bernabeu E.¹; Moretton M.¹; Capria J.²; Chiappetta D.¹; Bramuglia G.¹

Facultad de Farmacia y Bioquímica¹; Fundación Investigar²; Hospital de Clínicas "Jose de San Martín", Buenos Aires³.

El uso de vías de administración alternativas necesita en muchos casos del desarrollo de nuevas formulaciones. El tratamiento inicial de las crisis convulsivas es benzodiazepinas por vía intravenosa o rectal. Sin embargo, el acceso por vía intravenosa durante una crisis es difícil. La administración rectal es más segura, pero puede ser considerado socialmente inaceptable. A su vez el midazolam es utilizado en la medicación pre-anestésica, pero pueden existir dificultades en la administración intravenosa en determinados grupos de pacientes, como los pediátricos. La administración de midazolam (MDZ) intranasal (IN) representaría un nuevo enfoque al tratamiento de las crisis y del manejo anestésico, pero esta formulación nasal no está disponible comercialmente en Argentina. El objetivo fue investigar los niveles plasmáticos MDZ después de la administración IN de una formulación galénica nasal que contiene MDZ en voluntarios sanos. El protocolo fue aprobado por el IRB de la Fundación Investigar. Se incluyeron 4 voluntarios sanos (3 hombres, 1 mujer), que dieron su consentimiento para el estudio y, que recibieron una sola dosis de 4 mg de MDZ administrado por vía intranasal. La formulación de spray nasal de MDZ consistió en 2,5% (w / v) de midazolam, propilenglicol, y agua. Se tomaron muestras de sangre a los 10 minutos, 1 y 2 horas después de la administración de MD. Se pidió a los voluntarios que clasifiquen la irritación local de inmediato y 2 horas después la administración. También se registraron los datos de los efectos sedantes. La dosis de 4 mg de MDZ IN fue bien tolerado. Después de la administración los voluntarios infor-

maron irritación local de bajo grado. Los niveles plasmáticos MDZ se observaron después de 10 min de la administración IN (media: 11,6; SD: 4,6 ng / ml). Una hora después de la administración IN el nivel medio de MDZ fue 8,9 (DE: 7,7) ng / ml. Se observaron efectos sedantes en 3 voluntarios. Este estudio mostró que se encuentran niveles cuantificables y potencialmente terapéuticos de MDZ luego de la administración IN de una formulación nasal galénica desarrollado por nuestro grupo. Teniendo en cuenta que el MDZ es un compuesto lipofílico con baja solubilidad en agua, se necesitan más estudios para evaluar la variabilidad farmacocinética interindividual o la utilidad de distintos "potenciadores" de la absorción transmucosa para aumentar la biodisponibilidad.

210. (534) MÉTODO SENCILLO PARA ESTIMAR KEO, CONSTANTE IMPORTANTE PARA LOS SISTEMAS DE ANESTESIA ENDOVENOSA (TIVA) CONTROLADOS POR COMPUTADORA

Morozov M.¹; Serra H.²

Centro Gallego de Buenos Aires¹; Cátedra de Farmacología, Medicina, Universidad Católica Argentina².

En los sistemas modernos de TCI (target controlled infusion) se usa un modelo farmacocinético cuyo parámetro destacado es la constante Keo, de la cual depende la concentración plasmática (Cp) generada por el sistema para conseguir la concentración óptima de droga en biofase (Cbio). Siendo Keo una constante indirecta podría derivarse de la variable tiempo hasta el efecto máximo anestésico (TTPE - time to peak effect), asumiendo que Cbio es directamente proporcional a Cp. Se incluyeron 12 pacientes ASA 1 sometidos a inducción anestésica con propofol (2,5 mg/kg) IV en bolo por procedimientos ambulatorios menores (videocolonoscopia), quienes dieron su consentimiento escrito para participar de este estudio piloto. En ellos, se registró la presión arterial (TA) sistólica y diastólica mediante un esfigmomanómetro anerode antes, durante e inmediatamente después de la inducción anestésica, pero antes de realizar la intervención. Para definir TTPE se usó el mínimo valor obtenido de TA media. Los datos fueron analizados y modelados en una hoja Excel2010@ programada ad hoc. Luego de la administración del anestésico se produjo un descenso de la TA media de 30,75 ± 9,17 mmHg y se registró un TTPE de 3,58 ± 1,88 min. Teniendo en cuenta un modelo sencillo se considera que $\ln C_{bio} = \ln C_p \cdot Keo \cdot TTPE$. En condiciones donde Cbio sea 10 veces Cp puede asumirse $Keo = 1/TTPE \times \ln(C_{bio}/C_p)$ cuyo valor estimado es 0,28 min⁻¹. Según este modelo las variaciones de los TTPE entre pacientes se deberían a variaciones en su Cbio. El TTPE obtenido y la Keo calculada coinciden con resultados publicados que usan métodos farmacodinámicos de evaluación más sofisticados (potenciales evocados auditivos e índice EEG bispectral). Así, este puede ser un método muy barato y rápido para obtener Keo en diferentes grupos de pacientes sometidos a TCI, y puede ser útil para vincular datos de diferentes estudios.

211. (668) ELIMINACIÓN URINARIA DE CEFOXITINA ADMINISTRADA POR DISTINTAS VÍAS PARENTERALES A GATOS DOMÉSTICOS

Passini S.¹; Montoya L.¹; Lupi M.¹; Landoni M.²; Albarellos G.¹

Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata².

La cefoxitina (cfo) es una cefalosporina de segunda generación que incluye en su espectro a patógenos grampositivos y gramnegativos aerobios y anaerobios. Su uso se indica para la profilaxis quirúrgica de cirugías abdominales con vertido de contenido intestinal y para el tratamiento de infecciones mixtas graves. Se administra por vía parenteral exclusivamente, tiene amplia distribución tisular y se elimina por orina en forma activa. El propósito de este trabajo es describir la eliminación urinaria de cfo en gatos domésticos luego de su administración intravenosa (iv), intramuscular (im) y subcutánea (sc). Para las administraciones iv, im y

sc se utilizaron respectivamente 6, 6 y 5 gatos. Se administró en todos los casos una dosis única de cfo de 30 mg/kg. Se tomaron muestras sanguíneas en tiempos prefijados hasta 8 horas post-administración de cfo y se recolectó, mediante sonda uretral, toda la orina producida a intervalos de una hora hasta las 8 horas en que finalizó el muestreo. Las concentraciones de cfo en plasma y orina fueron determinadas por el método microbiológico. El límite de cuantificación fue de 3,125 mcg/ml. Se calcularon los principales parámetros farmacocinéticos por métodos convencionales. Se contrastaron estadísticamente los resultados considerando a las diferencias significativas si $p < 0,05$. Luego de la administración im y sc, las respectivas Cmax fueron: 76,11 y 48,18 mcg/ml y Tmax: 0,15 y 0,58 h. Las correspondientes vidas medias de eliminación fueron: 0,86, 1,23 y 1,44 h y los MRT: 1,15, 1,78 y 2,24 h para las vías iv, im y sc. Se encontraron diferencias significativas entre los Tmax, Cmax y los MRT. El porcentaje de cfo eliminado en las 8 horas muestreadas fue del 74,10%, 82,04% y 75,50% para las administraciones iv, im y sc, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre dichos porcentajes.

Trabajo subsidiado por UBACyT 20020100100745, programación 2011-2014.

212. (762) IMPLICANCIAS DE LA FARMACOCINÉTICA DE FOSFONATOS DEL 99mTc EN LA EVALUACIÓN DEL METABOLISMO ÓSEO MEDIANTE IMÁGENES

Tesan F.; Portillo M.; Leonardi N.; Giaquinta D.; Zubillaga M.; Salgueiro M.

Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Los agentes comúnmente utilizados para la evaluación del metabolismo óseo por imágenes son 99mTc-MDP, 99mTc-HDP y en menor medida 99mTc-Pyr. De acuerdo a la patología en estudio, las imágenes clínicas pueden realizarse entre 0 y 1h de administración en adquisición dinámica y/o 1, 2-3 hs en adquisición estática. Para el caso del estudio de estos fenómenos en modelos animales, la farmacocinética del agente utilizado es determinante a la hora de obtener una imagen de calidad para la realización del diagnóstico. Se compararon imágenes obtenidas con los 3 agentes a 1 y 2 horas en ratas normales de manera de evaluar la posibilidad de establecer regiones de interés (ROIs), contrastes relativos a las variaciones de captación tejido-específicas y farmacocinéticas y todos los datos se compararon con los resultados de biodistribución ex vivo. Los resultados obtenidos ex vivo muestran captaciones en hueso de aproximadamente 5% a 1 h que caen a 1-2% a las 2h para todos los agentes; captación en riñón cercana al 5% a 1 h mostrando la ruta de eliminación de estos agentes; y captación de 0,05-1% en sangre. En todos los casos, la farmacocinética de los agentes permitió la realización de rastreos óseos a tiempos tempranos compatibles con la fase vascular y a 2-3 hs para estudios tardíos, aunque de variable calidad diagnóstica. Estos estudios resaltan la utilidad de 99mTc-MDP y 99mTc-HDP por sobre 99mTc-Pyr. Si bien los datos imagenológicos no tienen correlato con los % de captación habitualmente utilizados en las técnicas de disección, es posible realizar diagnósticos en base a ROIs tomadas sobre la imagen informando datos cualitativos y semi-cuantitativos.

FARMACODINAMIA 1

213. (524) ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE URERA AURIANTICA WEDD. (URTICACEAE)

Riedel R.¹; Marrasini C.²; Gorzalczy S.¹

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Farmacognosia, Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Urera aurantiaca Wedd. (Urticaceae) es conocida con el nombre común de "ortiga colorada", "pino guasú" y "pica pica". Es una planta nativa argentina, que está distribuida también en

Paraguay, Uruguay, Bolivia y Brasil. Es usada popularmente para dolores reumáticos, para el tratamiento de várices, forúnculos y lesiones traumáticas relacionadas con procesos inflamatorios. Por otra parte, otras especies de la familia son usadas en Europa para el tratamiento de la hiperplasia benigna prostática (*U. dioica*, *U. urens*) y se han además reportado actividad antiinflamatoria relacionada con esta especie (*U. circularis*, *U. urens*, *U. macrorrhiza*). Teniendo en cuenta el uso medicinal de la planta y las actividades estudiadas en esta familia, se abordó el estudio de la potencial actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de las partes aéreas de *U. aurantiaca*. Para ello, se realizó el estudio de la actividad farmacológica de interés por vía sistémica, empleando el test de edema plantar de rata inducida por carragenina y por vía tópica, utilizando el test del edema auricular inducido por 12 miristato-13 acetato de forbol (TPA). El extracto presentó una inhibición del edema inducido por carragenina tanto a dosis de 100 y 300 mg/kg i.p., con una máxima inhibición del 41.6% a las 4 hs de inducida la inflamación, produciendo una reducción de la actividad de mieloperoxidasa en el sitio de la inflamación del 71.7%. Además a dosis de 0.1-1 mg/oreja redujo la inflamación auricular inducida por TPA, observándose un efecto máximo (34.7% de inhibición) a 1 mg/oreja con una reducción de la actividad de mieloperoxidasa del 68.5%. El estudio de permeabilidad vascular inducido por ácido acético en ratones mostró un comportamiento dosis-dependiente (10-300 mg/kg i.p.), con una inhibición del 65.7% a la dosis máxima del extracto. Estos resultados demuestran que el extracto presenta una actividad antiinflamatoria en los modelos preclínicos empleados.

214. (785) POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL INDUCIDA POR CALIDINA (LYS-BK) MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE METALOPEPTIDASAS EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH)

Santín Velazque N.; Nowak W.; Armesto A.; Errasti A.; Kilstein Y.; Rothlin R.

Tercera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: Las cininas son péptidos activos hidrolizados por metalopeptidasas. El objetivo fue evaluar si la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la aminopeptidasa M (APM) y la endopeptidasa neutra (NEP) participan en la inactivación biológica del agonista selectivo del receptor a cininas B₂, Lys-BK, en VUH. **Métodos:** Utilizando la técnica de órgano aislado, los anillos de VUH con endotelio fueron incubados en solución de Krebs a 37°C, a pH 7.4 y burbujeados con carbógeno. Luego de 2h se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a Lys-BK en ausencia y presencia, 30 min antes de la CCR, de inhibidores enzimáticos. La presencia de endotelio fue confirmada por estudios histológicos. **Resultados:** Se observó que la aplicación de Captopril 1µM (C, inhibidor selectivo de la ECA) o de Fosforamidón 10µM (F, inhibidor selectivo de la NEP) indujo una potenciación de la respuesta contráctil a Lys-BK en VUH (pCE₅₀ control: 8.72±0.03, n=35; C: 9.02±0.04, n=16; F: 8.94±0.06, n=9; p<0.05). Sin embargo, este efecto no se evidenciaría al incubarse con Amastatina 10µM (A, inhibidor selectivo de la APM; pCE₅₀ control: 8.72±0.03; A: 8.58±0.06, n=11; p>0.05). La aplicación conjunta de C 1µM y F 10µM indujo una mayor potenciación de la respuesta a Lys-BK en comparación a la observada con la aplicación individual de dichos inhibidores (pCE_{50C+F}: 9.46±0.06, n=7; p<0.001). No obstante, no se evidenciaría sinergismo de potenciación con la aplicación conjunta de A 10µM y C 1µM (pCE_{50A+C}: 8.95±0.06, n=10; p>0.05) o de A 10µM y F 10µM (pCE_{50A+F}: 8.87±0.06, n=7; p>0.05). **Conclusiones:** Estos resultados indicarían que Lys-BK funciona como un potente agente vasoconstrictor en VUH. A su vez, constituyen una sólida evidencia farmacológica que la ECA y la NEP participan de forma sinérgica en la inactivación biológica de Lys-BK en VUH, mientras que la APM no tendría relevancia como mecanismo inactivante.

FARMACOGNOSIA 1

215. (370) EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE UN EXTRACTO ACUOSO DE ILEX PARAGUARIENSIS

Schinella G.¹; Neyret E.²; Tournier H.¹; Prieto J.³; Ríos J.²; Giner R.²

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata¹; Universitat de Valencia, España²; University College of London, Reino Unido³.

Introducción: La infusión de hojas secas y picadas de *Ilex paraguariensis* -yerba mate- (YM) es la bebida tradicional que se utiliza como fuente de cafeína, con una importante función social y ritual. En los últimos años, un gran número de publicaciones científicas demostraron sus efectos antioxidantes, cardiovasculares, antimutagénicos, reductores de peso corporal, etc., en diferentes modelos experimentales. **Objetivo:** Estudiar el efecto antiinflamatorio de *I. paraguariensis* en un modelo in vivo. **Metodología:** El extracto acuoso YM se preparó, a partir de material vegetal comercial, como una infusión al 5% p/v, se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se caracterizó su composición química mediante HPLC-DAD. Se utilizaron ratones machos Swiss y se evaluó la actividad antiinflamatoria mediante el modelo experimental de inflamación aguda del edema plantar inducido por carragenina. Se determinó la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en patas de animales tratados y controles para estimar la infiltración leucocitaria en el sitio de inflamación. En homogenatos de las patas se determinó la expresión de COX2 e iNOS mediante western blot. **Resultados:** La administración oral de YM reduce de forma dosis dependiente el edema plantar inducido por carragenina. YM a la dosis de 250 mg/kg reduce significativamente el edema con una inhibición de 53% a las 3 h. Después de 5 h de la inyección plantar de carragenina, tanto el tratamiento con YM (250 mg/kg) como con indometacina (10 mg/kg) inhibieron significativamente la infiltración leucocitaria en un 24%. El análisis de western blot del tejido plantar inflamado muestra que se produce un 43% y 53% de inhibición en el contenido de COX-2 e iNOS respectivamente, valores ligeramente inferiores a los obtenidos para la indometacina. **Conclusión:** Nuestros resultados muestran que un extracto acuoso de *Ilex paraguariensis* -yerba mate- posee actividad antiinflamatoria en un proceso de inflamación aguda.

FARMACOEPIDEMIOLOGÍA 1

216. (53) FARMACOVIGILANCIA: PROBLEMAS DE SEGURIDAD ASOCIADOS AL CONSUMO DE BENZODIACEPINAS (BZD) EN EL NORDESTE ARGENTINO

Dos Santos Antola L.; Rocha M.; Morales S.; Hartman I.; Horna M.

Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes.

Las BZD son promocionadas habitualmente como medicamentos seguros en casos de sobredosis, sin embargo su utilización a dosis terapéuticas y en condiciones de uso autorizadas no está exenta de riesgos. El objetivo fue analizar las reacciones adversas (RAM) por consumo de BZD notificadas al Centro Regional de Farmacovigilancia de la Universidad Nacional del Nordeste (CRF-UNNE) (Período 1993- 2011). Estudio observacional, descriptivo, transversal. Se analizaron cada una de las notificaciones espontáneas. Los fármacos se clasificaron según la Clasificación Anatómo-Terapéutica (ATC) (2010)- Organización Mundial de la Salud. Las RAM se codificaron según: Diccionario de Reacciones Adversas (OMS). Análisis estadístico: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). **Resultados:** de 4890 notificaciones, 6% (n=299) correspondieron a BZD. Las más frecuentemente involucradas: alprazolam: 76 (26%), clonazepam: 55 (18%), lorazepam: 45 (15%). Sexo femenino: 63%. Según gravedad: moderadas: 68%, graves: 32%. Síndrome de Abstinencia (77%): Temblor (123), insomnio (111), ansiedad (107), alucinaciones visuales y/auditivas (55), amnesia (49), mialgias (27), confusión mental (33), excitación psicomotriz (28). Síntomas por sobreutilización (23%): Trastornos mnésicos: 21 (moderados a severos), Somnolencia: 16, delirium: 11. Principales indicaciones: Ansiedad: 18 casos, insomnio: 17. Hipertensión arterial: 12, Depresión: 5, Automedicación: 5. Otros: gastritis, crisis histérica. **Conclusiones:**

Se observaron RAM moderadas a graves como: síndromes de abstinencia y farmacodependencia. Utilización irracional en indicaciones no autorizadas, en las que no existen datos sobre su eficacia (depresión, hipertensión, gastritis). Este trabajo demuestra que las BZD distan de ser fármacos seguros, deberían ser utilizadas en situaciones especiales, solo cuando los beneficios superan los riesgos que representa su consumo. Trabajo subsidiado por SGCYT-Universidad Nacional del Nordeste PI-171068.

217. (249) FÁRMACOS CON EFECTOS ANTICOLINÉRGICOS EN LOS ADULTOS MAYORES

Marzi M.; Pires M.; Quaglia N.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe.

Introducción: La comunidad científica está trabajando en la discriminación de medicamentos con mejor relación beneficio/riesgo en los adultos mayores. Se han desarrollado listas de medicamentos potencialmente inapropiados (MPI) para uso en ancianos en diferentes países, atendiendo a la disponibilidad en su propio mercado farmacéutico. **Objetivo:** Identificar los fármacos que se comercializan en Argentina y que la comunidad científica internacional considera potencialmente inapropiados en ancianos por sus efectos anticolinérgicos. **Metodología:** Se realizó una búsqueda bibliográfica de estudios publicados entre 1990 y 2012 que incluyeran listas de MPI. Se consultaron las bases de datos electrónicas de BIREME y Medline/PubMed. Criterio de selección: desarrollo de las listas mediante el método Delphi. De los estudios identificados se registraron, entre otros, los fármacos con efectos anticolinérgicos disponibles en Argentina. **Resultados:** Se localizaron diez estudios y 35 fármacos correspondientes a siete grupos terapéuticos: *Antiespasmódicos gastrointestinales:* alcaloides de la belladona totales, butilescopolamina, metilatrofina. *Antiespasmódicos urinarios:* oxibutinina, tolterodina, solifenacina. *Relajantes musculares de acción central:* carisoprodo, clorzoxazona, orfenadrina, ciclobenzaprina. *Antiparkinsonianos:* trihexifenidilo, biperideno. *Antipsicóticos:* clorpromazina, Levomepromazina, perfenazina, trifluoperazina, periciazina, tioridazina, pipotiazina, haloperidol, clozapina, olanzapina. *Antidepresivos tricíclicos:* imipramina, clomipramina, amitriptilina. *Antihistamínicos:* difenhidramina, doxilamina, bromfeniramina, dexclorfeniramina, dimetindeno, clorfeniramina, prometazina, mequitazina, carbinoxamina, ciproheptadina. **Conclusión:** Este estudio debe profundizarse empleando un método de investigación que permita obtener información consensuada de un grupo de expertos de nuestro país acerca de la seguridad de los medicamentos cuando son utilizados por la población mayor.

218. (296) ACCESIBILIDAD COMO CONDICIONANTE DE LA EFECTIVIDAD CLÍNICA DE LOS ANTI-VEGF EN EL TRATAMIENTO DE LA DMAE EN LA PRACTICA CLINICA

Real J.¹; Luna J.²; Palma S.¹; Granero G.¹

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Centro Privado de Ojos Romagosa SA, Fundación VER, Córdoba, Argentina².

Los anticuerpos monoclonales anti-vegf (vascular endothelial growth factor) han demostrado excelentes resultados en el tratamiento de la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE). Sin embargo, existen factores en la práctica clínica, como la accesibilidad a estos fármacos que pueden condicionar su efectividad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de los retrasos en el acceso al tratamiento en el cambio de la Agudeza visual (AV) en pacientes con DMAE. Se realizó un estudio longitudinal retrospectivo, siguiendo la evolución de la totalidad de casos (84 ojos, 74 pacientes) que, con un diagnóstico confirmado de DMAE, iniciaron tratamiento en uno de dos centros oftalmológicos de la ciudad de Córdoba, entre enero de 2009 y Diciembre de 2012. La cohorte de pacientes fue dividida según el percentil 50% del tiempo de espera (TE) entre la indicación de la dosis y su aplicación, conformándose el grupo 1 o grupo 2 según dicho TE fue mayor o menor a 60 días respectivamente. Si bien ambos grupos experimentaron pérdida significativa de la AV (p

<0.01) como consecuencia de sus respectivos TE (30,5 vs 146 días), la misma fue menor en el grupo 1 (-6,26 vs -15,07 letras) quien a su vez experimentó una mayor ganancia de AV como respuesta al tratamiento (11,41 vs 7,13 letras p<0,05). A partir del análisis global de los datos pudo comprobarse la existencia de una correlación significativa ($r = 0,60$ p <0,01) entre el tiempo de espera (TE) y la pérdida de AV durante dicha espera, y entre el TE y la ganancia de AV tras la aplicación de las dosis (Pearson coefficient -0.26 p <0.02). Posteriormente a la fase de carga, un 30% de los pacientes requirieron nuevas dosis, observándose nuevos TE y pérdidas de AV cuyo análisis dio lugar a las mismas conclusiones que aquellas obtenidas en el periodo inicial. Como consecuencia de los TE, los resultados terapéuticos a dos años de seguimiento son similares a los grupos placebo de los ensayos clínicos a los dos años de seguimiento

219. (163) EVALUACIÓN DEL EFECTO MICOBACTERICIDA DEL NITROXILO (HNO)

Galizia J.¹; Suarez S.²; Alvarez L.²; Doctorovich F.²; Piuri M.¹; Marti M.¹

IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; INQUIMAE-CONICET, Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

La tuberculosis, causada por el bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*, Mt), es una de las enfermedades infecciosas más importantes del mundo de la cual mueren unas 2 millones de personas anualmente, principalmente en los países en desarrollo. Las especies reactivas de Nitrógeno y Oxígeno (RNOS) son compuestos clave utilizados por el sistema inmunológico de los mamíferos para combatir infecciones como la tuberculosis. Una observación clave en relación con las condiciones de estrés nitro/oxidativo y Mt consiste en la potente concentración y actividad tiempo dependiente micobactericida de las RNOS, incluso en la fase de latencia. Es por esto que en este trabajo se propuso evaluar la viabilidad y respuesta biológica de micobacterias de una nueva serie de pro-drogas con el potencial de generar RNOS dentro del bacilo mediante la liberación de nitroxilo (HNO). Para llevar esto a cabo en primera instancia se realizaron ensayos empleando *E. coli* como modelo para determinar la CIM (concentración inhibitoria mínima), en cultivos bacterianos evaluando el crecimiento de las mismas mediante el monitoreo de la DO_{600nm} . Los compuestos utilizados son donores de Oxido Nítrico (NO), como el ampliamente utilizado Nitroprusiato de Sodio y la N-Nitrosomelatonina y donores de HNO sintetizados en el laboratorio (como la Sal de Angeli y derivados del ácido de Piloty). Una vez calculada la CIM, ensayamos si el efecto del compuesto era bacteriostático o bactericida realizando curvas de crecimiento bacterianas y recuento en placa a diferentes tiempos. Resultados preliminares muestran que donores de HNO y NO ensayados poseen una CIM similar a la observada para donores de NO reportados previamente en bibliografía y el efecto es bactericida. Tomando estos como punto de partida proyectamos estudiar con mayor detalle el mecanismo de acción de estos compuestos, analizando la susceptibilidad de cepas mutantes knock-out para genes bacterianos de defensa frente a las RNOS como los de la Flavohemoglobina o la Hemoglobina Truncada N. Los knock-out correspondientes serán realizados mediante la técnica de "recombining" en *E. coli* que emplea proteínas codificadas por bacteriófagos que permiten una alta tasa de recombinación empleando regiones cortas de homología.

FARMACOLOGÍA MOLECULAR 1

220. (214) POTENCIACIÓN MUSCARÍNICA DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL PACLITAXEL EN CÉLULAS MCF-7. PARTICIPACIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA 3

Salem A.; Español A.; Sales M.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET.

La utilización de combinaciones de drogas, en dosis metronómicas, es una ocasional solución para revertir un problema crítico en la terapéutica antitumoral como es la resistencia al tratamiento. Previamente demostramos que la combinación del agonista colinérgico carbacol (Carb) con el citostático paclitaxel (Px) potencia el efecto de este último promoviendo la apoptosis en un modelo murino de cáncer de mama. En este trabajo estudiamos la participación de la enzima óxido nítrico sintasa 3 (NOS3) en el efecto citotóxico de Carb+Px en células de adenocarcinoma mamario humano MCF-7. Por Western blot demostramos que estas células expresan las isoformas NOS1 y NOS3. Por el ensayo colorimétrico con el reactivo MTT determinamos que la combinación de Px en una concentración subterapéutica (10^{-9} M) con Carb en concentración subóptima (10^{-11} M) agregados durante 40 h disminuye la proliferación celular a un $65 \pm 19\%$ con respecto al control (100%; $p < 0,01$) potenciando el efecto del Px ($95,7 \pm 4,2\%$) sin que se observen efectos en las células mamarias normales MCF-10A. El agregado del inhibidor selectivo de NOS3, l134 (10^{-5} M) redujo el efecto producido por la combinación de las drogas sobre la proliferación celular. Al estudiar los niveles de óxido nítrico (NO) medido como nitrito (NO_2^-) con el reactivo de Griess se observó un incremento significativo ($1,33 \pm 0,12 \mu\text{M}$) con respecto al control ($p < 0,05$) al determinarlo después de 20 h de tratamiento con Carb+Px, que se revirtió en presencia de l134. Al finalizar el tratamiento (40 h) se observa una disminución significativa de los niveles de NO ($0,56 \pm 0,03 \mu\text{M}$; control $0,42 \pm 0,08 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) que acompaña a la muerte celular observada. Concluimos que la asociación Carb+Px en concentraciones subumbrales potencia la citotoxicidad del Px sobre células tumorales de mama humana MCF-7 por medio de la liberación de NO derivado de la isoforma NOS3.

221. (531) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA SUBFAMILIA CYP3A EN CORTES LAMINARES DE TEJIDO HEPÁTICO DE RATAS Y BOVINOS

Mate M.; Ballent M.; Lifschitz A.; Larsen K.; Lanusse C.; Virkel G.

Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires.

Numerosos estudios demostraron la utilidad de los cortes laminares de tejido hepático (*tissue slices*) para el estudio de la modulación de la expresión de enzimas pertenecientes al sistema citocromo P450 (CYP). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la administración de dexametasona (DEX) sobre la expresión y la actividad de CYP3A23 en rata y CYP3A28 en bovino, empleando cortes laminares de tejido hepático de ambas especies. Se prepararon *slices* hepáticos utilizando un microtomo Brendel/Vitron®. Los cortes laminares se incubaron (12 h) en ausencia (controles) y en presencia de DEX $100 \mu\text{M}$ en el medio de cultivo E de Williams y dentro de un incubador dinámico (Vitron®) bajo una atmósfera de O_2/CO_2 (95/5). Se determinó la viabilidad del tejido hepático por histopatología y cuantificando la actividad lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo. En *slices* hepáticos de rata, la DEX incrementó significativamente (controles = $1 \pm 0,218$; tratados = $3,59 \pm 0,833$) la expresión genética de CYP3A23 ($p < 0,05$) y la actividad metabólica CYP3A-dependiente (triacetilo-leandomicina N-desmetilasa). Sin embargo, en los *slices* hepáticos bovinos el tratamiento con DEX no produjo cambios a nivel de la expresión ni de la actividad de CYP3A28. Estos resultados son un nuevo aporte a la comprensión de las diferencias de especie en la respuesta a un mismo agente modulador de las enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos.

222. (651) ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION DEL COMPUESTO PRO-APOPTOTICO TIOSEMICARBAZONA DE LA 4,4'-DIMETOXIBENZOFENONA EN MODELOS DE LEUCEMIA AGUDA HUMANA

Cabrera M.¹; Gomez N.¹; Remes Lenicov F.³; Moglioni A.¹; Shayo C.²; Fernández N.¹; Davio C.¹

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica,

Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET²; Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (INBIRS)-CONICET, Universidad de Buenos Aires³.

El tratamiento de las leucemias agudas humanas continúa siendo un desafío al presente. Resultados previos permitieron identificar al compuesto tiosemicarbazona (TSC) de la 4,4'-dimetoxibenzofenona (T44Bf) como un inductor selectivo de apoptosis en un panel de líneas celulares utilizadas como modelos de leucemia aguda humana (KG1a, HL60, U937 y Jurkat). El presente trabajo tiene como objetivo la identificación de las vías de señalización y el mecanismo de acción involucrado en la actividad pro-apoptótica de T44Bf. Entre los mecanismos de acción descriptos para los compuestos pertenecientes a las TSC se encuentra la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la intercalación al ADN. Los resultados obtenidos en ensayos de estrés oxidativo y movilidad electroforética mostraron que la actividad pro-apoptótica de T44Bf no involucra ninguno de estos mecanismos. En ensayos de Western Blot observamos que T44Bf induce la fosforilación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 a partir de las 2h de tratamiento y de manera sostenida hasta las 24h. Numerosos trabajos indican una asociación entre la fosforilación de Bcl-2 y el pasaje a través de las distintas fases del ciclo celular. Mediante citometría de flujo observamos un arresto de las células en la fase G2/M luego del tratamiento con T44Bf en las líneas leucémicas ensayadas. Dado el papel de Bcl-2 en el mantenimiento de la integridad mitocondrial evaluamos el potencial de membrana mitocondrial en estos sistemas y observamos una pérdida del mismo a partir de las 3h alcanzando valores de $50 \pm 2\%$ ($p < 0,05$) a las 7h de tratamiento con T44Bf con respecto al control. En conjunto, estos resultados indican que la actividad de T44Bf involucra a la fosforilación de Bcl-2, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y al arresto de las células en la fase G2/M del ciclo celular. El presente trabajo propone al compuesto T44Bf como potencial agente pro-apoptótico para el tratamiento de leucemias agudas humanas.

223. (709) EL RECEPTOR DE GABA-A MUSCULAR DE CAENORHABDITIS ELEGANS (NEMATODA) COMO BLANCO DE AGENTES ANTIHELMÍNTICOS: ESTUDIO A NIVEL MOLECULAR Y COMPORTAMENTAL

Hernando G.; Bouzat C.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET, Universidad Nacional del Sur.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en vertebrados e invertebrados. Los receptores de GABA son blancos de agentes ansiolíticos, antiepilépticos, anestésicos, así como de antihelmínticos comúnmente utilizados en la medicina humana y veterinaria. En nematodos, los receptores de GABA tipo A (GABA_AR) se encuentran en músculo e intervienen en su locomoción. El músculo de nematodos posee un receptor inhibitorio sensible a GABA, siendo éste uno de los pocos GABA_ARs musculares existentes en la naturaleza. Antihelmínticos como la piperazina (PZE) producen parálisis flácida del músculo de nematodos por activación de éstos receptores. El nematodo de vida libre, *Caenorhabditis elegans*, es utilizado como un modelo de nematodos parásitos debido a su sencillez y fácil mantenimiento en el laboratorio. Nuestro objetivo es caracterizar al GABA_AR de *C. elegans*, y evaluar el modo de acción de antihelmínticos tanto a nivel molecular como comportamental. Para ello realizamos estudios electrofisiológicos para evaluar la activación por parte del agonista endógeno GABA, la droga muscimol y los antihelmínticos PZE e ivermectina (IVM). Así, detectamos y caracterizamos por primera vez corrientes unitarias de este receptor. Los canales poseen una amplitud media de $\sim 2,5\text{pA}$ ($\sim 100\text{mV}$) y tiempos de duración breves ($\sim 0,3\text{ms}$). También registramos corrientes macroscópicas que muestran diferentes amplitudes dependiendo de la droga activadora ($75\text{-}500\text{pA}$). A nivel comportamental, realizamos ensayos de parálisis sobre placas conteniendo agar con PZE, IVM o PZE más IVM, y monitoreamos el número de gusanos paralizados en el transcurso del tiempo. La mayor parte de gusanos adultos muere

a partir de 45 minutos de exposición a PZE, no así las larvas, demostrando la sensibilidad diferencial a agentes farmacológicos de *C. elegans* entre estados de desarrollo. La ausencia de GA-BA_Rs en músculo de vertebrado aumenta la importancia de esta caracterización, tanto desde un punto de vista evolutivo así como en el desarrollo de terapias antihelmínticas más selectivas, y a la creación de agentes de mayor eficacia y menos efectos adversos.

224. (767) RENOPROTECCIÓN INDUCIDA POR ERITROPOYETINA EN UN MODELO DE INJURIA RENAL AGUDA ENDOTOXÉMICA: REGULACIÓN DE LA VÍA APOPTÓTICA INTRÍNSECA

Stoyanoff T.¹; Todaro J.¹; Zimmermann M.¹; Teibler G.²; Lombardo D.³; Aguirre M.¹; Brandan N.¹

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Nordeste¹; Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Nordeste²; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires³.

La sepsis es una de principales causas de injuria renal aguda (IRA) en pacientes críticos y se constituye como un predictor independiente de mal pronóstico. La administración de lipopolisacáridos (LPS) en animales de experimentación reproduce muchas de las manifestaciones clínicas de la sepsis, incluida la IRA, que ha sido asociada con disfunción renal y apoptosis. Eritropoyetina (EPO) es una hormona citoprotectiva multifuncional que puede ejercer efectos antiinflamatorios, antioxidantes, angiogénicos y/o antiapoptóticos en numerosos tejidos. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos renoprotectores de EPO, a través de la expresión del receptor de EPO (EPO-R) y de proteínas asociadas a la regulación de la apoptosis mitocondrial, en un modelo de IRA endotoxémica. Ratonos machos Balb/c fueron divididos en cuatro grupos experimentales: Control, LPS (8 mg/kg,ip.), EPO (3000 UI/kg,sc.) y LPS+EPO. Se realizaron determinaciones bioquímicas de función renal, análisis histopatológico, ensayo de TUNEL, inmunohistoquímica y Western blotting de caspasa-3, Bax, Bcl-x_L, EPO-R y Citocromo c a las 24 hs post tratamiento. El grupo LPS+EPO evidenció una mejora significativa tanto de la función renal como de las alteraciones histopatológicas comparadas con el grupo LPS. Los resultados mostraron que la administración de EPO atenuó la apoptosis en células tubulares en concordancia con sobreexpresión de EPO-R, disminución del balance Bax/Bcl-x_L, inhibición de la liberación de Citocromo c al citosol y la activación de caspasa-3. Estos resultados sugieren que EPO ejerce renoprotección en la IRA inducida por LPS, a través de mecanismos antiapoptóticos involucrando la regulación de la vía apoptótica intrínseca y la expresión de EPO-R.

FARMACOLOGÍA CLÍNICA 1

225. (18) EFECTO DE NANOPARTICULAS DE PLATA SOBRE LEUCOCITOS HUMANOS

Aiassa Martínez I.¹; Quinteros M.¹; Páez P.¹; Dalmasso P.²; Albasa I.¹

Departamento de Farmacia¹; Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC)-CONICET, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba².

Las nanopartículas de plata (NpAg) han demostrado ser eficaces como antimicrobianos, pero es importante considerar su efecto sobre las células del huésped evaluando por ejemplo el daño por estrés oxidativo (EO). La regulación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) es particularmente importante en leucocitos polimorfonucleares (PMN) ya que cumplen un rol clave en la defensa del huésped frente a infecciones bacterianas por producción de ERO y especies reactivas del nitrógeno (ERN). Para contrarrestar el efecto del EO, las células aumentan su capacidad antioxidante inhibiendo la generación de radicales libres. Nuestro objetivo es determinar el efecto citotóxico de las NpAg evaluando la alteración del metabolismo oxidativo en PMN humanos. Las

NpAg fueron sintetizadas a partir de la reducción de iones plata por el sobrenadante de células de *Pseudomonas aeruginosa*. Los PMN se obtuvieron de sangre humana y se incubaron a diferentes tiempos y concentraciones de NpAg. Para la cuantificación de ERO se utilizó el método de la reducción del Azul de Nitro Tetrazolio (NBT). Los nitritos se cuantificaron mediante la reacción de Griess. Para la determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD), a cada muestra se le adicionó NBT, metionina, EDTA y riboflavina, se iluminó con luz fluorescente para desencadenar la reacción y se leyó espectrofotométricamente a 595 nm. Luego de 3h de exposición de los PMN a las NpAg la viabilidad fue del 50%. La mayor producción de ERO se observó a tiempo cero y en las muestras más concentradas, disminuyendo con el tiempo y la concentración de NpAg. Se observó una alteración en el estrés nitrosativo de los PMN. En el caso de la SOD, a todas las concentraciones ensayadas, se observó un aumento a la hora de incubación, disminuyendo con el tiempo. Las NpAg estimularon la generación de EO en los PMN que fue eficientemente contrarrestado por su respuesta antioxidante.

226. (106) FARMACOVIGILANCIA DE INMUNOSUPRESORES CALCINEURÍNICOS EN TRASPLANTE RENAL Y HEPÁTICO PEDIÁTRICO

Riva N.¹; Cáceres Guido P.^{1,2}; Rousseau M.²; Dip M.³; Monteverde M.⁴; Imventarza O.⁴; Mato G.²; Schaiquevich P.^{1,5}
Unidad de Farmacocinética Clínica, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"¹; Farmacia, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"²; Servicio de Trasplante Hepático, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"³; Unidad de Trasplante Renal, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"⁴; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina⁵.

El tratamiento inmunosupresor post-trasplante busca evitar el rechazo agudo y crónico. Es fundamental el control de los eventos adversos para favorecer la aceptación al tratamiento por el paciente y la sobrevida global. El objetivo del trabajo fue desarrollar un programa de farmacovigilancia de inmunosupresores en pacientes pediátricos trasplantados hepáticos y renales del Hospital de Pediatría JP Garrahan. Se evaluaron las reacciones adversas a medicamentos (RAM) de los pacientes trasplantados renales y hepáticos de nuestro hospital tratados con inhibidores calcineurínicos, ciclosporina (Cy) y tacrolimus (FK). Esto se realizó por revisión retrospectiva de historias clínicas de pacientes trasplantados en los años 2010-2011 y análisis prospectivo por farmacovigilancia activa de trasplantados cuyas complicaciones se presentaron en ateneos del Servicio de Trasplante desde marzo de 2011. Las RAM se notificaron a la autoridad sanitaria nacional. Se analizaron un total de 59 pacientes, 28 trasplantados renales y 31 hepáticos. Se notificaron, en ambos trasplantes, 60 RAM a Cy destacándose (número de casos) hipertensión arterial (19) y nefrotoxicidad (6). Asimismo, se registraron 46 RAM a FK, incluyendo hipomagnesemia (25), hipertensión (7) y nefrotoxicidad (5). El 70% y 98% de los eventos adversos a Cy y a FK respectivamente, fueron de severidad moderada o grave. Observamos un número mayor de niñas que desarrollaron hipertensión por tratamiento con FK en ambos trasplantes, respecto de los varones. La tendencia parece evidente si bien no hay una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.1$). Este es el primer proyecto en América Latina que propone y desarrolla el estudio cuali-cuantitativo intensivo de RAM a Cy y FK en trasplante pediátrico renal y hepático. Nuestros resultados se corresponden con los hallados en bibliografía para poblaciones pediátricas, si bien es importante continuar con el estudio a mediano y largo plazo.

227. (342) PREVALENCIA Y PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA

Ferrary T.¹; Calvano M.¹; Quintana M.¹; Armada M.¹; Echalde M.¹; Chapartegui R.¹; Landi M.²; Citera G.²; Orman B.¹
Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires¹; Servicio de Reumatología del Instituto de Rehabilitación Psicosfísica, Buenos Aires².

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica multisistémica de etiología desconocida. La enfermedad periodontal (EP) es una patología inmuno infecciosa que se disemina a nivel sistémico. Es de interés determinar la relación entre AR y EP. Los microorganismos en la placa dental subgingival dependen del área geográfica, raza, dieta, entre otros. En Argentina no existen publicaciones acerca de la microflora periodontal en pacientes con AR. **Los objetivos** fueron calcular la prevalencia de EP en AR comparado con un grupo control, describir el perfil microbiológico presente en la EP de los pacientes con AR en una población argentina. **Materiales y métodos:** se incluyeron 103 pacientes con AR. Se realizó evaluación clínica, eritrosedimentación, PCR y se calculó DAS28. Se evaluó presencia y severidad de EP (nivel de inserción y profundidad de la bolsa e índice hemorrágico). Como control 20 personas de la población general sin enfermedad reumática. Se estudiaron 92 sitios periodontales activos (grupo C: EP sin AR=16; grupo M1: AR+EP+Biológicos=17; grupo M2: AR+EP+Metrotexate=59). Se obtuvieron las muestras a partir de las bolsas periodontales, se extrajo el ADN genómico y se realizaron PCR específicas para los microorganismos periodontales. **Resultados:** Se observó una significativa diferencia entre pacientes con AR y controles respecto a la prevalencia de periodontitis crónica generalizada grave (PCGG) (22,0% vs. 5,9%, p=0,02) y moderada (30,0% vs. 17,6%, p=0,02). Las PCR permitieron determinar la prevalencia de los marcadores periodontopáticos en los grupos C, M1 y M2; siendo para Aa:12,5,17,6 y 18,6%; Fn:31,25,64,71 y 40,68%; Pg:43,75, 64,71 y 54,24%; Td:62,5,29,41 y 35,59%; Tf: 31,25,47,06 y 38,98%; respectivamente. **Conclusiones:** Pacientes con AR tienen una prevalencia mayor de PCGG y moderada comparada con los controles. Se observó asociación entre la presencia de los marcadores microbianos y la enfermedad periodontal.

228. (684) PROLONGACIÓN DEL INTERVALO QTC POR ANTIMICROBIANOS. COHORTE PROSPECTIVA DE PACIENTES INTERNADOS CON DIAGNÓSTICO PROBABLE DE INFECCIÓN

Scibona P.; Simonovich V.; Maid G.; Pérez Etchepare R.; Maldonado. S.; Llorente J.; Heller False Speiser M.; Digirolamo G.; Fernández G.; Godoy C.; Ginesi A.; Cruz C.; Belloso W.
Hospital Italiano de Buenos Aires

Introducción: La prolongación del intervalo QT (IQT) (valores normales:hombres: 0,44 mseg, mujeres: 0,46 mseg) está asociada al desarrollo de una taquiarritmia ventricular conocida con el nombre de torsada de puntas (TdP) que puede progresar hacia la fibrilación ventricular y muerte súbita. La prolongación del IQT (PIQT) puede estar determinada en forma congénita o adquirida. La forma adquirida de PIQT es la más frecuente y puede estar dada por múltiples causas, pero la causa principal es secundaria a la administración de drogas. El propósito de este estudio es determinar la relación entre la PIQT corregida (PIQTc), la utilización de fármacos antimicrobianos y a otros factores asociados a este fenómeno. Metodología: Estudio analítico observacional de cohorte prospectiva. Se analizaron los electrocardiogramas de pacientes internados con sospecha de infección, antes y después de recibir terapia antimicrobiana, junto con la medición de otras variables. Se realizó un seguimiento a las 4 semanas para evaluar el QM luego de la terapia antimicrobiana. Resultados: Hasta el momento se enrolaron 84 pacientes (mujeres: 41, Hombres: 43), edad promedio 66.27 años, de los cuales 25 pacientes (29%) prolongaron el IQTc posterior a la administración de antimicrobianos, principalmente ciprofloxacina, amoxicilina-sulbactam y piperacilina-tazobactam. Conclusiones: La PIQTc en pacientes con sospecha de infección que reciben tratamiento antimicrobiano es altamente frecuente e inadvertida.

229. (750) UTILIZACION DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN EL TRATAMIENTO DE ULCERAS CORNEALES

Tartara L.; Acosta L.; Oliveres E.; Castro G.; Allemandi D.
Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET; Departamento de Farmacia,

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

El plasma rico en plaqueta (PRP) se obtiene tras la centrifugación de sangre completa no coagulada y es posible utilizarlo en la modulación y aceleración de los procesos regenerativos (restauración de tejido que posee propiedades indistinguibles del original) a través de los factores de crecimiento presentes en las plaquetas. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar en conejos un modelo experimental de úlcera corneal no infecciosa para el tratamiento de las mismas con PRP. Se provocaron úlceras corneales de 10 mm de diámetro en conejos New Zealand mediante remoción del epitelio corneal (instilando previamente alcohol al 50%) mediante el uso de una espátula roma. Se tomaron imágenes fotográficas para registrar las lesiones y poder establecer las áreas de curación por medio de aplicaciones informáticas. Se extrajo sangre de los conejos para la preparación del PRP; la misma fue procesada mediante centrifugación diferencial. Los conejos fueron divididos en 3 grupos: el grupo A fue tratado con solución salina estéril al 0,9% cada 8hs durante 7 días, el grupo B con un gel extracto desproteínizado de sangre de ternera (Solcoseryl®) cada 8 hs durante 7 días y el grupo C recibió 1 gota del PRP el día 1 y el día 3 de seguimiento. Los controles fueron realizados diariamente durante una semana. Se observó una mayor regeneración del epitelio corneal en los grupos B y C, en comparación con el grupo A. Los grupos B y C presentaron similares tasas de regeneración con la diferencia que el grupo C fue tratado con una posología reducida. Los animales tratados con PRP presentaban menor irritabilidad que aquellos de los grupos A y B. Como conclusión se puede destacar: a) la puesta a punto de un modelo experimental de úlcera corneal no infecciosa; b) la eficacia diferencial del PRP que mostró resultados similares a la muestra comercial (Solcoseryl®) utilizando dosis menores.

FARMACOTERAPÉUTICA 1

230. (11) EVALUACIÓN IN VITRO/IN VIVO DE LA EFICACIA DEL COMPLEJO HIALURONANO-TIMOLOL (HI-T) EN EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN INTRAOCULAR

Battistini F.; Tártara L.; Olivera M.; Palma S.; Manzo R.
Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Existen antecedentes sobre la utilización de las denominadas sales de hialuronano-fármaco (Hi-F) en formulaciones oftálmicas. Sin embargo, no se dispone de información detallada sobre los mecanismos que determinan una mayor eficacia de los F vehiculizados. En este trabajo se desarrolla un estudio detallado utilizando la sal comercial HiNa y la forma ácida HiH como agentes acomplejantes de T maleato (TM). Ambos complejos (HiNa-TM) y (HiH-TM) exhibieron una alta condensación iónica (>97%), sin embargo el primero exhibió mayor viscosidad. Asimismo, exhibieron una capacidad equivalente de modular la liberación de T en celdas bicompartmentales limitadas por una membrana semipermeable, tanto frente a agua o solución fisiológica como medios receptores. En el estudio comparativo de permeabilidad transcorneal *in vitro* entre el complejo HiNa-TM y una solución equivalente de TM, se observó una mayor velocidad de permeación del fármaco desde TM respecto a HiNa-TM. Por último, el estudio comparativo de la disminución de la presión intraocular (PIO) en conejos normotensos utilizando como referencia la formulación comercial de TM (Zopiro®) permitió observar que HiNa-TM produjo un descenso de PIO cuya duración del efecto fue significativamente incrementado. Sin embargo el efecto del complejo HiH-TM no se diferenció de Zopiro. Estos nos permiten concluir que el acomplejamiento de T es efectivo con ambos sistemas (HiNa y HiH). Que aun cuando ambos complejos modulan la liberación del T en forma equivalente, la mayor bioadhesividad relacionada a la viscoelasticidad de HiNa-TM, es determinante para prolongar *in vivo* el efecto farmacodinámico. Por otra parte, aún cuando TM exhibió mayor velocidad de permeación transcorneal *in vitro* que

HiNa-TM el inicio y la intensidad del efecto farmacodinámico no se vió afectado. En conclusión, tanto la alta afinidad del complejo, como la viscosidad del sistema obtenido, son determinantes de la mayor eficacia obtenida.

231. (93) NANOPARTÍCULAS DE DERMATÁN SULFATO PARA EL TRATAMIENTO Y/O DIAGNÓSTICO DE LA INJURIA VASCULAR

Rasente R.¹; González A.¹; Imperiale J.²; Sosnik A.²; Cabalrese G.¹

Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Tecnología Farmacéutica II, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

El dermatán sulfato (DS) es una biomolécula de la matriz extracelular vascular que sufre modificaciones cualitativas y cuantitativas durante la injuria. Nuestra hipótesis general postula que las nanopartículas (NPs) con DS podrían diferenciar el endotelio normal del injuriado. El objetivo fue producir y caracterizar NPs de DS y quitosano (QT) con potencial acción terapéutica o de diagnóstico. Para la obtención se empleó DS (Syntex, Arg.) de 5 kDa, altamente sulfatado ($27.7 \pm 1.9 \mu\text{g}\%$) con una potencia anticoagulante de 1 U/mg; y QT de bajo peso molecular (Sigma). Seis ml de solución de DS (0,05%, pH 3,5) fueron inyectados (flujo: 40 ml/hora) sobre 10 ml de solución de DS (0,015%, pH 3,5) con agitación magnética constante durante la inyección y por 15 min después de finalizada la misma. Sobre las NPs obtenidas se evaluó: (i) la concentración de DS por el método del indol; y (ii) el diámetro promedio, la distribución de tamaños y el potencial Z (ZP) por DLS (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, UK). Estas últimas evaluaciones fueron realizadas al momento de la obtención y a lo largo de 28 días, con el objeto de evaluar la estabilidad física de las NPs. El tamaño promedio de las NPs recién obtenidas fue $720,5 \pm 83,45 \text{ nm}$ (n=9), con un ZP de $+38,63 \pm 1,25$ (n=3). La actividad biológica de las soluciones de partida y de las NPs fue evaluada sobre cultivos de endotelio cardíaco (H5V) y sobre macrófagos murinos como los principales tipos celulares involucrados en la aterogénesis. La actividad metabólica fue evaluada por MTT; y el ciclo celular por citometría de flujo, frente a dosis crecientes (0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de DS, QT y NPs. Ambos tipos celulares no mostraron diferencia en el índice de proliferación celular. Los resultados obtenidos sugieren que: (i) el procedimiento descrito permite obtener NPs de DS/QT estables en el tiempo y (ii) estos complejos de polielectrolitos no afectan la actividad metabólica ni la proliferación celular.

232. (378) ANÁLISIS DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DEL COMPLEJO ALBENDAZOL:CITRATO DE BETA-CICLODEXTRINA EN LA ETAPA PARENTERAL DE LA INFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS EN RATONES CBI-IGE

García A.^{1,5,6}; Codina A.^{2,3,6}; Vasconi M.^{2,4}; Leonardi D.^{1,5}; Di Masso R.^{2,3}; Hinrichsen L.^{2,3}; Lamas M.^{1,5}

Instituto de Química de Rosario (IQUIR)-CONICET¹, Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario²; CIC-UNR, Universidad Nacional de Rosario³; Área Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario⁴; Área Técnica Farmacéutica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario⁵; Contribuyeron Igualmente⁶.

La trichinellosis es una infección zoonótica provocada por parásitos del género *Trichinella*. Esta parasitosis es de difícil tratamiento debido a que no presenta signos patognomónicos en sus inicios y llega a la cronicidad en la mayoría de los casos. Uno de los fármacos empleados para el tratamiento de esta enfermedad es el albendazol (ABZ), considerado de Clase II según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica. El objetivo de este trabajo fue incrementar la velocidad de disolución del ABZ mediante la formación de complejos de inclusión con un nuevo derivado de β -ciclodextrina (β -CD) y evaluar su efecto antiparasitario en la fase

parenteral de la infección por *Trichinella spiralis*, empleando un modelo murino. Se sintetizó citrato de β -CD (C- β -CD) y se utilizó para formar un complejo en relación equimolar con ABZ mediante secado por aspersión. La evaluación biológica se realizó en ratones machos CBI, del modelo murino del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR. Los animales se infectaron por vía oral con 2 larvas musculares por g de peso corporal y se dividieron en tres grupos: control, tratado con ABZ y tratado con ABZ:C- β -CD (n=10 por grupo). Los ratones recibieron una dosis diaria de 50 mg/kg de peso de ABZ en los días 28, 29 y 30 post-infección. Una semana después se estimó el porcentaje de larvas L1 muertas en el huésped por recuento de larvas viables y no viables en lengua, empleando una técnica de tinción diferencial. El grupo control mostró un porcentaje de larvas L1 muertas menor que los grupos tratados (mediana control, 6%; ABZ, 26.8%; ABZ:C- β -CD, 43.6%) (P=0.0007). El aumento en la proporción de larvas L1 muertas producido por ABZ:C- β -CD comparado con ABZ sin transportador no llegó a tener significado estadístico (P>0.05). Sin embargo, el incremento del 16.8% en la mortalidad de las larvas producido por ABZ:C- β -CD podría deberse a la mayor velocidad de disolución del ABZ incluido en el complejo.

233. (633) EVALUACIÓN DE LA EFICACIA IN VITRO DEL COMPLEJO IÓNICO HIALURONANO-DOXORRUBICINA FRENTE A CULTIVOS DE CÉLULAS TUMORALES

Battistini F.¹; Flores J.²; Olivera M.¹; Genti S.²; Manzo R.¹

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba².

Estudios previos demuestran que fármacos (F) acomplejados con Hialuronano (Hi-F) se liberan lentamente a través de membranas bicompartmentales limitadas por una membrana semipermeable cuando se utiliza agua como medio receptor. El reemplazo de éste por solución de NaCl aumenta la velocidad de liberación del F por un mecanismo de intercambio iónico, evidenciando la capacidad portadora del Hi. El propósito de este estudio fue evaluar la potencialidad del complejo iónico Hialuronano-Doxorrubicina (Hi-Dx) como sistema portador de fármacos para el tratamiento antineoplásico. Es conocido que los receptores de membrana del Hi, denominados CD44, se encuentran sobre-expresados en células cancerígenas, por lo que se diseñó un estudio comparativo *in vitro* entre Hi-Dx y Dx. La reacción entre los grupos ácidos de Hi y los básicos de Dx.HCl produce una elevada condensación iónica (>95%), generando un complejo portador soluble tanto cuando se utiliza la sal HiNa como el ácido HiH. Se determinó la actividad antineoplásica de Hi-Dx frente a un cultivo de células de cáncer pulmonar (A549) mediante el ensayo colorimétrico de viabilidad celular (MTT), microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, utilizando como referencia Dx en concentraciones equivalentes. El área sobre la curva obtenida en el ensayo MTT fue 3 veces mayor para el complejo Hi-Dx que para la solución de Dx, lo cual sugiere una mayor eficacia del sistema para retener la Dx intracelularmente. La microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo estuvieron en línea con estos resultados y demostraron que existe una mayor concentración de Dx intracelular cuando el mismo se encuentra vehiculizado en el Hi. Estos estudios demuestran la potencialidad que tiene el Hi como sistema portador de F anticancerígenos, y la mayor eficacia que tienen el sistema portador por sobre la solución de Dx de referencia sobre las células tumorales.

234. (683) USO DE LA CRIOMOLIENDA COMO ALTERNATIVA EN EL DISEÑO DE FORMAS FARMACEUTICAS DE GANODERMA LUCIDUM (FR.) KARST

Formica M.¹; Bidegain M.³; Curvetto N.²; Cubitto M.³; Palma S.¹

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET, Departamento Farmacia,

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales, CERZOS-CONICET, Bahía Blanca²; Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca³.

Introducción: Ganoderma lucidum (Fr.) Karst (GL), especie de basidiomicetos perteneciente a Polyporaceae es utilizado desde la antigüedad en la medicina oriental para la promoción de la salud y la longevidad. Tanto los cuerpos fructíferos, esporas y micelios cultivados de GL, así como sus extractos son utilizados como ingredientes en alimentos para la salud, hierbas medicinales y suplementos dietéticos. Sin embargo el producto de la desecación del hongo no posee propiedades adecuadas para el diseño de formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos o capsulas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la técnica de **criomolienda (CM)** como alternativa en la obtención de sólidos pulverulentos a partir de GL. **Métodos:** La molienda del cuerpo fructífero de GL fue realizada a escala de laboratorio utilizando fracciones sucesivas de aire líquido sobre una muestra trozada del mismo y moliendo manualmente con pilón. Para obtener partículas de tamaño uniforme, se expuso a GL a este proceso hasta su total paso por tamiz Mesh25. Con el material resultante se diseñaron y caracterizaron comprimidos por granulación húmeda. **Resultados:** El método de CM resultado apropiado para moler el material el cual fue incorporado exitosamente en comprimidos. Se desarrollaron tres formulaciones F1 (GL40%-Almidón(AI)60%), F2 (GL50%-AI50%) y F3 (GL60%-AI40%). Las variables obtenidas para los granulados fueron para F1: Índice de Carr(IC)=13,18; Índice de Housner(IH)=1,13 y ángulo de reposo(α)=27,11°; F2: IC=15,19; IH=1,15 y α =27,64° y F3: IC=16,77; IH=1,17 y α =30,23°; y para los comprimidos F1: peso promedio(PC)=0,099g, porcentaje de pérdida de peso (PP)=0,22%; F2: PC=0,101g, PP=0,22%; F3: PC=0,107g, PP=0,24%. **Conclusiones:** Debido a la naturaleza leñosa del material se hace imperativo utilizar una técnica alternativa de molienda. En ese sentido la CM resultado ser una plataforma sencilla, escalable y adecuada para lograr formas farmacéuticas optimizadas de GL.

235. (807) POTENCIALES IMPLICANCIAS EN LA FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE DIVERSOS COPOLÍMEROS DE POLI(ÓXIDO DE ETILENO) Y POLI(ÓXIDO DE PROPILENO) EMPLEADOS EN LA FORMULACIÓN DE DROGAS ANTIVIRALES Y ANTITUMORALES

Cuestas M.; Castronuovo C.; Delfino C.; Gentile E.; Castillo A.; Oubiña J.; Mathet V.

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: La farmacogenómica estudia las bases moleculares y genéticas de las enfermedades para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Basado en ello, la genómica polimérica estudia de qué manera las moléculas poliméricas y nanomateriales empleados en la formulación de drogas pueden afectar la respuesta celular o del organismo hacia ellas. Se considera a los polímeros empleados en estas formulaciones (como los copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) [PEO y PPO] que se emplean en la formulación de drogas antivirales y antitumorales) como excipientes biológicamente inertes o GRAS. Este paradigma está siendo reconsiderado dada la creciente evidencia que sugiere que dichos compuestos tendrían diversos efectos sobre las células del organismo. **Objetivo.** Estudiar el efecto de copolímeros de PEO-PPO en la inmortalización celular y la apoptosis. **Diseño del Estudio:** Las líneas celulares de hepatoma humano, PLC/PRF/5 y SKHep1 se incubaron con los copolímeros T904, T304, T1107 y el F127 a diversas concentraciones (1%; 0,1%; 0,01%). Al cabo de 24 y 72 h. se analizó mediante RT-PCR Multiplex los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y *telomerasa (h-terf)*. La capacidad inductora de apoptosis por parte de dichos surfactantes se estudió con anexina V-FITC/IP mediante citometría de flujo. **Resultados:** En ambas líneas celulares con todos los copolímeros ensayados se evidenció -principalmente

a las 72 h- un incremento estadísticamente significativo en los niveles de ARNm de *bax* y de *h-terf*. Dichos surfactantes además indujeron apoptosis en ambas líneas celulares al cabo de 72 h de exposición a los mismos. **Conclusiones:** Se debería evaluar exhaustivamente los efectos farmacogenómicos de estos materiales poliméricos empleados en la formulación de drogas antivirales y antitumorales con el fin de optimizar los resultados clínicos y comprender los efectos farmacológicos y toxicológicos de las formulaciones medicamentosas preparadas con dichos excipientes.

236. (856) SISTEMA DE LIBERACIÓN MODIFICADA CARBOMER-CIPROFLOXACINO CON POTENCIAL UTILIDAD EN EL TRATAMIENTO INTRAUTERINO DE ENDOMETRITIS: DESARROLLO Y EVALUACIÓN IN-VITRO E IN-VIVO

Breda S.¹; Confalonieri A.²; Ceballos L.²; Manzo R.¹; Sánchez Bruni S.²; Olivera M.¹

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET¹; Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires².

El objetivo de este estudio fue preparar un sistema de liberación sostenida capaz de vehicular ciprofloxacino (CIP) en concentraciones terapéuticas con propiedades convenientes para su administración intrauterina (IU). Utilizando Carbomer (Cb) como portador se obtuvo el hidrogel Cb-CIP. El pH y la viscosidad fueron regulados balanceando el% de neutralización de Cb con el agregado de un contraión. La reología y las propiedades fisicoquímicas (aspecto; pH; valoración; cinética de liberación) fueron evaluadas antes y después de un ciclo de autoclave. Se evaluó la estabilidad durante 6 meses. Los niveles plasmáticos y uterinos luego de la administración IU de una dosis del hidrogel (2mg CIP/Kg) fueron evaluados en ratas Wistar hembra y comparados con los obtenidos tras la administración intragástrica (IG) de una solución acuosa de CIP a la misma dosis. Cb-CIP es traslucido y físicamente estable. Vehiculiza CIP 0,25% a un pH=7,02, concentración significativamente mayor a su solubilidad. Su flujo es No-Newtoniano plástico, sin tixotropía. No se observaron productos de degradación, ni modificaciones en la apariencia o la reología luego del autoclavado y del estudio de estabilidad. Frente a fluidos biológicos, Cb-CIP libera CIP con una cinética que ajusta a la raíz cuadrada del tiempo, alcanzándose concentraciones bactericidas desde 45 min. El hidrogel por vía IU produjo C_{max} y ABC de CIP en útero significativamente mayores ($p<0,05$) a la administración IG de la solución, con niveles plasmáticos significativamente menores. La C_{max}/CIM_{90} indica que CIP en útero luego de la administración IU del hidrogel es 2-3 veces mayor que la CIM_{90} de los patógenos encontrados en endometritis. La administración IG de la solución produjo concentraciones sub-CIM en útero. El hidrogel Cb-CIP puede ser una opción eficiente y segura para el tratamiento de la endometritis en medicina humana y veterinaria, proveyendo niveles elevados de fármaco en útero y minimizando su exposición sistémica.

TOXICOLOGÍA 1

237. (60) UTILIZACIÓN DE ALEACIONES DE MAGNESIO COMO MATERIAL IMPLANTABLE BIOABSORBIBLE: EFECTO CITOTÓXICO DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

Álvarez F.¹; Grillo C.¹; Lorenzo M.^{1,2}

Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CCT-CONICET La Plata¹; Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, La Plata².

El Mg y sus aleaciones han sido propuestos como materiales implantables bioabsorbibles (MBs), debido a sus notables ventajas respecto a los implantes metálicos tradicionales. Sin embargo, poco se sabe del efecto de los productos de degradación (PD)

sobre las células aledañas al implante. El objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles cambios celulares inducidos por MBs de Mg y dos aleaciones (Mg-A: ZEK100 y AZ31) en células CHO-K1. Los ensayos de viabilidad (incubación: 24h), mediante tinción con naranja de acridina y la capacidad de formar colonias de las células (incubación: 6 días) permitieron analizar los efectos citotóxicos en función de la distancia de las fuentes liberadoras de iones (discos de Mg y Mg-A). El efecto de los PD se evaluó mediante el ensayo de Rojo Neutro (RN) reemplazando el medio de cultivo por el extracto obtenido después de la inmersión de los discos metálicos por 24 h en medio de cultivo (Ex). Los resultados de viabilidad mostraron una disminución ($p < 0,001$) de la densidad celular en las regiones A y B analizadas (distancia del disco $< 15\text{mm}$ y $> 15\text{mm}$, respectivamente) tanto para el Mg como para Mg-A. El número de colonias disminuyó al menos 75% para el Mg respecto al control en ambas regiones, siendo $< 15\%$ para las Mg-A. Asimismo, el diámetro de las colonias en presencia de los discos de Mg fue menor respecto al control ($< 40\%$) en ambas regiones ($p < 0,001$). En cambio, en el caso de las Mg-A sólo ZEK100 mostró una disminución respecto a AZ31 ($p < 0,01$) y al control ($p < 0,001$) en la región A. El ensayo de RN evidenció una disminución de la actividad lisosomal de las células expuestas por 24 h al Ex-Mg ($p < 0,001$). Los resultados obtenidos muestran un mayor efecto citotóxico para el Mg que para las Mg-A, probablemente debido a la mayor concentración de iones liberados, ya que su velocidad de degradación es superior a la de las Mg-A. En el caso de Mg-A la presencia de elementos aleantes podría influir también sobre la capacidad proliferativa.

238. (173) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A DIETILSTILBESTROL SOBRE EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA EN RATAS CON TERAPIA ESTROGÉNICA

Gomez A.; Delconte M.; Altamirano G.; Luque E.; Muñoz-De-Toro M.; Kass L.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Evidencias epidemiológicas vinculan la exposición a esteroides ováricos al aumento del riesgo de desarrollar lesiones mamarias. Sin embargo, los efectos sinérgicos/acumulativos de la exposición a xenoestrógenos durante periodos críticos del desarrollo mamario han sido poco estudiados. Nos propusimos evaluar en animales de mediana edad sometidos a terapia con estradiol (E2) los cambios producidos en la glándula mamaria (GM) y los efectos a largo plazo del tratamiento perinatal con dietilstilbestrol (DES). Ratas Wistar preñadas fueron expuestas a través del agua de bebida a 5 ug DES/kg/día o vehículo (0.001% etanol) desde el día 9 de gestación hasta el destete. Para evaluar la respuesta mamaria a la terapia hormonal, crías (F1) de 12 meses edad (DPN365) expuestas durante la gestación y lactancia a vehículo ó DES fueron ovariectomizadas y tratadas con E2 durante 3 meses. Se obtuvieron muestras de GM en DPN455 y, para diferenciar alteraciones de la GM inducidas por el tratamiento con E2, se obtuvieron muestras de hembras vírgenes intactas en estro de la misma edad. Se realizó un análisis histopatológico de la GM, se cuantificó el índice de proliferación celular y la expresión de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP). La GM de animales de mediana edad intactos en estro es predominantemente una estructura túbulo-alveolar, el tratamiento con E2 indujo la dilatación de conductos y alveolos y el desarrollo de estructuras lóbulo-alveolares y quísticas. El índice de proliferación celular fue mayor en los conductos quísticos que en los conductos normales y la exposición perinatal a DES seguida del tratamiento con E2 indujo una mayor presencia de quistes en la GM; tanto conductos normales como quísticos expresaron RE y RP. En animales de mediana edad, la exposición perinatal a DES potenció las alteraciones morfológicas inducidas en la GM por el tratamiento con E2, evidenciando una mayor susceptibilidad al desarrollo de lesiones mamarias.

239. (197) IMPACTO DE LA TEMPERATURA DE LOS PROCESOS UHT Y DE ELABORACIÓN DE DULCE DE LECHE,

SOBRE CONCENTRACIONES RESIDUALES DE CLOSANTEL EN LECHE OVINA

Iezzi S.; Lifschitz A.; Farías C.; Imperiale F.; Lanusse C. *Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires.*

Se ha demostrado que después de la administración de cualquier tratamiento veterinario, los residuos del medicamento aparecen en los productos comestibles obtenidos de los animales tratados, es por esto que surge la necesidad de mayor información sobre la estabilidad y los niveles residuales de fármacos en leche y productos lácteos. Closantel (derivado de las salicilaniidas), fármaco de elevada liposolubilidad y alta unión a proteínas plasmáticas se presenta actualmente como una alternativa para el tratamiento de parasitosis internas que afectan a ovinos lecheros. En la producción ovina de quesos y dulce de leche se utiliza una amplia variedad de procesos tecnológicos a los cuales puede ser sometida la leche en la industria como el proceso UHT (Ultra High Temperature) y procesos de altas temperaturas (100°C) para elaboración de dulce de leche. En este trabajo se intenta realizar un aporte a la industria láctea y a la salud alimentaria de los consumidores, estudiando la estabilidad de los residuos de closantel en leche ovina en el proceso UHT y sometidos a la temperatura de elaboración de dulce de leche. Muestras de leche ovina con diferentes concentraciones de CLS (rango de 0.25 a 5 µg/ml) fueron sometidas a un proceso UHT (135°C-4seg.) y muestras de leche con las mismas concentraciones del fármaco fueron sometidas a la temperatura de elaboración de dulce de leche (100°C-70min.). Luego de los tratamientos térmicos se realizó el análisis de las muestras experimentales por HPLC y se compararon las concentraciones obtenidas con las de las muestras control (no sometidas a tratamiento térmico). Los resultados obtenidos indicaron que los cambios en los residuos de CLS no fueron significativos luego de los tratamientos térmicos aplicados. Las variaciones observadas estuvieron dentro del rango de variación del método. El impacto de los residuos de CLS presentes en la leche y derivados sobre la salud del consumidor a largo plazo debe ser cuidadosamente analizado.

240. (372) ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DEL KNOCKDOWN DE AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS HEPÁTICAS

Marchissio M.; Frances D.; Carnovale C.; Marinelli R. *Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe.*

La aquaporina-8 (AQP8) humana posee permeabilidad al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y se expresa en la membrana interna mitocondrial del hepatocito y de células de hematoma humano HepG2. Previamente demostramos que la expresión defectiva de la AQP8 mitocondrial (mtAQP8) en HepG2, afecta la liberación de H₂O₂ causando disfunción mitocondrial y pérdida de viabilidad celular por un mecanismo necrótico. A fin de realizar un estudio comparativo del efecto del knockdown de mtAQP8 sobre la viabilidad de otras células hepáticas, se utilizaron células HuH-7 (derivada de hepatoma humano) y Chang-Liver (derivadas de hígado normal) como así también hepatocitos de rata. La expresión proteica de mtAQP8 se silenció (aprox. -60%, $P < 0,05$) mediante la técnica de ARN de interferencia y la viabilidad celular se analizó por el ensayo de MTT, liberación al medio de cultivo de lactato deshidrogenasa (LDH) y por el ensayo de exclusión de azul tripán. Se observó pérdida de viabilidad celular únicamente en células HuH-7 (ensayo MTT: -15%; liberación de LDH: +40%, exclusión de azul tripán: -15%; $P < 0,05$). El mecanismo de muerte celular en la línea HuH-7 fue evaluado por el ensayo de Anexina V/Ioduro de Propidio mediante citometría de flujo, el cual mostró un importante aumento de células sufriendo muerte celular necrótica, pero no apoptótica. Nuestros resultados sugieren que el knockdown de mtAQP8 en células HepG2 y Huh-7 induce la pérdida de viabilidad celular a través de un mecanismo necrótico, un fenómeno no observado en células hepáticas normales.

241. (376) LA EXPOSICIÓN A MANGANESO INDUCE APOPTOSIS Y PERTURBACIONES EN LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS HUMANAS DE EPITELIO LARÍNGEO HEP-2 Y DE HEPATOMA HEP-G2

Scarinci M.; Alaimo A.; Gorojod R.; Kotler M.
Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-Oncología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET.

La sobreexposición ocupacional al manganeso (Mn) provoca daños neurológicos clínicamente semejantes a la enfermedad de Parkinson. Su toxicidad se manifiesta primariamente en el hígado por ser el órgano detoxificante y también afecta al sistema respiratorio dado que la inhalación es la principal ruta de incorporación. A nivel subcelular, las mitocondrias incorporan Mn. Estas organelas son dinámicas y de morfología variable como resultado de procesos de fusión y fisión regulados por un grupo específico de GTPasas. Nuestro objetivo fue evaluar la toxicidad del Mn en células humanas de epitelio laríngeo (HEP-2) y de hepatoma (HEP-G2) y su impacto sobre los eventos de fusión y fisión mitocondrial. Se realizó una curva dosis-respuesta (0-1000µM; 24hs) en base a la cual se eligió 350µM como la concentración óptima de trabajo. En estas condiciones el Mn induce una disminución de la viabilidad (MTT y Neutral Red) del 45±2% y 25±2% (p<0,001) en HEP-G2 y del 54±3% (p<0,001) y 45±1% (p<0,001) en HEP-2. Ambas líneas celulares exhibieron retracción de su volumen, burbujeo de la membrana plasmática (microscopía de contraste de fase) y presencia de núcleos fragmentados y condensados (Hoechst 33258), eventos típicos de la apoptosis. Empleando MitoTracker Red se detectaron mitocondrias dispuestas en extensas redes tubulares en las células Hep-2 y HEP-G2 control que fueron desmanteladas por exposición a Mn al tiempo que se observaron morfologías mitocondriales del tipo esferas, loops y cúmulos. Además se detectaron células con pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Finalmente, el análisis western blot reveló alteraciones en los niveles de expresión de las proteínas moduladoras de la morfología mitocondrial (Opa-1, Mfn-2 y Drp-1). En este trabajo demostramos por primera vez que el Mn induce apoptosis y perturbación de la dinámica mitocondrial en células hepáticas y de epitelio laríngeo.

242. (424) EL ARSENICO IMITA LOS EFECTOS DEL ESTROGENO EN LA ADENOHIPOFISIS Y EN EL UTERO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Ronchetti S.¹; Croco M.¹; Cabilla J.¹; Benzo Y.¹; Kelmansky D.²; Duvilanski B.¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Cálculo, Facultad de Ciencias Exactas Naturales, Universidad de Buenos Aires².

La contaminación provocada por arsénico inorgánico (iAs) es uno de los mayores problemas sanitarios a nivel mundial. El estrógeno (E2) cumple un papel clave en la proliferación celular de tejidos hormona-dependientes. Previamente se demostró que el iAs reproduce los efectos del E2 induciendo la proliferación celular de la línea tumoral de mama MCF-7. Se ha sugerido que iAs actúa como un metaloestrógeno sin embargo, hasta el momento estas acciones *in vivo* no han sido reportadas en otros tejidos. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vivo*, si el iAs imita los efectos del E2 en la adenohipofisis (ADH) y en el útero. Se utilizaron ratas hembras Wistar ovariectomizadas las cuales fueron expuestas o no (Control) al iAs en el agua de bebida en diferentes dosis (0.01- 0.1 o 1 ppm) durante 30 días. En las ADH se determinó la expresión del ARNm de genes de respuesta al E2. El tratamiento con iAs (0.1 y 1 ppm) incrementó la expresión del ARNm de prolactina (PRL) (expresión relativa PRL,% del C; 0.1ppm: 144.3±8.3^{*}; 1ppm: 142.5±8.9^{*}, p<0.05). Dado que 0.1 ppm mostró ser la mínima concentración en causar un efecto, fue seleccionada para los siguientes estudios. El iAs aumentó la expresión de las ciclinas D1 y D3 (Cyc D1-Cyc D3) (expresión relativa Cyc D1,% del C; iAs: 124.5±1.2^{*}, p<0.01; Cyc D3, iAs:

139.9±8.9^{*}, p<0.01). En los úteros se determinó el área glandular y la altura del epitelio analizando secciones de 3 sitios separados por no menos de 0,5cm uno del otro, coloreadas con hematoxilina-eosina. La exposición al iAs incrementó significativamente el área glandular (promedio 90% respecto del control, P=0,001). De igual forma aumentó la altura del epitelio uterino (promedio 80% respecto del control, P=0,00001). El iAs a bajas concentraciones (0.1ppm) reproduce acciones del E2 en adenohipofisis y en útero, lo cual da indicios de que este metaloide afecta la fisiología reproductiva pudiendo promover el desarrollo de patologías hormona-dependientes.*Asistencia en técnicas histológicas, Lic. Cristina Deparci

243. (446) AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE COX-2 Y EN LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS, EN CÉLULAS DE ENDOMETRIO HUMANO, POR EXPOSICIÓN AL PESTICIDA HEXACLOROBENCENO

Chiappini F.¹; Vaccarezza A.²; Pontillo C.; Miret N.¹; Alvarez L.¹; Kleiman de Pisarev D.¹; Farina M.³; Randi A.¹
Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Cátedra de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides²; Laboratorio de Fisiopatología Placentaria, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET-UBA³.

La endometriosis es un desorden ginecológico que afecta a mujeres en edad reproductiva, causando discapacidad asociada con dismenorrea, dolor pélvico y subfertilidad. Algunos pesticidas organoclorados pueden inducir endometriosis por modulación de la función endocrina e inmune. El Hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental persistente con efectos tóxicos en humanos y en animales de laboratorio. A nivel regional, se encuentra en leche materna de puérperas y en leche vacuna para consumo humano. Se observó en células epiteliales y estromales de endometrio humano, que la prostaglandina E2 producida por Ciclooxygenasa 2 (COX-2) induce activación de c-Src a través de receptores de prostaglandinas EP2/EP4, conduciendo a la liberación de metaloproteasas (MMPs) y favoreciendo el desarrollo de endometriosis. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del HCB sobre parámetros moleculares e inflamatorios que conducen al desarrollo de endometriosis, en fibroblastos de útero humano HUF y en la línea celular estromal de endometrio humano T-HESC. Para ello, evaluamos la acción del HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 µM) durante 24 h sobre: a) viabilidad celular (ensayo de MTT), b) actividad y expresión de MMP2 y MMP9 (zimografía en gel, e inmunoblot), c) activación de c-Src (inmunoblot), y d) expresión de COX-2 (inmunoblot). Observamos que el pesticida no afecta la viabilidad celular a ninguna de las dosis examinadas. En las células HUF, el HCB (0.5 µM) induce un aumento en la expresión (109%; p<0.001) y actividad (48%; p<0.05) de MMP9, así como en la actividad de MMP2 (53%; p<0.05). Además, hallamos que el HCB (0.5 µM) aumenta la expresión proteica de COX-2 a 3 h (90%;p<0.01) y la activación de la quinasa c-Src a 1 h (945%;p<0.05). Similares resultados fueron obtenidos en las células T-HESC. Nuestros resultados sugieren que el pesticida HCB podría contribuir al desarrollo de endometriosis, alterando parámetros involucrados en inflamación e invasión de células estromales endometriales.

244. (526) ANÁLISIS EN LA COMPOSICIÓN EN ProteínasAS DEL VENENO DE YARARÁ GRANDE MEDIANTE EMPLEO DE INHIBIDORES Y ANTICUERPOS TOXINO-ESPECÍFICOS

Van De Velde A.¹; Acosta O.²; Gay C.¹; Leiva L.¹
LabInPro Laboratorio de Investigación en Proteínas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional de Nordeste¹; Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Nordeste².

Bothrops alternatus (yarárá grande) es una especie ampliamente distribuida en la región Noreste del país, siendo la causante

más frecuente de accidentes ofídicos. La intoxicación botrópica provoca proteólisis de tejidos, hemorragia y trastornos de la homeostasia, y es debida principalmente a dos tipos de Proteínasas: serino (SP) y metaloProteínasas (MP), ambas detectadas en este veneno. Las MP de Venenos de Serpientes (MPVS) representan el 50% de su composición, constituyendo blancos relevantes para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Estudios previos llevados a cabo con anticuerpos específicos contra una MPVS hemorrágica perteneciente a la clase PIIIb (baltergina), mostraron que las IgGs anti-baltergina son capaces de neutralizar totalmente la actividad hemorrágica y parcialmente la actividad coagulante que exhibe esta secreción ofídica. En este trabajo se estudió la habilidad de estas IgGs en neutralizar la actividad proteolítica. Se incubó el veneno con diferentes concentraciones de IgGs (relación mg veneno/mg IgG: 1/50, 1/25 y 1/14) y se midió la actividad caseinolítica residual sobre azocaseína (5 mg/mL), empleando como control 100% veneno/PBS. Se detectó una actividad residual de $32 \pm 2\%$, $31 \pm 3\%$ y $42 \pm 3\%$ respectivamente frente al control. Paralelamente se realizó el mismo ensayo preincubando veneno con inhibidor de MP (EDTA-Na2, 5mM) y de SP (PMSF, 5 mM). El EDTA-Na2 mostró una actividad residual menor al 1% respecto al control, mientras que PMSF redujo ligeramente la actividad proteolítica del veneno (89%). Los estudios con inhibidores demuestran que las MPVS son las principales responsables de la proteólisis inducida por el veneno, usando azocaseína como sustrato, mientras que los ensayos con anticuerpos toxino-específicos, con una neutralización parcial del 70%, evidencian la presencia de MP pertenecientes a una clase distinta de las PIII, posiblemente del tipo PI, que exhiben actividad proteolítica y baja o nula actividad hemorrágica.

245. (560) EFECTOS DEL VANADIO SOBRE EL APARATO REPRODUCTOR DE RATAS MACHO ADULTAS EXPUESTAS PERINATALMENTE AL METAVANADATO DE SODIO (NAVO3)

Madariaga M.1; Zubillaga E.1; Farré C.1; Cholich V.2
Area Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario1; Area Toxicología, LATOEX, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario2.

El vanadio (V) es el metal traza más abundante en el petróleo, acumulándose en tierra, agua y plantas, siendo la contaminación ambiental la principal fuente de exposición para los humanos. Sabiendo que el V atraviesa la barrera hemato-testicular, que se acumula en el testículo, y que existen escasos antecedentes sobre su toxicidad reproductiva en ratas macho, el objetivo de este trabajo fue realizar estudios histológicos y morfométricos, de los receptores de andrógeno (RA) en testículo y el recuento de espermatozoides (EZ) del conducto deferente en ratas expuestas perinatalmente al NaVO_3 . Ratas vírgenes Wistar de 90 días fueron puestas a preñar. Se dividieron en tres grupos: control (C), control NaCl (N, solución de 5 mg/ml) y tratado (T, solución de 0,2 mg/ml de $\text{NaVO}_3 + 5$ mg/ml NaCl). Los grupos N y T se expusieron a través de la bebida desde el día gestacional 16 (DG16, a) o a partir del posnatal 1 (DPN1, b) hasta el DPN23. Las crías fueron destetadas, separadas por sexo y los machos fueron sacrificados el DPN90, extrayéndose los testículos/epidídimos y registrando sus pesos. Los izquierdos fueron fijados, incluidos en parafina, cortados y teñidos con HE para los estudios histológico y morfométrico. Los derechos se utilizaron para estudiar niveles de expresión del RA por western blot. De los conductos deferentes derechos se recolectaron y contaron los EZ. No se obtuvieron diferencias significativas en los pesos absolutos y relativos de los testículos/epidídimos de los grupos T con respecto a los grupos C y N. No se observaron alteraciones histopatológicas en los grupos T. Se encontraron disminuciones significativas en el diámetro tubular (15%), la altura del epitelio (37 y 40%), el recuento de EZ (30 y 53%), y el nivel de expresión de RA (49,5 y 50%) en los grupos Ta y Tb, con respecto a los grupos C y N. Estos resultados permiten concluir que la exposición perinatal al NaVO_3 provocaría efectos adversos directos e indirectos sobre la espermatogénesis en ratas adultas.

246. (639) LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A (BPA) O DIETILESTILBESTROL (DES) ALTERA LA EXPRESIÓN DE GDF-9 EN OVEJAS

Santamaría C.1; Abud J.1; Rivera O.2; Belmonte N.2; Munoz De Toro M.1; Luque E.1; Rodríguez H.1
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral1; Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Lomas de Zamora, Buenos Aires2.

Previamente demostramos que la exposición postnatal a BPA o DES afecta la funcionalidad ovárica, disminuyendo el reservorio de folículos primordiales. En el presente trabajo nos propusimos profundizar en las disfunciones ováricas causadas por DES o BPA, estudiando la respuesta del ovario a FSH ovina (oFSH) en ovejas previamente expuestas a BPA o DES. Corderas recién nacidas recibieron inyecciones i.m. diarias desde el DPN1 (día post natal 1) hasta el DPN14 de: a) Aceite de maíz (Control), b) DES 5 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$, c) BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$ (BPA50) y d) BPA 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$ (BPA0.5). En DPN30, las corderas fueron sometidas a un tratamiento de supermaduración con 6 dosis iguales de oFSH durante 3 días consecutivos (8.8mg oFSH/cordera). Luego de la última inyección de oFSH se determinó el número de folículos > 2 mm, y luego se evaluó la expresión en el ovario de la proteína de receptor de andrógenos (RA) y del ARNm de *bone morphogenetic protein-6* BMP-6, BMP-15, *growth differentiation factor-9* (GDF-9), y los receptores BMP-R-1B y FSH-R (*follicle stimulating hormone receptor*) por transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (q-RT-PCR). Los niveles séricos de estradiol (E_2) fueron medidos por RIA. BPA redujo el número de folículos en respuesta a oFSH. Tanto DES como BPA se asociaron con menores niveles de E_2 circulante, menor expresión de RA y un aumento en la expresión de GDF-9 (Control: $0,0007 \pm 8,165e-005$; BPA50: $0,001325 \pm 0,0001974$). GDF-9 estimula el crecimiento de los folículos preantrales por estimulación de la biosíntesis de andrógenos foliculares y suprime la síntesis de E_2 mediante inhibición de la diferenciación de las células de la granulosa en respuesta a FSH. Con estos antecedentes, nuestros resultados sugieren que en la oveja: a) la exposición postnatal a BPA o DES altera la esteroidogénesis ovárica inducida por oFSH mediante un aumento en la expresión de GDF-9; b) la reducción de RA inhibe el estímulo de GDF9 sobre el desarrollo folicular en las ovejas expuestas a BPA.

247. (726) EL CLORPIRIFOS AFECTA EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATA E INDUCE EL DESBALANCE REDOX EN ESTE TEJIDO

Ventura C.1; Martinel Lamas D.1; Bourguignon N.2; Lux-Lantos V.2; Rivera E.1; Cocco C.1; Núñez M.1
Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires1; Laboratorio de Neuroendocrinología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET2.

El clorpirifos (CPF) es un insecticida utilizado en agricultura y hogares. Demostramos que el CPF a concentraciones similares a las del ambiente presenta un efecto estrogénico en células derivadas de un carcinoma mamario humano y concentraciones mayores indujeron las especies reactivas del oxígeno. Objetivo: evaluar el efecto de diferentes dosis de CPF sobre el desarrollo de la glándula mamaria de rata y el balance redox en este tejido. Métodos: los animales se dividieron en tres grupos y fueron expuestos tres veces por semana a CPF 0,01 mg/Kg/día (CPF 0,01) y 1 mg/Kg/día (CPF 1) o vehículo (C) vía oral durante 100 días. El número de ductos y lobulillos se cuantificó por observación microscópica. Los niveles de estradiol (E_2) y progesterona (PG) séricos se determinaron por RIA. Las etapas del ciclo estral fueron determinadas por observación microscópica de exudado vaginal. La actividad catalasa (CAT), el contenido de glutatión reducido (GSH) y los TBARS se midieron sobre homogeneizados del tejido mamario. Resultados: CPF 0,01 y CPF 1 incrementaron el número de lobulillos de la glándula mamaria ($p < 0,05$ vs. C). CPF 0,01 aumentó la cantidad de ductos ($p < 0,01$). Estos cambios se

acompañaron por una disminución en los niveles de E_2 en el grupo CPF 1 ($p < 0,05$) y en la frecuencia relativa de entada en estro del ciclo estral (32,4% vs. C). La exposición a CPF no modificó los niveles de PG (p:NS). El CPF 1 incrementó la actividad CAT y el contenido de GSH en la glándula mamaria ($72,0 \pm 24,6\%$ y $66,3 \pm 15,7\%$ respectivamente; $p < 0,01$); el CPF 0,01 incrementó sólo la actividad CAT en este tejido ($p < 0,01$). No se observaron cambios en la peroxidación lipídica a las dosis utilizadas. Conclusión: El CPF podría presentar acción estrogénica local dado que induce cambios proliferativos en el tejido mamario. A su vez, el CPF modifica los valores de E_2 circulante e induce el desbalance redox en el tejido mamario, consecuencias de los efectos del tóxico a nivel sistémico.

248. (748) ACCIÓN DEL TÓXICO "TIPO DIOXINA" HEXACLO-ROBENCENO EN UN MODELO DE ENDOMETRIOSIS EXPERIMENTAL EN RATA

Sánchez M.¹; Chiappini F.¹; Bilotas M.²; Pontillo C.¹; Zotta E.³; Cocca C.⁴; Meresman G.²; Randi A.¹

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET²; Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴.

El Hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental "tipo dioxina" encontrado en leche materna y comercial. La endometriosis es una enfermedad caracterizada por presencia de endometrio fuera del útero. La severidad de lesiones endometrióticas está asociada con expresión de metaloproteasas (MMPs). La inhibición de Ciclooxigenasa 2 (COX-2) disminuye la invasión de lesiones ectópicas por supresión de MMP2 y 9. Además, el desarrollo de la enfermedad depende del reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos. Algunos contaminantes pueden afectar la patofisiología de endometriosis por modulación de la función endocrina e inmune. Estudiamos si el HCB promueve el desarrollo de endometriosis inducida experimentalmente en ratas mediante el autotransplante de trozos de cuerno uterino al mesotelio del intestino. A los 15 días post-cirugía las ratas se expusieron al HCB por intubación gástrica durante 30 días: 1) Vehículo, 2) HCB1 y HCB100 (mg/kg pc). Analizamos lesiones endometriales (L) y endometrio eutópico (EU), evaluando: a) Volumen de lesiones (calibre), b) Área vascularizada (AV)/Área total (AT) y N° de microvasos/AT von Willebrand positivos (vW+) (inmunohistoquímica) y c) expresión de MMP2, MMP9 y de COX-2 (inmunoblot). El HCB aumenta el Volumen de lesiones (HCB100 107%, $p < 0,05$); incrementa el AV/AT en L (HCB1 138%, $p < 0,05$; HCB100 209%, $p < 0,01$) y en EU (HCB100 203%, $p < 0,05$), así como el N° de microvasos/AT en L (HCB100 85%, $p < 0,05$) y en EU (HCB100 112%, $p < 0,05$). Al analizar los niveles proteicos por inmunoblot, observamos que HCB aumenta la expresión de MMP2 (HCB100 125%, $p < 0,05$) y MMP9 (HCB100 130%, $p < 0,05$) en L y la expresión de MMP2 (HCB100 60%, $p < 0,05$) y MMP9 (HCB1 60%, HCB100 130%, $p < 0,05$) en EU. A su vez, encontramos que el pesticida incrementa los niveles de COX-2 en EU (HCB100 120%, $p < 0,05$). Demostramos que la exposición al HCB promueve angiogénesis, aumenta el volumen de lesiones y la expresión de MMPs y COX-2, en un modelo de endometriosis inducida experimentalmente en rata.

249. (825) LA INTOXICACION CON CADMIO DEPRIME EL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN CEREBELO. EFECTO DE DIETAS RICAS EN SOJA

Plateo Pignatari M.; Alvarez S.; Quiroga Lohaiza C.; Aman-te A.; Gomez N.; Giménez M.

Departamento de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Luis, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas de San Luis (IMIBIO-SL)-CONICET.

El Cadmio (Cd) es un elemento tóxico y un contaminante ambiental. El objetivo fue estudiar el efecto de la intoxicación crónica con Cd sobre el sistema antioxidante del cerebelo bajo diferentes

dietas. Se utilizaron cuatro lotes de ratas hembras Wistar: dos lotes recibieron una dieta basada en caseína como fuente proteica y dos, soja. Dentro de cada grupo, un lote recibió agua corriente (Control) y el otro, 15 ppm de Cd en el agua de bebida, durante 60 días. Se extrajeron los cerebelos y se determinó el nivel de lipoperoxidación (TBAR'S). Se extrajo ARN total con Quickzol. 10µg de ARN fueron transcritos a ADNc. Se utilizó 0.8ng de ADNc para medir la expresión de los siguientes genes: nrf-2, NOX, p47phox, SOD, CAT, Gpx, TNF-alfa. S28 fue el control interno. TBAR'S aumentó en los grupos Cd ($p < 0,05$), dicho incremento fue mayor en el grupo que recibió soja, indicando estrés oxidativo; por lo que se estudiaron distintos genes involucrados en la defensa antioxidante. El factor nrf-2 disminuyó significativamente en los grupos Cd ($p < 0,05$); el grupo soja control también mostró una disminución significativa de su expresión, con respecto a Caseína control. La expresión de NOX disminuyó significativamente en Caseína-Cd ($p < 0,05$) sin mostrar diferencias significativas en los grupos que recibieron soja. Lo mismo ocurrió con la subunidad p47phox. Catalasa no mostró diferencias en su expresión, mientras que SOD y Gpx disminuyeron significativamente en ambos grupos Cd ($p < 0,05$ y $p < 0,005$ respectivamente). La excepción fue SOD: en Soja-Cd se observó un incremento significativo. Por último, la expresión de TNF-alfa aumentó significativamente en Caseína-Cd ($p = 0,001$) pero no se observaron diferencias significativas en Soja-Cd. Estos resultados demuestran que la exposición crónica a Cd tiende a deprimir el sistema antioxidante del cerebelo, favoreciendo un cuadro de estrés oxidativo, el cual se ve ligeramente mejorado en algunos casos por la presencia de una dieta rica en soja.

250. (508) DAÑO POR HUMO DE CIGARRILLO EN UNA LÍNEA CELULAR DE EPITELIO RESPIRATORIO HUMANO. EFECTO DE N-ACETILCISTEÍNA

Dugour A.¹; Elias F.¹; Marazita M.²; Suburo A.²; Figueroa J.¹ Fundación Pablo Cassara¹; Universidad Austral², Buenos Aires.

Introducción: la Calu-3 es una línea de células bronquiales humanas aceptada como modelo para estudios fisiológicos y farmacológicos. El humo del cigarrillo (HC) es la principal fuente exógena de enfermedad respiratoria. Se ha planteado que el stress oxidativo es una vía mayor en el daño bronquial por HC. La N-acetilcisteína (NAC) es un fármaco con actividad antioxidante. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un modelo de daño bronquial por HC y evaluar el posible efecto protector de la NAC en el mismo. **Material y Métodos:** se cultivaron células Calu-3 en monocapas en interfase aire-líquido. Un grupo permaneció como control y 2 grupos (8 pocillos independientes cada uno) fueron expuestos al HC; en uno de ellos previamente se añadió NAC (2.5 mM) al medio de cultivo. El HC se generó conectando sucesivamente 2 cigarrillos a una tubuladura conectada a una bomba peristáltica; el humo fue expulsado por el otro extremo a una cámara cerrada donde se mantuvieron los dos grupos experimentales durante 10 minutos. Luego se retiraron las células y permanecieron dos horas sin HC. A continuación se evaluaron la viabilidad celular (método colorimétrico-MTS) y la apoptosis (fluorescencia-naranja de acridina) y se compararon entre grupos. **Resultados:** en el grupo expuesto al HC la viabilidad celular disminuyó un 45% respecto al control ($p \leq 0,001$), lo que se asoció con la aparición de numerosas células apoptóticas. Estos cambios no se observaron en el grupo al que se agregó NAC antes de exponerlo al HC. **Conclusiones:** la incubación con NAC previno el daño por HC en las células Calu 3.

ENDOCRINOLOGÍA 2

251. (74) EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA: ESTUDIO A NIVEL HEPÁTICO

Lorenzo R; Ramírez M; Becu-Villalobos D; García-Tornadu I. Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET.

El uso crónico de agentes antipsicóticos puede llevar al desarrollo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Mas aún, la FDA aprobó el uso de bromocriptina, un agonista dopaminérgico del RD2, para el tratamiento coadyuvante de la diabetes tipo II. En trabajos previos demostramos que los animales *knockout* para el RD2 presentan alteraciones en la homeostasis de la glucosa, en particular en la secreción de insulina. Nos propusimos profundizar el estudio de las acciones de dopamina a través del RD2 y su impacto en la sensibilidad a la insulina, focalizando el estudio a nivel hepático. Ratonos C57 (salvajes con tratamiento crónico con haloperidol, o *Drd2*^{-/-}) fueron ayunados por una hora, y luego inyectados con insulina ip (10 u/g P), siendo eutanizados 60 minutos después recogiendo tejido hepático. Se midió la expresión del ARNm de glucocinasa, y del factor de transcripción *Srebpc-1* ya que la expresión de ambos es regulada positivamente por insulina encontramos que en ratones *Drd2*^{-/-} la expresión de estos genes se encontró aumentada respecto a los animales salvajes. En paralelo analizamos un modelo farmacológico de tratamiento crónico con haloperidol (antagonista del RD2). Luego de 5 semanas de tratamiento, los animales fueron inyectados ip con insulina (10 U/g P) Los niveles de ARNm de glucocinasa se encontraron elevados sin cambios en la expresión proteica medida por WB. Los niveles del mensajero del factor de transcripción *Srebpc-1* estaban elevados respecto al control. Por otra parte el contenido de glucógeno hepático estaba significativamente disminuido en los animales tratados con haloperidol. Tanto en el modelo transgénico como farmacológico los resultados indicarían que la dopamina a través del RD2 produciría alteraciones a nivel hepático que podrían afectar la sensibilidad a insulina.

252. (92) MODIFICACIONES EN LA ESTEROIDOGENESIS HIPOCÁMPICA PODRÍAN CONTRIBUIR A LA DISMINUCIÓN DE LA PLASTICIDAD NEURONAL EN LA ADULTEZ

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, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Departamento De Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral².

El envejecimiento es un proceso fisiológico que afecta distintos mecanismos celulares, moleculares y funcionales asociados a la plasticidad neuronal y tiene consecuencias importantes sobre los procesos de memoria y aprendizaje. Por otra parte, se ha demostrado que los esteroides sintetizados *de novo* en el hipocampo poseen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras y modulan distintos procesos cognitivos. En este contexto, ¿Podrían estos cambios observados en la adultez deberse a una disminución de la neuroesteroidogénesis hipocámpica? Si así fuera, ¿Podrían estas diferencias observadas entre animales jóvenes y adultos estar asociadas a mecanismos de metilación diferencial de ADN? Para comenzar a responder estas preguntas, utilizamos ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar de 3 meses de edad (jóvenes, PND90) y 15 meses de edad (adultos, PND450). Los hipocampos se disecaron y almacenaron a -80°C para posterior 1) extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real y 2) análisis de metilación mediante el empleo de enzimas de restricción sensibles a metilación y posterior PCR en tiempo real (MSRE-PCR). En los animales adultos, los niveles de ARNm correspondientes a las enzimas StAR, P450_{scc}, 3 α -HSD, 3 β -HSD, 5 α -reductasa, P450(β 11)2, P450(17 α), P450_{arom} y 17 β -HSD-3 disminuyeron significativamente ($p < 0.05$). Sumado a ello, los promotores de los genes P450_{scc}, 5 α -reductasa y 3 α -HSD, se encontraron mayormente metilados en el grupo PND 450 ($p < 0.05$) comparado con el grupo PND 90. En conclusión, el envejecimiento se encuentra acompañado por una disminución en la expresión de las enzimas neuroesteroidogénicas en el hipocampo y, particularmente, en las enzimas P450_{scc}, 5 α -reductasa y 3 α -HSD este proceso está asociado a mecanismos de metilación diferencial. Estos resultados sugieren que la búsqueda de tratamientos que revertan la hipermetilación de estos genes podría revertir, al menos en parte, la caída en los niveles de neuroesteroides en la adultez-mayor.

253. (104) ALTERACIONES DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-ADRENAL (HHA) EN UN MODELO ANIMAL DE INSULINORRESISTENCIA INDUCIDO POR DIETA RICA EN SACAROSA

Pérez M.¹; Mercou M.¹; Sánchez R.¹; Martínez Calejman C.¹; Caldarelli L.¹; Repetto E.¹; Arias P.²; Cymering C.¹

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET¹; Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario².

Numerosas evidencias señalan que el estado de IR se acompaña de disfunción del eje HHA. Previamente hemos demostrado, en un modelo murino de IR inducida por sacarosa, un incremento en la secreción basal de corticosterona y una disminución en la liberación de esta hormona tras la inyección de ACTH (Martínez Calejman *et al*, 2012). En el presente trabajo evaluamos el impacto de la DRS sobre parámetros adenohipofisarios relacionados con la función del eje HHA. Durante 3 a 12 semanas ratas Wistar macho adultas recibieron una dieta estándar con o sin el agregado de sacarosa al 30% en el agua de bebida (grupos DRS y control, respectivamente). Tras la decapitación (~10 A.M.) se disecaron y homogeneizaron las adenohipofisis (AH), dosándose ARNm por qRT-PCR y proteínas por western blot (WB), y se obtuvo plasma de la sangre troncal (medición de ACTH por ensayo inmunoensayo y de corticosterona por RIA). En la semana 3 detectamos, en los animales bajo DRS, un aumento de ACTH y de corticosterona en plasma ($p < 0.05$ vs. control, $n=5$ por grupo), y una mayor expresión del ARNm de POMC en AH ($p < 0.05$ vs. control, $n=5$ por grupo). Tras 12 semanas de DRS, en cambio, se observó una disminución en los parámetros antes mencionados ($p < 0.05$ vs. control, $n=5$ por grupo). La expresión (WB) de hemo oxigenasa (HO-1) en AH fue mayor el grupo DRS en la semana 12 ($p < 0.01$), sin mostrar diferencias en la semana 3. En forma opuesta, en la semana 3, mas no en la 12, se observó un incremento en la expresión proteica del marcador de macrófagos F4/80 ($p < 0.01$) en las AH de ratas bajo DRS. Según nuestros resultados durante la administración de DRS se produce inicialmente una hiperactivación del eje HHA, a la que podría contribuir la infiltración macrofágica de la AH. El tratamiento prolongado con sacarosa resulta en una hipofunción del eje HHA, observándose un aumento en sistemas antioxidantes como probable respuesta a la generación de estrés oxidativo tisular.

254. (126) EFECTO DEL INGAP-PP SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS β : ROL DE LA ANGIOGENESIS INSULAR

Lisi Roman C.; Maiztegui B.; Flores L.; Gagliardino J. Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata.

Introducción: La administración de INGAP-PP a ratas normales aumenta la masa y función de las células β , sin embargo se desconoce su mecanismo de acción. La presencia de células endoteliales, el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) y la integrina $\beta 1$ es necesaria para la diferenciación de las células β embrionarias y el mantenimiento de la masa y función β en el adulto. **Objetivo:** Estudiar el efecto de INGAP-PP sobre la neogénesis vascular insular y su relación con la función β . **Materiales y Métodos:** Ratas Wistar macho adultas se trataron durante 10 días (inyección i.p.) con solución fisiológica (C) o INGAP-PP (500 μ g/día; I). Al momento del sacrificio medimos los niveles de glucosa (G), insulina (Ins) y triglicéridos (TG) en plasma 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, los niveles de ARNm y proteína de VEGF-A, VEGF-A R2, integrina $\beta 1$, PECAM-1 (qPCR y western blot) y los niveles de ARNm de laminina $\beta 1$ y CK19 (qPCR). Análisis estadístico: test-t de Students. **Resultados:** (C vs. I; * $p < 0.05$): La administración de INGAP-PP no produjo cambios en los parámetros séricos ni en los índices HOMA. 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 de VEGF-A (100 ± 16 vs. $154 \pm 22^*$ %) y los niveles de ARNm de integrina $\beta 1$ ($100 \pm 2,41$ vs. $748 \pm 47^*$ %), VEGF-A ($100 \pm 0,11$ vs. $267 \pm 51^*$ %), laminina $\beta 1$ ($100 \pm 3,5$ vs. $201 \pm 47^*$ %), VEGF-A R2 ($100 \pm 4,69$ vs. $431 \pm 14^*$ %), PECAM-1 ($100 \pm 0,02$ vs. $755 \pm 19^*$ %) y CK19 ($100 \pm 0,25$ vs. $278 \pm 10^*$ %). **Conclusión:** Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual el INGAP-PP ejerce su efecto sobre la función de las células β , se asemeja al proceso observado durante el período embrionario donde la neogénesis vascular precede a la insular.

255. (160) EL EFECTO CITOPROTECTOR DE LA HUMANINA EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS NORMALES Y TUMORALES

Gottardo F.; Magri M.; Zárate S.; Eijo G.; Moreno Ayala M.; Ferriaris J.; Candolfi M.; Pisera D.; Jaita G.; Seilicovich A. *Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.*

La Humanina (HN) es un péptido aislado originalmente de un ADNc de neuronas de pacientes con enfermedad de Alzheimer con acción citoprotectora en varios tipos celulares. La Ratina (RN), péptido homólogo de HN en rata, también tiene una acción neuroprotectora. En este estudio, evaluamos la expresión y función de estos péptidos en adenohipófisis de rata. Determinamos la expresión de RN en la pituitaria de ratas machos (M) y hembras (H) por citometría de flujo. El porcentaje de células que expresan RN (H: $54,0 \pm 16,0\%$; M: $85,2 \pm 4,1\%$, $p < 0,01$, test t) y la intensidad de fluorescencia por célula (Gmean) (H: $20,1 \pm 2,4\%$; M: $48,9 \pm 8,4\%$, $p < 0,01$, test t) fueron mayores en M que en H. Para evaluar si los esteroides gonadales modulan la expresión de RN, determinamos su expresión en ratas SHAM y ovariectomizadas (OVX). El Gmean fue mayor en células de ratas OVX que de ratas SHAM (SHAM: $36,5 \pm 1,2\%$; OVX: $95,7 \pm 1,4\%$, $p < 0,05$, test t). Los estrógenos disminuyeron el Gmean de RN en cultivos de células de ratas OVX. (OL: $70,5 \pm 2,6\%$; E2: $55,8 \pm 5,35\%$, $p < 0,01$, test t). Determinamos el efecto de la HN sobre la apoptosis (por TUNEL) inducida por TNF- α en células adenohipofisarias de ratas OVX y de machos gonadectomizados. La HN disminuyó la apoptosis inducida por TNF- α tanto en hembras (C: 2,3%; TNF- α : 9,9%; HN: 3,7% HN-TNF- α : 2,38%, $p < 0,01$, X_2) como en machos (C: 2,9%; TNF- α : 6,3%; HN: 3,44%; HN-TNF- α : 3,17%, $p < 0,05$, X_2). La HN también tuvo efecto citoprotector sobre los lactotrofos de ratas hembras (C: 4,3%; TNF- α : 12,0%; HN: 3,8% HN-TNF- α : 4,8%, $p < 0,01$, X_2). En células de la línea tumoral GH3 de somatotrofos, la HN disminuyó la apoptosis inducida por TNF- α (C: 2,6%; TNF- α : 8,6%; HN: 3,4%; HN-TNF- α : 3,1%, $p < 0,01$, X_2). Estos resultados sugieren que los estrógenos están involucrados en la regulación de la expresión de los péptidos de la familia de HN en la pituitaria y que estos péptidos podrían tener un papel citoprotector ante estímulos proapoptóticos en células adenohipofisarias.

256. (234) DIFERENCIAS SEXUALES EN EL CONTROL DOPAMINÉRGICO DE LOS DISTINTOS COMPONENTES DEL SISTEMA TGF β 1 HIPOFISARIO

Recouvreux M.; Camilletti M.; Lapyckyj L.; Bottino M.; Díaz-Torga G. *Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET.*

El objetivo general de nuestro laboratorio es la búsqueda de tratamientos alternativos para los prolactinomas resistentes a terapias con agonistas dopaminérgicos. Ha sido descrito que la dopamina estimula TGF β 1 y la expresión de sus receptores en la hipófisis. Al ser TGF β 1 un inhibidor de las funciones del lactotrofo, y mediar en parte, las acciones inhibitorias de dopamina, proponemos al sistema TGF β 1 como potencial blanco terapéutico para prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos. Los ratones con delección del gen del receptor de dopamina D2 ($Drd2^{-/-}$) desarrollan prolactinomas, siendo este fenotipo más marcado en las hembras. En el presente trabajo estudiamos la regulación dopaminérgica de los diferentes componentes del sistema TGF β 1 en ratones wt, el impacto que produce la pérdida

de control dopaminérgico sobre este sistema (en ratones $Drd2^{-/-}$), y las diferencias sexuales de estos efectos. Observamos que la falta de control dopaminérgico disminuyó los niveles de TGF β 1 activo hipofisario en ambos sexos (hipófisis $Drd2^{-/-}$). Sin embargo, sólo en las hembras se evidenció una disminución en la actividad biológica de TGF- β 1, reflejada en la disminución de la expresión de genes blanco de la citoquina (TMEPA1 y PAI-1) y del receptor de TGF β tipo II. La ausencia de control dopaminérgico también disminuyó la expresión génica de la proteína de latencia LTBP1, y de los posibles activadores de TGF β 1: MMP2, integrina β 6, trombospondina-1 y calicreína-1. Así mismo, un tratamiento con el agonista dopaminérgico cabergolina (2 mg/kg) o con el antagonista, sulpiride (10mg/kg) por 24hs en ratones wt, demostró que existe un control dopaminérgico positivo de estos componentes únicamente en las hembras. Concluimos que la pérdida del tono dopaminérgico afecta el sistema TGF β 1 hipofisario en menor medida en los machos, y podría proteger el desarrollo de prolactinomas en este sexo.

257. (235) CONTROL ESTROGÉNICO DEL SISTEMA TGF-B1 HIPOFISARIO. ¿RESPONSABLE EL DIMORFISMO SEXUAL OBSERVADO EN EL DESARROLLO DE PROLACTINOMAS? ESTUDIOS EN RATONES KNOCK OUT PARA EL RECEPTOR DE DOPAMINA D2 (DRD2-/-)

Recouvreux M.; Camilletti M.; Lapyckyj L.; Bottino M.; Díaz-Torga G. *Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET.*

Dopamina y estradiol interactúan en la regulación de la función de los lactotrofos. Alteraciones en esta regulación pueden ocasionar el desarrollo de un prolactinoma en ambos sexos. Sin embargo existe una diferencia sexual en la incidencia de estos tumores. Es así como ratones carentes del gen del receptor de dopamina D2 ($Drd2^{-/-}$) desarrollan prolactinomas, pero el efecto es mucho más pronunciado en hembras. En humanos la incidencia de microprolactinomas es mayor en las mujeres durante la edad Fertil, pero a partir de los 45-50 años, cuando disminuyen los niveles de estrógenos, la incidencia es la misma en ambos sexos. TGF β 1 es un inhibidor de las funciones del lactotrofo, y mediador de las acciones inhibitorias de dopamina. A su vez, la expresión de TGF β 1 hipofisario es regulada por estradiol. Postulamos que la regulación estrogénica del sistema TGF β 1 podría explicar las diferencias sexuales en la incidencia de prolactinomas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar, en ratones wt y $Drd2^{-/-}$, las diferencias sexuales en la expresión de los diferentes componentes del sistema TGF β 1, y la regulación de los mismos por estrógenos. Encontramos que: 1- Los machos presentan una mayor expresión de todos los componentes del sistema: TGF- β 1 (activo y total, por ELISA), sus proteína de latencia LTBP1 y LTBP3 (por q-PCR), y varios de los posibles activadores de la citoquina: MMP2, MMP9 (por zimografía), MT1-MMP, integrinas β 6 y β 8, trombospondina 1, y calicreína 1 (por q-PCR). 2- El estradiol (tratamiento *in vivo*, valerato de estradiol, 0.1mg/kg, 24hs) disminuyó la expresión de la mayoría de los componentes del sistema mencionados. Concluimos que los menores niveles de estrógenos circulantes en machos favorecerían la presencia de un sistema TGF- β 1 hipofisario más potente en este sexo, y esto podría explicar, al menos en parte, la protección frente al desarrollo de prolactinomas en machos $Drd2^{-/-}$, aún frente a la pérdida del control dopaminérgico.

258. (314) CAMBIOS EN LA RESPUESTA DEL EJE REPRODUCTOR DURANTE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN RATAS MACHO ADULTAS EXPUESTAS A BISFENOL A EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO

Contrera Roln N.1; Direne J.1; Cardoso N.1; Carbone S.1; Ponzo O.1; Scacchi Bernasconi P.1,2; Scacchi P.2; Reynoso R.1,2 *Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Fisiología, Universidad de Buenos Aires1; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina2.*

La respuesta inflamatoria producida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) se acompaña de cambios en la función reproductiva.

Por otra parte, la exposición a ciertos disruptores endocrinos aumenta la toxicidad del agente agresor modificando la respuesta del eje reproductor durante la inflamación. Estudiamos el efecto del bisfenol A (BPA) sobre los mecanismos de regulación del eje reproductor y su repuesta durante la inflamación en ratas macho adultas expuestas a BPA desde el inicio de la gestación y la lactancia. Se administró BPA en el agua de bebida (DAE: 1.25mg/kg/día) a la rata madre y etanol al 0.1% (control). Grupos de crías: 1) control; 2) BPA; 3) LPS; 4) BPA+LPS. LPS (250 ug/kg, I.P) se administró 5 horas antes del sacrificio a los 60 días de vida. Se determinó liberación de Gn-RH, producción de nitritos por fragmentos de hipotálamo medio basal (RIA pg/HMB, método de Griess $\mu\text{moles/l}$), LH, FSH y testosterona (RIA ng/ml, nmol/ml). Gn-RH: 1)4.1 \pm 1.0, 2)3.5 \pm 1.0; 3)3.6 \pm 0.9; 4)2.3 \pm 0.5. Nitritos: 1)3.0 \pm 0.1; 2)4.3 \pm 0.4; 3)4.4 \pm 0.3; 4)1.6 \pm 0.1. LH: 1)73 \pm 12; 2)37 \pm 5; 3)34 \pm 2.0; 4)10 \pm 1.3. FSH: 1)462 \pm 47; 2)213 \pm 29; 3)566 \pm 61; 4)236 \pm 49. Testosterona: 1)0.9 \pm 0.7; 2)0.45 \pm 0.3; 3)3.5 \pm 1.6; 4)0.75 \pm 0.2. La liberación de Gn-RH no mostró cambios con los tratamientos, observándose una tendencia al descenso en todos los grupos. La producción de nitritos aumentó con el tratamiento con BPA y LPS ($p < 0.05$) y disminuyó con el tratamiento conjunto ($p < 0.001$ vs. control-LPS). LH disminuyó con el tratamiento con LPS y la exposición a BPA, siendo más marcada en el grupo BPA+LPS ($p < 0.01$, vs control, $p < 0.001$ vs LPS). FSH disminuyó con LPS ($p < 0.001$ vs control), se incrementó con BPA ($p < 0.01$ vs control) no se modificó con el tratamiento conjunto (LPS vs LPS+BPA). Testosterona mostró tendencia al descenso con LPS, se incrementó con BPA ($p < 0.001$) y no se modificó con el tratamiento conjunto. Los resultados sugieren que la exposición a BPA afecta la respuesta del eje durante el proceso inflamatorio.

- 259. (418) INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE OBESIDAD Y DIABETES TIPO 2. PARTICIPACIÓN DE LA FLORA INTESTINAL**
Mirarchi F.¹; Prochnik A.¹; González Murano M.¹; Bianchi M.²; Serra H.³; Genaro A.¹; Gerez E.²; Wald M.¹
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET³; Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Católica Argentina⁴.

La prevalencia poblacional de la obesidad y la diabetes tipo 2 (D2) ha aumentado últimamente debido a cambios en el estilo de vida, en especial en los hábitos alimentarios -menos fibras y más grasas- en el tipo de vida sedentaria y en el estrés frecuente en la vida diaria. Asimismo, se postula que la flora microbiana intestinal contribuye fisiológicamente a la regulación de la homeostasis de energía en el individuo. En este trabajo se estudió el efecto de una dieta de alta energía (DAE) y el estrés crónico moderado (CMS) en el desarrollo y evolución de obesidad y D2 y sus consecuencias sobre la flora intestinal. Ratones hembras C57 -resistentes a la aparición de trastornos conductuales e inmunológicos por exposición a CMS, pero sensibles al desarrollo de alteraciones metabólicas- fueron alimentados con una DAE (rica en grasas) durante 6 meses y expuestos a CMS por los últimos 4 meses. Los ratones alimentados con DAE tuvieron un mayor incremento en su peso corporal e ingesta calórica que los que consumieron una dieta convencional (DN), mientras que en el grupo DAE+CMS estos aumentos fueron menores (peso (g) DAE:40 \pm 2, DAE+CMS:34 \pm 2, DN:30 \pm 1, DN+CMS:29 \pm 1; Ingesta (kcal/día) DAE:12,4 \pm 0,3, DAE+CMS:11,0 \pm 0,5, DN:10,0 \pm 0,5, DN+CMS:9,2 \pm 0,5, n=12, $p < 0.05$). Sólo la DEA produjo alteraciones en la glucemia basal y la insulinemia. Al analizar la composición de la microbiota intestinal se observó que sólo los DAE presentaron cambios en la relación de los filos bacteroidetes/firmicutes (considerando DN:1, bac/fir: DAE:0,64 \pm 0,06, DAE+CMS: 1,14 \pm 0,10 n=6, $p < 0.05$) hecho que condice con alteraciones en el balance energético. De este modo, en esta cepa, este estrés crónico de bajo grado, compensaría los efectos deletéreos sobre el metabolismo glucídico inducido por DAE probablemente mediante un mecanismo de percepción diferente, que no resulta nocivo para

el animal y produce un incremento de la actividad locomotora, actuando de modo similar al ejercicio físico.

- 260. (465) LA ANANDAMIDA INHIBE LA RESPUESTA NEUROENDOCRINA AL ESTRÉS AGUDO DE INMOVILIZACIÓN EN LA RATA**
De Laurentis A.; Gabriel Correa F.; Rettori V.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

La respuesta neuroendócrina al estrés es un proceso finamente sincronizado que involucra neuropéptidos y hormonas, y en cuya regulación participaría el sistema endocannabinoide, por lo cual el objetivo de este trabajo fue estudiar el papel del sistema endocannabinoide en la respuesta neuroendócrina al estrés neurogénico agudo en ratas. Ratas macho adultas Sprague Dawley fueron inmovilizadas por 30 min. Una semana previa al experimento fueron implantadas estereotáxicamente con una cánula en el 3º ventrículo cerebral para administrar intracerebroventricular (icv) fármacos que modifican al sistema endocannabinoide. Las drogas se administran 15 min previos al estrés. Determinamos corticosterona en plasma por RIA. La inmovilización aumentó ($***p < 0.001$) los niveles plasmáticos de corticosterona. La anandamida (AEA, 50ng/5 μ l, icv) y el inhibidor de la enzima FAAH que degrada anandamida (URB597, 50 μ g/50 μ l, icv) bloquearon ($***p < 0.001$) el aumento de corticosterona inducido por estrés. El bloqueo de ambos subtipos de receptores cannabinoides hipotalámicos con sus antagonistas CB1 (AM251, 500ng/5 μ l, icv) y CB2 (AM630, 500ng/5 μ l, icv) aumentó aún más ($*p < 0.05$) los niveles plasmáticos de corticosterona elevados por el estrés. La administración intraperitoneal (ip) del antagonista de receptores cannabinoides CB1 (AM251, 2mg/kg, ip) aumentó ($*p < 0.05$) los niveles plasmáticos de corticosterona tanto en ratas no estresadas como en las sometidas a estrés agudo de inmovilización. Asimismo, la administración periférica de URB597 (0.3mg/kg, ip) y metanandamida (MetAEA, 2.5mg/kg, ip), un análogo sintético no hidrolizable de la anandamida, disminuyeron ($***p < 0.001$) los niveles plasmáticos de corticosterona aumentados por el estrés agudo. Previamente hemos demostrado la expresión y función de los receptores cannabinoides CB1 en la corteza adrenal. La incubación de glándulas adrenales tanto con anandamida (AEA, 10 $^{-9}$ M) como con URB597 (3 μ M) bloqueó ($^*p < 0.01$) el efecto estimulatorio ($***p < 0.001$) de ACTH (10 $^{-9}$ M) sobre la secreción de corticosterona in vitro. En conclusión, el sistema endocannabinoide hipotalámico y adrenal bloquean el incremento de corticosterona plasmática inducida por estrés agudo de inmovilización. El efecto "anti-estrés" de la anandamida se produce actuando vía ambos subtipos de receptores. Dilucidar la compleja interrelación entre los mediadores neuroendócrinos y el sistema endocannabinoide permitirá, en un futuro, el desarrollo de terapias en las cuales este sistema será una herramienta útil para revertir los efectos deletéreos del estrés así como para permitir la recuperación de la homeostasis luego del mismo. (Subsidio CONICET PIP 02546).

- 261. (497) LA REGULACIÓN NEGATIVA DE LOS GENES TR3 (NGFIB) Y HSD3B2 EN LAS CÉLULAS SECRETORAS DE ANDRÓGENOS DE LA CORTEZA ADRENAL HUMANA NO ESTÁ MEDIADA POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE METILACIÓN DEL DNA**
Madjinca S.¹; Pérez Garrido N.¹; Rivarola M.^{1,2}; Belgorosky A.^{1,2}; Baquedano M.^{1,2}
Hospital de Pediatría "Prof. Juan P. Garrahan"¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)².

El receptor nuclear huérfano TR3 jugaría un rol crucial en la zonación adrenal adulta regulando la transcripción de HSD3B2. La expresión de TR3 y HSD3B2 es mínima en tejido adrenal humano (TAH) productor de andrógenos, tal como tumores adrenales virilizantes (TAV) y células de la zona reticularis (ZR) y fetal (ZFe). Sin embargo, los mecanismos implicados en la zonación adrenal no se conocen. Los cambios epigenéticos son importantes en el desarrollo y diferenciación celular, mientras que patrones epigenéticos

aberrantes causan cáncer y enfermedades crónicas del adulto. El objetivo fue estudiar los cambios durante el desarrollo posnatal en la metilación de la región promotora de los genes TR3 y HSD3B2 en TAH normal y TAV. Según se estableció previamente (Baquedano et al JCEM 92:2215-22, 2007), los tejidos de TAV (n=4, 0.75 a 4.5 años) y los TAH se dividieron en 3 grupos (Gr) etarios: Gr1, 3 a 26 días, n=3, involución de la ZFe; Gr2, 1.83 a 4 años, n=3, pre-adrenarca y Gr3, 14 a 20 años, n=3, adrenarca. Se aisló el DNA de cada tejido y de células de las zonas fasciculada (ZF) y ZR del Gr3 obtenidas por microdissección por láser de captura. Se evaluó in silico la presencia de islas CpG en los genes HSD3B2 y TR3. A diferencia del promotor de HSD3B2, se identificó una isla CpG en la región promotora de TR3. Se evaluó el grado de metilación del promotor de TR3 por clonado y secuenciación del DNA tratado con Bisulfito. El promotor de TR3 se encontró hipometilado en TAH normal de los 3 Grs y en TAV. Además, no se observaron diferencias en el grado de metilación del promotor entre la ZF y la ZR. Nuestros resultados sugieren que mecanismos epigenéticos de metilación del DNA no estarían implicados en la regulación de la expresión zonal específica o fisiopatológica de TR3 en la corteza adrenal humana. La ausencia de islas CpG en la región promotora del gen HSD3B2 sugiere que la inhibición de la expresión en la ZR no estaría directamente mediada por metilación.

262. (596) EFECTOS DEL RE β SOBRE REGULADORES DEL CICLO EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS NORMALES Y TUMORALES

Pérez P.; Petiti J.; Sabatino M.; Luca de Paul A.; Torres A.; Gutiérrez S.

Centro de Microscopia Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, INICSA-CONICET.

En estudios previos mostramos disminución en la expresión del receptor estrogénico β (RE β) durante el desarrollo de una lesión hiperplásica/adenomatosa hipofisaria. En continuación, para investigar la implicancia del RE β en el control proliferativo adenohipofisario, analizamos la expresión de reguladores del ciclo celular en células normales y tumorales. Se utilizaron cultivos primarios adenohipofisarios de rata Wistar estimulados con 17 β -estradiol (E $_2$) o con el agonista del RE β (DPN) por 72h y glándulas hiperplásicas/adenomatosas generadas con benzoato de estradiol por 20, 40 y 60d. Se inmunomarcaron los RE α y β por microscopía confocal (MC) y electrónica (ME) y se cuantificó su expresión por citometría de flujo. Se determinó la expresión de ciclina D1, CDK4, p21 y del supresor tumoral PTEN por western blot y se localizaron mediante ME y MC. Se determinó la progresión del ciclo celular con iodo de propidio. Análisis estadístico ANOVA-Tuckey. En el modelo hiperplásico adenomatoso se observó una disminución gradual en la expresión de RE β y PTEN, mientras que los niveles de ciclina D1, CDK4 y p21 citoplasmático incrementaron en correlación con el aumento del número de células en fase S/G2M, sugiriendo que el RE β podría estar involucrado en la regulación del ciclo celular. En el cultivo primario, E $_2$ aumentó la expresión de las proteínas mencionadas anteriormente, mientras que DPN inhibió PTEN y p21, sin modificar ciclina D1 y CDK4. Además, mediante MC se observó localización principalmente citoplasmática de p21 en células tumorales y normales controles y tratadas con E $_2$, siendo sólo el estímulo con DPN capaz de incrementar su expresión nuclear. Estos resultados sugieren que el RE β ejercería un posible rol inhibitor del ciclo celular mediado por p21. La activación del RE β por su agonista específico induce una expresión proteica diferencial de los reguladores del ciclo celular analizados, comparada con la mediada por ambos subtipos de RE (α/β) estimulados por E $_2$.

263. (598) DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA TECNOLÓGICA DE INMUNO-PCR (IPCR) APTA PARA LA DETERMINACIÓN DE HORMONAS DE INTERÉS CLÍNICO

Abud J.; Santamaría C.; Ramos G.; Muñoz-De-Toro M.; Luque E.; Rodríguez H.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Mediante la utilización de sondas de ADN reportera, la IPCR combina la versatilidad del ELISA con la PCR como sistema de amplificación de la señal. En consecuencia, el límite de detección (LD) de la IPCR es entre 100-10.000 veces mayor que el de un ELISA homólogo por el uso de la PCR como un sistema de amplificación de señal. El objetivo general consiste en el desarrollo de sistemas diagnósticos de interés clínico basados en ensayos de IPCR. Para optimizar esta plataforma tecnológica, en una primer etapa diseñamos un ensayo de IPCR para la proteína glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*. Para ello, se obtuvieron 21 líneas de hibridomas productores de anticuerpos anti-GST, tres de las cuales fueron seleccionadas para el proceso de clonado. Se amplificaron diferentes clones en cultivos *in vitro* a escala de laboratorio y se obtuvieron anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-GST purificados por cromatografía de afinidad a proteína G. Para la obtención de sondas de ADN biotiniladas se llevaron a cabo reacciones de PCR de punto final con el plásmido pBluescript como molde, utilizando oligonucleótidos biotinilados en el extremo 5'. Se determinó un LD para los ensayos de IPCR directa y *sandwich*, de 1x10⁻³ μ g/ml y 1x10⁻⁴ μ g/ml respectivamente, representando una mejora en el LD de 1000 veces entre el ELISA directo y la IPCR *sandwich*. En una segunda etapa, nuestro objetivo particular es la detección cuantitativa de la hormona h-TSH en suero humano basado en ELISA e IPCR. Para ello, se seleccionaron 10 líneas productoras de mAbs anti-hTSH, realizándose la selección clonal de 4 de estas líneas por dilución límite. Se purificaron 8 mAbs específicos para las distintas subunidades de h-TSH, los que luego se evaluaron en ensayos de ELISA de captura o *sandwich* logrando la detección de la hormona en concentraciones séricas (0,5 – 50 μ UI/ml). Actualmente, estamos abocados a la optimización de las condiciones experimentales de una IPCR apta para la detección de hTSH.

264. (601) VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CÉLULAS INICIADORAS DE TUMORES CON FENOTIPO DE CANCER STEM CELL VINCULADAS AL DESARROLLO DE ADENOMAS HIPOFISARIOS

Guido C.¹; Vaca A.¹; Sosa L.¹; Velázquez F.²; Caputto B.²; Torres A.¹

Centro de Microscopia Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba¹; Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba².

La población de cancer stem cells (CSC) representa una fracción de células tumorales con capacidad de auto-renovación y proliferación lenta e ilimitada, postulada como iniciadora de tumores malignos. Un desafío en endocrinología es conocer factores implicados en la neogénesis de adenomas hipofisarios en los que participarían células iniciadoras de tumores (CIT) con fenotipo de CSC. El objetivo fue evaluar posibles cambios de marcadores asociados a CSC, Nestin y CD44, durante el desarrollo de tumores hipofisarios. Se utilizaron hipófisis de ratas hembras Fischer control en diestro (D) y estrogenizadas con 30 mg de benzoato de estradiol (BE) durante 5 (BE5), 10 (BE10), 20 (BE20) y 30 (BE30) días. La expresión de Nestin y CD44 en adenohipófisis fue analizada por inmunofluorescencia (IF) en cortes de criostato. Ambos marcadores aumentaron con el tratamiento estrogénico. En zona marginal se observaron núcleos Nestin + en ratas D y BE5. A partir de BE10, su expresión se visualiza en núcleo y citoplasma de células adenohipofisarias, detectándose el máximo porcentaje de núcleos Nestin + en BE5 y citoplasma con intensa inmunomarcación en BE30. Estos hallazgos indicarían la participación de Nestin como factor de transcripción en etapas tempranas del desarrollo tumoral. La expresión de CD44 fue además evaluada por Western Blot, observándose un marcado incremento en hipófisis de ratas BE10, lo cual permite involucrar este marcador en la neogénesis del adenoma. A partir de suspensiones celulares de hipófisis adenomatosas, BE30, se aislaron las CIT con fenotipo de CSC mediante la formación de pituesferas, en cultivo libre de suero suplementado con EGF, FGFb y B27. Estas pituesferas fueron caracterizadas con marcadores de CS: Sox9, GFRa2 y

CSC: Nestin y CD44, identificados por IF en secciones de crioul-tamicrotomo, siendo positivas para los marcadores mencionados. Los resultados obtenidos nos permiten postular la participación de CIT en el desarrollo de adenomas hipofisarios.

265. (614) INSULINA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LEPTINA EN CÉLULAS TROFOBÁSTICAS HUMANAS

Pérez Pérez A.¹; Toro A.²; Maym J.²; Guadix P.¹; Dueas J.¹; Varone C.²; Sánchez-Margalet V.¹

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, España¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET².

La leptina es secretada principalmente por los adipocitos y controla el balance energético del organismo. En placenta también se produce leptina y se encontró que dicha hormona posee un efecto trófico sobre las células placentarias. La expresión de leptina está regulada por muchos factores tejido-específicos, como la insulina, en el caso de los adipocitos. Poco se sabe sobre la regulación de la expresión de leptina en placenta, es por esta razón que nos proponemos estudiar el efecto de la insulina sobre la expresión de leptina en células placentarias. Como modelo utilizamos células JEG-3 y explantos de placentas humanas a término. Células trofoblásticas en cultivo y explantos placentarios fueron tratados con distintas concentraciones de insulina (0,1-100 nM). Se realizaron ensayos de Western blot y qRT-PCR para determinar los niveles de expresión de leptina. La actividad del promotor de leptina fue estudiada mediante ensayos de transfección transiente con vectores conteniendo distintas regiones del promotor de leptina río arriba del gen de luciferasa. Encontramos que la insulina estimula la producción de leptina de manera dosis dependiente en explantos placentarios. Dicho efecto estimulador se suprime al bloquear las vías de PI3K y MAPK. El tratamiento con insulina aumenta en un 40% la actividad del promotor de leptina en células trofoblásticas JEG-3. Encontramos que la región del promotor comprendida entre -1951 y -1546 bp es suficiente para dicho efecto. Concluimos que la insulina regula positivamente la expresión de leptina tanto en células como en explantos placentarios. Dicho efecto estaría mediado por las vías de señalización de PI3K y MAPK.

266. (813) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL SALIVAL EN UNA MUESTRA DE SUJETOS DE SANTIAGO DE CHILE A TRAVÉS DEL EQUIPO AUTOMATIZADO COBAS E411 DE ROCHE

Garrido M.¹; Cid M.²; Romero C.¹; Araya V.²

Laboratorio de Endocrinología, Hospital Clínico Universidad de Chile¹; Sección Endocrinología y Diabetes, Hospital Clínico, Universidad de Chile².

La medición de cortisol sérico a las 23:00 h. se recomienda para el diagnóstico del Síndrome de Cushing (SC) patología donde se pierde el ritmo circadiano del cortisol, presentando valores elevados. Debido a los problemas en la toma de muestra nocturna, se dejó de utilizar, reemplazándola por la muestra de saliva. La ventaja de esta determinación es que mide cortisol libre y tiene una buena correlación con el cortisol libre urinario de 24 horas. Sin embargo, existen variaciones técnica-dependientes para el punto de corte. El objetivo de este estudio observacional es establecer los rangos referenciales de cortisol libre salival nocturno (CLSN) en una muestra inicial de 30 sujetos de Santiago de Chile, en el equipo automatizado de electro-quimioluminiscencia (EQL) Cobas e411 y compararlos con los valores de un estudio previo publicado por nuestro grupo, con el kit de EIA DSL (diagnostic system laboratory, actualmente descontinuado en el mercado) y con los resultados publicados para la técnica de espectrometría de masa, considerada "gold standard" para esta determinación. Se reclutaron bajo criterios de inclusión individuos de ambos sexos, de 18-75 años, aparentemente sanos, sin SC en el Hospital Clínico Universidad de Chile, quienes recolectaron 2 muestras de saliva en días consecutivos a las 23:00 h. (para disminuir la variabilidad

intra-individuo) firmando consentimiento informado aprobado por Comité de Ética institucional. Los resultados de CLSN por la técnica de EQL fueron de $0,137 \pm 0,046$ ug/dL ($X \pm DS$) con rango de 0,081- 0,292 ug/dL. Resultados similares a los obtenidos con el kit DSL: 0,21 ug/dL y a los publicados por espectrometría de masa: 0,10 ug/dL. La diferencia entre las muestras de un mismo sujeto tomadas en días consecutivos, no superó los 0,05 ug/dL. Se concluye que las mediciones de CLSN por EQL (Cobas e411) son equivalentes a los obtenidos previamente con el kit DSL y el gold standard. Por lo tanto, será una buena herramienta en el estudio de pacientes con sospecha de SC.

267. (828) EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO EN LA INVOLUCIÓN MAMARIA DE LA RATA

Campo Verde Arbocco F.; Hapon M.; Jahn G.

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza.

La involución mamaria consta de dos fases definidas por expresión génica diferencial y en la que participan mediadores locales (éstasis de leche) o sistémicos (variaciones hormonales) respectivamente. En este evento convergen vías de señalización que regulan la expresión génica para finalizar la lactancia. La vía de señalización de prolactina y su cross-talk con los receptores de hormonas ováricas son claves en este proceso. Nuestro grupo demostró que, en la rata, fallas endocrinas sistémicas como el hipotiroidismo (hipoT) generan éstasis de leche que podría indicar adelanto de la primera fase de involución. Por esto analizamos el efecto del hipoT sobre la expresión génica diferencial de los principales efectores de la función mamaria al final de la lactancia (L21) en ratas Wistar hembras tratadas con 0,1 g/l PTU (hipoT) en el agua de bebida (n=8). A partir de las glándulas mamarias inguinales se obtuvo ARN y se midió por PCR en tiempo real el contenido de ARNm relativo al gen ribosomal *s16*, de: receptor PRL (*rprl*), *stat5a*, *stat5b*, *socs-1* y *3* y *cis* y sus genes blanco *caseinaβ* (*csn2*) y *lactoalbúminaα* (*alba*), *receptores de estrógeno α* y *β* (*re α* y *β*), de *progesterona* (*rp a+b* y *b*), de *hormonas tiroideas alfa* y *beta* (*rt α* y *β*), *ncor1*, *rxr alfa* y de *ciclina D1* (*cd1*). El hipoT disminuyó el nivel de ARNm de: *rprl*, *alba*, *csn2* y *er alfa* ($p < 0,05$); y aumento el de: *socs-1* y *3* y *er beta* ($p < 0,05$) sin afectar los demás genes analizados. En conclusión, el hipoT induce involución mamaria atenuando la vía de señalización de prolactina, disminuyendo la síntesis de las principales proteínas de la leche e invirtiendo la expresión del *er alfa* y del *er beta* (reguladores de la actividad de *stat5*). Por otro lado, El hipoT no afecta la expresión normal de los genes característicos de la primera fase de involución indicando que el efecto es directamente sobre la actividad de la vía de señalización de prolactina y no sobre la muerte celular programada inducida por éstasis de leche.

268. (845) VÍAS DE WNT/BETA-CATENINA Y RECEPTORES NOTCH EN UN MODELO DE CORTICOTROPINOMA. RESPUESTA A AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS

Perrone S.¹; Demarchi G.¹; Gazza E.¹; Baccarini L.¹; Torres M.¹; Alaniz L.²; Cristina C.¹

Centro de Bioinvestigaciones (CeBio), Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires¹; Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral².

Los tumores hipofisarios exhiben un amplio rango de comportamiento clínico. Dentro de los adenomas hipofisarios secretores, los corticotropinomas o adenomas productores de ACTH son causantes de la sintomatología del Síndrome de Cushing. Para ellos no existe un tratamiento farmacológico de alta efectividad y en muchos casos se tratan con el agonista dopaminérgico cabergolina (CG) con respuesta favorable. Bajo la hipótesis de la existencia de un nicho de células madre causante del desarrollo tumoral nos propusimos estudiar las vías de señalización de los receptores Notch y Wnt de células madre en la línea celular tumoral de corticotropos murinos AtT20 evaluando su activación en presencia de CG y en condiciones basales. Determinamos expresión del receptor NOTCH3 por WB en las fracciones citoplasmáticas y de

membrana obtenidas a partir de lisados celulares de corticotropos y a nivel del ARNm por RT-qPCR en condiciones basales de cultivo. En cuanto a la vía canónica de Wnt, los niveles del ARNm de *Beta-catenina*, proteína principal de esta vía, se redujeron (0,61±0,01 control y 0,33±0,05 CG); mientras que los de *Ciclina D1*, gen blanco, no evidenciaron diferencias significativas con el tratamiento. *Frizzled 8*, receptor de ligandos Wnt, mostró un aumento al tratar con CG. Tales cambios correlacionaron con una inhibición de la proliferación celular determinada por captación de ³H bajo el tratamiento: 3190 cpm +579 y 2350 cpm +137, control vs CG. Nuestros resultados apoyan la participación de las vías de Wnt y de los receptores Notch en los corticotropinomas. El balance en la activación de ambas vías podría determinar el grado de proliferación, diferenciación y angiogénesis de estos tumores. Asimismo, la efectividad del tratamiento con CG, dependiente de los receptores D2 en las células tumorales y/o endoteliales, podría asociarse al grado de activación de las mencionadas vías. Por lo cual nos planteamos estudiar el tratamiento combinado con CG y moduladores de las vías.

REPRODUCCIÓN 2

269. (22) ROL DE TGF-BETA1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA Y BETA EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS TESTICULARES

Gonzalez C.¹; Insera P.¹; Levalle O.²; Terradas C.²; Puigdomenech E.³; Ponzo R.⁴; Vitullo A.¹; Calandra R.⁵; Gonzalez-Calvar S.^{4,5}

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico, Universidad Maimónides¹; Hospital Durand²; Instituto PREFER³; Facultad Medicina, Universidad de Buenos Aires⁴; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)- CONICET⁵-

En ciertas patologías testiculares como el Síndrome de Sólo Células de Sertoli (SCO) o la Hipoespermatogénesis idiopática (H) se presenta, en algunos casos, una hiperplasia de las células de Leydig (HCL). Recientemente, hemos observado en pacientes con SCO e H que muestran HCL, un aumento en la expresión de aromatasa y correlación con niveles elevados del Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF-β1) que indicarían la participación de estos factores en un mecanismo de proliferación de las células de Leydig (González y col., *Medicina 72 (Supl II): 24, 2012*). El objetivo del presente trabajo fue analizar en biopsias testiculares de pacientes con SCO (n = 6), H (n = 6) y SCO o H que presentan HCL (n = 6) la expresión de los receptores de estrógenos alfa y beta (RE_α/RE_β) mediante inmunofluorescencia. También se analizó, *in vitro*, el efecto de TGF-β1 sobre la expresión de RE_α y RE_β mediante Real Time PCR en la línea de células de Leydig TM3. En todas las biopsias estudiadas se detectó la presencia de RE_α y RE_β en células de Leydig, siendo la expresión de ambos receptores mayor en biopsias con SCO o H que presentaban HCL (p<0,05). Por otro lado, TGF-β1 (1 ng / ml) aumentó significativamente la expresión de RE_α y RE_β a los 10 min de incubación en la línea de células de Leydig TM3 (p<0,05). El análisis del gen de endoglina, co-receptor de TGF-β1 que actúa estimulando la vía proliferativa de esta citoquina, reveló la presencia de sitios de respuesta a estrógenos (ERE) en su secuencia promotora. En conclusión, estos resultados permiten especular que TGF-β1 aumentaría la expresión de los RE así como los niveles de estrógenos mediante el aumento de la expresión de aromatasa. La presencia de sitios ERE en el gen de endoglina sugeriría que los estrógenos participan en el mecanismo de acción de TGF-β1 que conduce a la proliferación de células de Leydig en patologías testiculares.

270. (37) LOCALIZACIÓN CELULAR Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ANEXINA A2 Y S100A10 EN CÉLULAS EPITELIALES DE OVIDUCTO

Teijeiro J.¹; Roldán M.²; Marini P.^{1,2}

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET².

En mamíferos, la interacción entre espermatozoides y oviducto genera un reservorio espermático. En porcinos y bovinos existen evidencias que indican que anexina A2 (anxA2) es una de las proteínas oviductales involucradas en esta interacción. AnxA2 interacciona con S100A10 para formar un receptor extracelular heterotetramérico. Por otro lado, algunos estudios indican que la interacción de anxA2 y S100A10 serviría para el traslado hacia la membrana plasmática y posterior translocación de anxA2 hacia el dominio extracelular, mientras que otros indican que anxA2 sólo se presenta en el dominio intracelular. En función de estas múltiples hipótesis y, dado que la interacción entre anxA2 y espermatozoides fue demostrada *in vitro*, nos propusimos investigar la localización celular de anxA2 y de S100A10 y la relación entre ambas proteínas en el oviducto porcino. Además, dado que el epitelio oviductal sufre modificaciones en función del ciclo sexual, la expresión de ambas proteínas en relación a hormonas sexuales fue estudiada. Los resultados obtenidos de experimentos de biotinilación *in situ* de proteínas oviductales, purificación de membranas apicales de células epiteliales y, análisis inmunohistoquímicos indican que anxA2 se presentaría en los dominios intracelular y extracelular, mientras que S100A10 sólo se presenta como proteína citosólica. Estudios de inmunoprecipitación demuestran además que, el heterotetrámero anxA2-S100A10 está presente en epitelio oviductal y que se encuentra interaccionando con la membrana plasmática en el dominio intracelular. Finalmente, estudios realizados con cultivos celulares primarios de células epiteliales oviductales indican que existe una regulación de la expresión de anxA2 por estas hormonas, mientras que S100A10 no mostró tal regulación. Estos resultados indican que anxA2 puede actuar *in vivo* como proteína involucrada en la interacción espermatozoide-oviducto.

271. (65) CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA 2 (COX2) EN EL TESTÍCULO DE RATONES CON LONGEVIDAD ALTERADA

Matzkin M.¹; Miquet J.²; Turyn D.²; Bartke A.³; Calandra R.¹; Frungieri M.^{1,4}

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina¹; Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina²; Facultad de Medicina, Universidad de Southern Illinois, Springfield, IL, USA³; Cátedra de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina⁴.

La hormona de crecimiento (GH) y su cascada de señalización jugarían un rol clave en el balance envejecimiento/longevidad. Por otra parte, se ha propuesto una asociación entre los niveles de expresión tisular de ciclo-oxigenasa 2 (COX2), enzima clave en la síntesis de las prostaglandinas (moléculas mediadoras de procesos inflamatorios) y el envejecimiento celular. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de COX2 en el testículo de ratones adultos normales, ratones con longevidad disminuida por sobre-expresión de GH (GH-Tg) y en 2 modelos de longevidad incrementada: ratones deficientes en la hormona liberadora de GH (GHRH-KO) y ratones enanos (Ames Dwarf Prop1^{-/-}). La expresión testicular de COX2 (COX2/actina evaluada por Western blot, densitometría, unidades arbitrarias) aumentó significativamente en ratones con longevidad reducida (GH-N: 1.00±0.04 vs. GH-Tg: 1.30±0.08*), mientras que disminuyó en los ratones más longevos (GHRH-N: 1.00±0.07 vs. GHRH-KO: 0.60±0.11*; Ames-N: 1.00±0.23 vs. Ames-Dwarf: 0.18±0.01*; media+ESM, n=5-7, *P<0.05). Estudios inmunohistoquímicos permitieron establecer que COX2 se expresa en células con morfología característica de células de Leydig (CL). Además, empleando anticuerpos específicos para COX2 y CD68 (marcador de macrófagos-MAC-), se detectó co-localización de ambas proteínas en células del espacio intersticial. En resumen, este trabajo describe la expresión diferencial de COX2 en el testículo de ratones con longevidad alterada y niveles de GH disímiles. Un aumento en la longevidad estaría directamente relacionado con una disminución en la expresión de COX2 en CL y MAC testiculares.

272. (79) EVIDENCIAS DE ANÓMALA PROGRAMACIÓN INTRAUTERINA EN LA DIABETES MATERNA: ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PPAR α Y MMP9 EN EL CORAZÓN DE LA CRÍA DE RATA DIABÉTICA

Higa R.; Roberti S.; Mazzucco B.; White V.; Jawerbaum A. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-Universidad de Buenos Aires.

Las alteraciones metabólicas de la diabetes materna inducen cambios estructurales y funcionales en diferentes órganos fetales con consecuencias adversas en el crecimiento, desarrollo y metabolismo postnatal. El ambiente intrauterino anómalo altera la programación intrauterina y constituye un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. Las metaloproteasas (MMPs) tienen un rol clave en la remodelación del tejido cardíaco durante el desarrollo fetal. El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) regula la expresión de MMPs que pueden ser activadas por peroxinitritos. Los PPARs son receptores nucleares involucrados en la homeostasis energética y la sobreexpresión de PPAR α en el corazón se vincula con alteraciones en el metabolismo energético cardíaco. El **objeto** de este trabajo es estudiar el efecto de la diabetes en la gestación sobre los niveles de nitrotirosina (marcador del daño inducido por peroxinitritos), CTGF, MMP9 y PPAR α en el corazón de la cría. **Metodología:** Ratas con diabetes pregestacional se obtuvieron por administración de estreptozotocina y se aparearon con machos sanos. Se midió en el corazón de la cría de 2 días de edad (d2): Nitrotirosina, MMP9, CTGF y PPAR α (inmunohistoquímica) y en la cría de 21 días de edad (d21): la expresión de PPAR α (PCR) y MMP9 (inmunohistoquímica). **Resultados:** En el corazón d2 existe un incremento en los niveles de nitrotirosina ($p < 0.01$), MMP9 (254%, $p < 0.01$) y CTGF (355%, $p < 0.001$). El incremento de MMP9 continúa observándose en d21. Se observa un aumento en los niveles de PPAR α (373%, $p < 0.001$) en el corazón de d2, evidenciándose una mayor expresión de este receptor nuclear en corazones de d21 (32%, $p < 0.05$). **Conclusión:** La diabetes materna induce incrementos en factores pro-oxidantes, alteraciones en la remodelación tisular y en receptores involucrados al metabolismo energético en el corazón de la cría, posiblemente relacionado a la programación de cardiomiopatías en la descendencia de madre diabética.

273. (123) LA IL-17 ALTERA LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATO-TESTICULAR E INDUCE INFLAMACIÓN TESTICULAR EN LA RATA

Pérez C.¹; Jacobo P.¹; Pellizzari E.²; Cigorruga S.²; Naito M.^{1,3}; Lustig L.¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Estudios Endocrinológicos (CEDIE)-CONICET² Tokyo Medical University³

La orquitis autoinmune experimental (OAE), modelo útil para estudiar la inflamación testicular, se caracteriza por un infiltrado intersticial de macrófagos y linfocitos Th1 y Th17 asociado a un daño severo de los túbulos seminíferos (TS) que presentan apoptosis y descamación de las células germinales. Previamente hemos demostrado un incremento en la permeabilidad de la barrera hemato-testicular (BHT) asociado a una disminución en la expresión de ocludina entre las células de Sertoli en el testículo de ratas con OAE. Por otra parte, hemos detectado IL-17 en el fluido testicular de ratas con OAE y un aumento en la expresión del ARNm del receptor de IL-17 con respecto a los controles. El objetivo del presente trabajo es analizar, *in vitro* e *in vivo*, los efectos de la IL-17 sobre las uniones estrechas entre células de Sertoli. El agregado de IL-17 a células de Sertoli en cultivo indujo una redistribución de ocludina y claudina-11 que altera la barrera formada por las uniones estrechas entre células de Sertoli evidenciada por una reducción significativa en la resistencia eléctrica transepitelial. Ratas *Sprague-Dawley* adultas fueron inyectadas en el parénquima testicular con 1 μ g de IL-17 recombinante de rata en un volumen de 100 μ l. La IL-17 indujo un incremento en la permeabilidad de la BHT demostrado por la presencia del trazador biotina en el compartimento adluminal

de los TS y la expresión reducida de ocludina. La histopatología testicular analizada 72 hs post-inyección reveló focos de 2-7 TS con diferentes grados de descamación de las células germinales, así como infiltrado linfomonocitario intersticial (principalmente macrófagos pro-inflamatorios ED1+) cercano a los TS dañados. Los resultados sugieren un rol relevante de la IL-17 en el desarrollo de la inflamación testicular, facilitando el reclutamiento de células inmunes al intersticio e induciendo alteraciones en la funcionalidad de la BHT.

274. (134) ¿ES REALMENTE IMPORTANTE LA EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN INFERTILIDAD?

Ducatelli M.; Neuspiller S.; Dédola P.; Neuspiller N.; Coco R.
Fecunditas-Instituto De Medicina Reproductiva.

La integridad del ADN espermático es importante para el normal desarrollo embrionario. En los últimos años se ha enfatizado su importancia, aunque existen controversias. En un trabajo previo, evidenciamos la falta de correlación con todas las etapas de la fecundación *in vitro*. Se comunica la tasa de fragmentación del ADN espermático en una población de varones infértiles con reiteradas fallas reproductivas FIV/ICSI luego de la transferencia. La edad promedio fue de 38,5 \pm 5,7 años (r: 28-52). Los días de abstinencia 4,3 \pm 3,5 días (r: 2-30). El promedio de espermatozoides móviles 16,7 \times 10⁶ \pm 20,3 \times 10⁶ (r: 0-82,5 \times 10⁶). Se utilizó el método directo TUNEL con el kit de Roche®. Las muestras fueron procesadas con la técnica del swim down/swim up. El pellet fue extendido, fijado, permeabilizado e incubado con los nucleótidos marcados y la enzima Terminal deoxynucleotidil transferasa (TdT). El análisis se realizó con microscopía de fluorescencia a 600X contándose 1000 espermatozoides. Se estudiaron 102 muestras y la tasa de fragmentación fue 6,9 \pm 7,3% (r: 0-33). Noventa tuvieron menos del 20%, 6 un 20% y 6 mas del 20%. La edad promedio con 20% o más de fragmentación fue 40,4 \pm 6,9 años y 38,3 \pm 5,6 años con menos del 20%. La abstinencia fue 4,6 \pm 1,0 y 4,3 \pm 3,4 días respectivamente. La tasa de 6,9 \pm 7,3% es inferior a lo reportado. Es lógico pensar que un espermatozoide con fragmentación no reparada dará lugar a un huevo fecundado con pocas chances de evolucionar. Sin embargo, no existen evidencias que sustenten tal hipótesis ya que no hay documentación sobre el incremento de anomalías cromosómicas parciales en las fallas reproductivas. Varios autores lo han relacionado con mala calidad embrionaria y tasas de embarazo. El bajo porcentaje hallado en esta serie, obliga a reflexionar sobre el significado de encontrar que menos de 1 espermatozoide de cada 10 posea fragmentado el ADN. Hasta que no se estandarice la metodología es imposible conocer si el ensayo tiene valor clínico.

275. (178) EFECTOS ESTROGÉNICOS IN VIVO DE UN HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO

Durando M.; Milesi M.; Ramos J.; Ingaramo P.; Fornara S.; Gareis M.; Tschopp M.; Muñoz-De-Toro M.; Luque E.; Varayoud J.
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

En nuestro país, la expansión de las áreas cultivadas condujo al uso masivo de plaguicidas, como glifosato (Gli) y endosulfán (END). Previamente demostramos que END se comporta como un perturbador endocrino (PE) provocando efectos estrogénicos en el útero de la rata. La formulación comercial más conocida de Gli es Roundup® (RU); pero su clasificación como PE es incierta. Nos propusimos investigar similitudes y diferencias en la acción de RU y de 17 β -estradiol (E2) evaluando cambios morfológicos y moleculares en el útero. Ratas adultas ovariectomizadas se inyectaron vía sc por 3 días con: vehículo (control); E2 0,02 mg/kg/día (dosis uterotrópica que aumenta el peso del útero, E2U); E2 0,0002 mg/kg/d (dosis no uterotrópica, E2NU); RU Full II 0,5, 5 o 50 mg/kg/d (RU0, 5; RU5 y RU50). A las 24 hs de la última inyección, se extrajeron los úteros. Una porción de 1,5 cm se pesó

(ensayo uterotrópico), otra se procesó hasta parafina, y el resto se utilizó para extracción de ARN. En cortes histológicos de 5 µm evaluamos la altura del epitelio luminal (AEL) y por inmunohistoquímica la expresión de receptores para estrógenos alfa y beta (REa y b), receptor de progesterona (RP) y la proliferación del epitelio luminal (PEL). Por RT-PCR en tiempo real cuantificamos la expresión del ARNm de genes estrógeno-sensibles: REa y factor 3 de complemento (C3). El ensayo uterotrópico fue positivo para el grupo E2U, al igual que el incremento en la PEL. Tanto E2U como RU0,5 mostraron un aumento en la AEL. El tratamiento con RU provocó cambios en la expresión de REa, REb y RP que fueron diferentes según la dosis, imitando la acción de E2U o de E2NU. A nivel ARNm todos los grupos de tratamiento disminuyeron la expresión de REa. Los resultados muestran que RU provoca cambios moleculares y morfológicos en el útero que imitan al E2 dependiendo de la dosis utilizada. Es necesario profundizar el estudio de herbicidas a base de glifosato por su potencial acción como perturbador endocrino.

276. (188) FOLICULOGÉNESIS OVÁRICA DURANTE UNA CONDICIÓN HIPERANDROGÉNICA, Y SU TRATAMIENTO CON ROSIGLITAZONA

Vélez L.; Heber M.; Roco Ferreyra S.; Abruzzese G.; Motta A.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

En mujeres con Síndrome del Ovario Poliquístico el tratamiento con glitazonas restaura funciones reproductivas uniéndose a los receptores nucleares regulados por proliferadores peroxisomales gama (PPAR γ). Sin embargo no se conoce el mecanismo de acción. Previamente vimos que PPAR γ interviene regulando la foliculogénesis temprana. Objetivo: estudiar si el hiperandrogenismo altera el desarrollo folicular temprano modulando el sistema PPAR α y su relación con la esteroidogénesis y el sistema prostaglandinas (PGs), y el rol del tratamiento con rosiglitazona (R). Para ello indujimos foliculogénesis en ratas hembras prepuberales mediante inyección de eCG. Otro grupo fue además hiperandrogenizado con dehidroepiandrosterona (eCG+HA) y un tercer grupo fue además tratado con R vía oral (eCG+HA+R), e incluimos un grupo con vehículo (C) y un grupo eCG+R. Se estudió la expresión génica en el ovario por qPCR de: PPAR α 1, de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), y la enzima limitante de la síntesis de prostaglandinas, COX-2, y se midieron los niveles séricos de estradiol (E) y testosterona (T) y el estado inflamatorio caracterizado por la PGE ovárica por radioinmunoensayo. N= 10/grupo. La expresión de PPAR α 1 aumentó en eCG vs C (p<0.05), pero no en eCG+HA, eCG+HA+R retornó al nivel de eCG (p<0.05), y eCG+R no varió vs eCG. La expresión de StAR en eCG aumentó vs. C, y más aún en eCG+HA (p<0.05), eCG+R retornó a C (p<0.05) y eCG+HA+R fue similar a eCG. E y T aumentaron en eCG vs. C, y aún más en eCG+HA (p<0.05), eCG+R fue similar a eCG. En eCG+HA+R vs eCG+HA, E fue similar y T menor (p<0.05). COX-2 y PGE ovárica aumentaron en eCG vs. C, y aún más en eCG+HA (p<0.05); en eCG+HA+R se normalizaron a niveles C, al igual que eCG+R. Concluimos que la hiperandrogenización modula la expresión de PPAR α 1, y ésta a su vez modifica la esteroidogénesis generando un ambiente endócrino desfavorable y establece un estado proinflamatorio: El tratamiento con R revierte estas alteraciones.

277. (202) EL TRATAMIENTO MATERNO CON ACEITE DE OLIVA PREVIENE ALTERACIONES METABÓLICAS Y PRO-OXIDANTES EN EL CORAZÓN DE LA DESCENDENCIA DE RATAS CON DIABETES MODERADA.

Pelesson M.¹; Fornes D.¹; Arany E.²; Jawerbaum A.¹; Capobianco E.¹

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)- CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Universidad de Western Ontario, Facultad de Medicina, Canadá².

La diabetes materna induce la programación intrauterina de enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Previamente, evi-

deniamos que el tratamiento de ratas diabéticas gestantes con aceite de oliva (rico en ácido oleico, agonista de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)) tiene efectos benéficos a nivel fetal. **Objetivo:** Estudiar el efecto del tratamiento materno con aceite de oliva sobre el metabolismo lipídico y marcadores pro-inflamatorios/pro-oxidantes en el corazón de la cría adulta de rata diabética. **Métodos:** Ratas Wistar sanas (C) y diabéticas (D, glucemias entre 180 y 220 mg/dl) fueron alimentadas con dieta suplementada o no con 6% de aceite de oliva desde el día 1 de gestación hasta el parto. A los 4 meses de edad se obtuvo el corazón de las crías de ratas C y D, donde se determinaron los niveles de lípidos (mediante TLC), TBARS (índice de lipoperoxidación) y la producción de óxido nítrico (dosaje de sus metabolitos estables, nitros/nitritos). **Resultados:** En el corazón de las crías hembra de ratas D se evidenciaron elevados niveles de ácidos grasos libres (70%, p<0.05) y fosfolípidos (36%, p<0.05), los cuales fueron reducidos mediante el tratamiento materno con aceite de oliva (30% y 21% respectivamente, p<0.05). El corazón de las crías macho de ratas D evidenció elevados niveles de triglicéridos (53%, p<0.05) que se redujeron con el tratamiento con aceite de oliva (44%, p<0.05). Los elevados niveles de nitros/nitritos y TBARS en el corazón de crías de ratas D, también fueron reducidos mediante el tratamiento con aceite de oliva (17% y 21% respectivamente, p<0.05). **Conclusiones:** El tratamiento materno con aceite de oliva tiene efectos benéficos sobre el metabolismo lipídico y parámetros pro-oxidantes en el corazón de la descendencia de ratas D. Estos hallazgos podrían conducir a tratamientos que reduzcan el riesgo de afecciones cardíacas, producto de la anómala programación intrauterina asociada a la diabetes materna.

278. (217) LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A ENDOSULFÁN Y DIETILSTILBESTROL AFECTA LA DIFERENCIACIÓN EPITELIAL UTERINA EN EL PERIODO PRE-IMPLANTATORIO

Ingaramo P.; Varayoud J.; Milesi M.; Alarcón R.; Guerrero Schimpf M.; Muñoz-De-Toro M.; Luque E.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Previamente determinamos que la exposición postnatal a dietilstilbestrol (DES) o Endosulfán (END) produce fallas en el proceso de implantación, que se explicarían en parte por alteraciones en el útero. En este proceso, tanto las glándulas y la integridad del epitelio uterino, como la expresión de receptores esteroides [receptor de estrógenos alfa (REa) y receptor de progesterona (RP)], son fundamentales para la diferenciación del útero hacia un estado receptivo. Nos propusimos investigar si la exposición postnatal a DES o END induce cambios morfológicos en el epitelio luminal (EL) y estructura glandular, y altera la expresión de REa y RP en el útero de ratas preñadas. Ratas Wistar, fueron tratadas vía sub-cutánea con aceite (control, C), DES (0,2µg/Kg peso corporal, p.c./día) y END (600µg/kg p.c./día), los días 1, 3, 5 y 7 postnatales, apareadas en la adultez y sacrificadas en día 5 de preñez (período pre-implantatorio). En el útero determinamos la altura del EL, el número de glándulas y la expresión inmunohistoquímica de REa y RP en EL y epitelio glandular (EG). Se observaron alteraciones morfológicas en EL y estructura glandular en los animales expuestos a DES y END. La altura del EL aumentó en los grupos DES y END (C: 16,5±0,5; DES: 22±1,0; END: 19,0±1,0, p<0.05), mientras que el número de glándulas disminuyó en ambos grupos (C: 43±0,5; DES: 34±1,0; END: 29±1,0, p<0.05). En relación a los receptores esteroides, observamos aumento en la expresión de RP en EL y EG en los animales expuestos a DES, y en EG en los expuestos a END (EL: C: 3,0±0,5; DES: 8,0±1,0; END: 6,0±1,0; EG: C: 2,5±0,3; DES 7,0±1,2; END: 5,5±0,9, p<0.05). Concluimos que las alteraciones morfológicas y los cambios observados en la expresión de RP, podrían explicar las fallas en la implantación en los animales expuestos postnatalmente a DES o END. La exposición temprana a estos perturbadores endocrinos induce cambios "organizacionales" que se mantienen en el adulto.

279. (246) LA EXCLUSIÓN DE AMPc A TRAVÉS DE MRP4 ES NECESARIA PARA LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN BOVINOS: CONTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES DE A1 PURINÉRGICOS (A1R)

Osycka-Salut C.¹; Diez F.²; Burdet J.¹; Gracia Gervasi M.¹; Franchi A.³; Bianciotti L.⁴; Davio C.²; Pérez-Martínez S.¹
*Laboratorio de Biología de La Reproducción en Mamíferos, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*¹ *Laboratorio de Farmacología de Receptores, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina*²; *Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*³; *Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Cátedra de Fisiopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*⁴.

La capacitación espermática se correlaciona con cambios estructurales y bioquímicos en el espermatozoide (ESP) que involucra, entre otros, un incremento en los niveles de AMPc. A su vez, en otros tipos celulares, tanto en condiciones fisiológicas y patológicas el AMPc es excluido por proteínas de resistencia a multidrogas (MRPs), en particular MRP4, regulando la homeostasis celular. El objetivo del trabajo fue estudiar la participación del proceso de exclusión de AMPc, vía MRP4, en el proceso de capacitación inducida por bicarbonato en bovinos. Se realizaron experimentos de capacitación *in vitro* de ESP bovinos criopreservados incubados con bicarbonato 40 y 70 mM, probenecid (inhibidor de MRPs), y DPCPX (antagonista de A1R). La evaluación de la capacitación fue realizada mediante las técnicas de clorotetraciclina y de inducción de la reacción acrosomal por lisofosfatidilcolina analizada con la lectina PSA acoplada a FITC. Los niveles *intra* y *extracelulares* de AMPc fueron detectados mediante un ensayo de unión a PKA y posterior determinación de AMPc. La incubación de los ESP con bicarbonato 40 y 70mM incrementó el patrón capacitado de los ESP y los niveles de AMPc tanto a nivel *intracelular* como *extracelular* ($p < 0.01$). El bloqueo farmacológico de MRPs con probenecid, incrementó los niveles *intracelulares* de AMPc en el ESP e inhibió la capacitación inducida por bicarbonato ($p < 0.01$). A su vez, la incubación con AMPc incrementó el patrón capacitado de los ESP ($p < 0.01$). Para evaluar el mecanismo de acción del AMPc *extracelular* estudiamos la participación de A1R. El bloqueo de A1R disminuyó el efecto capacitante tanto de bicarbonato como de AMPc ($p < 0.01$). Por último, MRP4 se localiza en la región *post-acrosomal* y en la *cola* del ESP. Los resultados sugieren que la exclusión de AMPc, posiblemente vía MRP4, y la activación de A1R, regulan eventos asociados a la capacitación inducida por bicarbonato indicando por primera vez un rol *parácrino/autócrino* de AMPc en ESP bovinos.

280. (261) EFECTOS DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DEL PLÁSMIDO PCX-EGFP DESNUDO Y DE LA UTILIZACIÓN DE VESÍCULAS DE OOLEMA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO Y LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) EN PORCINOS

Luchetti C.¹; Bevacqua R.¹; Willis M.²; Ferraris S.²; Vitullo A.²; Salamone D.¹
*Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires*¹; *Universidad Maiónides*².

El objetivo de este trabajo fue optimizar la inyección intracitoplasmática (IC) del plásmido en embriones porcinos, determinando los efectos de concentraciones crecientes de plásmido y la utilización de vesículas de oolema sobre el desarrollo embrionario y la expresión de la GFP. Ovocitos porcinos obtenidos de ovarios de frigorífico fueron madurados *in vitro* y activados partenogénicamente por pulso eléctrico + 6-DMAP (diploides).

Los cigotos fueron inyectados IC con el plásmido *pcx-EGFP* y cultivados en medio SOF a 39° C, 5% CO₂ y 100% de humedad. Grupos experimentales: control (no inyectados, N=198)–GFP des (inyectados con *pVp*+plásmido): 3 ng/μl (N=93)–30 ng/μl (N=70)–300 ng/μl (N=65)–GFP des *lin* (plásmido *lineal* 30 ng/μl, N=78)–GFP ves (vesículas+plásmido *lin* 30 ng/μl, N=115)–SHAM *pVp* (sólo *pVp*, N=75)–SHAM ves (*pVp*+vesículas, N=59). Se registró *%clivaje* (día 2), *%blastocistos* (día 7) y *%GFP+* bajo luz azul (días 4 y 7). Se aplicó test de Fisher ($P < 0.05$). El *%GFP+* aumentó junto con la concentración de plásmido (control 0%, GFP des 3 ng/μl 12%, GFP des 30 ng/μl 24%, GFP des 300 ng/μl 26%). El *%blastocistos* disminuyó al aumentar las concentraciones (control 22%, GFP des 3 ng/μl 12%, GFP des 30 ng/μl 10%, GFP des 300 ng/μl 0%). No hubo diferencias en *%clivaje*. Se escogió la concentración de 30 ng/μl por balance entre *%GFP+* y *%blastocistos*, se *linealizó* el plásmido con la enzima Hind III y aumentó el *%GFP+* (*lin* 46%, *circ* 24%) y el *%blastocistos GFP+* (*lin* 33%, *circ* 0%). Luego se *co-incubó* el plásmido con vesículas de oolema y aumentó el *%GFP+* (GFP ves 76%, GFP des 30 ng/μl 46%) y el *%blastocistos GFP+* (GFP ves 100%, GFP des 30 ng/μl 33%). Concluimos que un incremento en la concentración de plásmido *pcx-EGFP* inyectado IC en cigotos porcinos aumenta la expresión de la GFP y disminuye el desarrollo embrionario temprano y que la *linealización* y la utilización de vesículas de oolema mejoran la expresión de la GFP. Queda por estudiar *integración* al genoma embrionario.

281. (292) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN EL EFECTO ANTIAPÓPTÓTICO DE LA LEPTINA

Rayen Toro A.¹; Pérez-Pérez A.²; Maskin B.³; Sánchez-Margalet V.²; Varone C.¹

*Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, QUIBICEN-CONICET*¹; *Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España*²; *Hospital Nacional Profesor A. Posadas, Buenos Aires, Argentina*³.

Durante la implantación embrionaria se genera un diálogo materno fetal que involucra la acción de múltiples reguladores, siendo uno de ellos la leptina. Esta proteína de 16 kDa fue descubierta en tejido adiposo con la función de regular el balance energético del organismo. También se expresa en placenta humana donde podría tener efectos sobre el crecimiento, la supervivencia, la angiogénesis y la inmunomodulación placentaria. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la leptina aumenta la proliferación celular y supervivencia en células placentarias, provocando la disminución de la actividad de Caspasa-3 y de los niveles de p53. El objetivo de este trabajo es estudiar los mecanismos involucrados en la acción antiapoptótica de la leptina mediada por p53 en placenta. Se estudió la expresión de p53 en células Swan en presencia de un inhibidor de MEK 1/2 (PD 98059) y en células transfectadas transientemente con un vector de expresión de una mutante dominante negativa de MEK. En ambas situaciones la leptina fue incapaz de ejercer su efecto inhibitorio sobre los niveles de p53. Realizamos experimentos análogos para la vía de PI3K/AKT. Encontramos que en presencia del inhibidor de PI3K (LY 294002) y en células transfectadas con un vector de expresión de una mutante dominante negativa de AKT, leptina tampoco pudo generar la disminución de los niveles de p53. Ambos resultados indican que tanto la vía de MAPK como de PI3K/AKT estarían involucradas en la acción de la leptina sobre los niveles de p53. Comprobamos, mediante el uso de los inhibidores farmacológicos PD 98059 y LY 294002, que en explantos de placenta humana a término dichas vías de señalización también están involucradas en la acción de leptina sobre p53. Estos resultados continúan reforzando la noción de la leptina como una importante citoquina placentaria, con la función de promover la supervivencia de las células trofoblásticas.

282. (303) BÚSQUEDA DE BLANCOS FISIOLÓGICOS DE SPINK3 EN LA SUPERFICIE ESPERMÁTICA A TRAVÉS DE UNA ESTRATEGIA DE CROSSLINKING

Alonso C.; Zalazar L.; De Castro R.; Cesari A.

Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB)-CONICET, Universidad de Mar del Plata, Buenos Aires.

La capacitación es un proceso que deben atravesar los espermatozoides a fin de fecundar al ovocito. Éste consiste en una serie de cambios bioquímicos a nivel intracelular y de membrana que desencadenan la hipermotilidad y la reacción acrosomal. Entre estos cambios se encuentra la eliminación de factores de capacitación del plasma seminal que están unidos a la superficie espermática evitando que se produzca una capacitación prematura. Una de las moléculas caracterizada por ser deapacitante es SPINK3 (*Serin Protease Inhibitor Kazal-type 3*), una proteína secretada por la próstata y la vesícula seminal que además de inhibir el ingreso de Ca^{2+} al espermatozoide, es un inhibidor de serina proteasas que se libera de la superficie en el tracto reproductor femenino. Según hemos reportado, la unión de SPINK3 al espermatozoide es independiente de su capacidad inhibitoria, aunque todavía no hay estudios concluyentes acerca de la identidad de la proteína a la que se une. Utilizando la proteína recombinante SPINK3 fusionada a GST (GST-SPINK3) que carece de actividad inhibitoria de tripsina, se construyó una columna de afinidad inmovilizando GST-SPINK3 a la matriz mediante un crosslinker bifuncional. Esta fue utilizada como herramienta en la búsqueda del blanco de SPINK3 en una preparación de proteínas de membrana espermática. La fracción de proteínas retenidas por la columna se analizó por SDS-PAGE y zimografía en presencia o ausencia de SPINK3-His₆, una versión de la proteína recombinante que mantiene su actividad inhibitoria de tripsina. Los resultados del SDS-PAGE muestran dos bandas de aproximadamente 68 y 54 kDa que fueron retenidas por la columna cuya identidad está siendo analizada. La zimografía mostró dos bandas que poseen actividad proteolítica no-inhibible por SPINK3-His₆. Estos resultados confirman que SPINK3 se une a través de interacciones proteína-proteína a la superficie espermática y que esta unión no es dependiente de su capacidad inhibitoria.

283. (382) PAPEL DE LA METFORMINA EN LA REGULACIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS OVÁRICOS EN EL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (PCOS)

Di Pietro M.¹; Parborell F.¹; Tesone M.^{1,2}; Abramovich D.¹
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

El PCOS es la alteración endócrina más frecuente en mujeres en edad Fertil. Es un síndrome heterogéneo que se presenta con hiperandrogenismo, oligomenorrea y ovario poliquístico. Los pacientes con PCOS poseen además altos niveles de VEGF y un aumento en el sistema de angiopoyetinas (ANGPTs) en el ovario, con lo que se concluye que la angiogénesis ovárica se encuentra alterada. Las terapias actuales solo apuntan a disminuir los síntomas. La metformina es una biguanida utilizada como hipoglucemiante oral para el tratamiento de diabetes tipo 2. El uso de metformina en pacientes con PCOS se asocia a un aumento en los ciclos menstruales, una mayor tasa de ovulación y una disminución en los niveles de andrógenos circulantes. Sin embargo, no se conocen los mecanismos de acción de la metformina en el ovario. Nosotros postulamos que la metformina podría actuar en el ovario regulando los niveles de los factores angiogénicos, mejorando la selección del folículo dominante, disminuyendo la formación de quistes y aumentando la tasa de ovulación. Métodos: utilizamos un modelo de PCOS en ratas mediante la administración de DHEA durante 15 días (6mg/ 100 g de peso). Las ratas control recibieron vehículo. Un grupo de ratas PCOS fue tratado con metformina en el agua de bebida durante los 15 días de tratamiento con DHEA (300 mg/ Kg). Al día 16 las ratas fueron sacrificadas, se extrajeron los ovarios y se procesaron para western blot o para cortes histológicos. Resultados: La administración de metformina disminuyó los niveles ováricos de VEGF en ratas PCOS. Los niveles ováricos de ANGPT1 y 2, de su receptor TIE-2 y del receptor de VEGF, FLK1, no se modificaron con el tratamiento. El tratamiento con metformina disminuyó además el porcentaje de

quistes ováricos. Conclusión: El tratamiento con metformina disminuye los niveles de VEGF ováricos, mejorando la angiogénesis folicular. Esto contribuiría a una mejora en el desarrollo folicular y a una disminución en la formación de quistes.

284. (399) EL RECEPTOR LPA3 REGULA LA VASCULARIZACIÓN DE LOS SITIOS DE IMPLANTACIÓN

Beltrame J.¹; Sordelli M.¹; Dmytrenko G.¹; Cella M.¹; Sales M.¹; Blois S.²; Franchi A.¹; Ribeiro M.¹
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET¹; Laboratory of Reproductive Medicine, Berlin, Alemania².

El ácido lisofosfatídico juega un rol fundamental en el establecimiento de la preñez. La implantación del blastocisto en el útero materno requiere de procesos claves como la vascularización. Anteriormente, observamos que el LPA in vitro, a través del receptor LPA3, aumenta mediadores de la vascularización (óxido nítrico y la prostaglandinaE2) en el útero de rata, además de incrementar un marcador de este proceso, como IL-10. Nuestro objetivo fue estudiar la participación del receptor LPA3 en el proceso de vascularización que ocurre durante la implantación. Para ello, ratas Wistar en día 5 de gestación recibieron una dosis única intrauterina de DGPP, un antagonista del LPA3. Se estudió la expresión de marcadores de vascularización y de características de la implantación en los días 8 y 15 de gestación. La administración del DGPP indujo la reabsorción embrionaria en forma dosis dependiente (d8: 50%, d15: 70%). Si bien la estructura del útero no se modificó, en la placenta se observaron signos de muerte celular, infiltración de leucocitos y extravasación eritrocitaria, sugiriendo fallas tempranas en la vascularización de los sitios de implantación. Además, se observó una reducción en la longitud transversal de los vasos principales que irrigan el útero y una reducción en la expresión de IL-10, VEGF y VEGFR1, tres marcadores de vascularización. Estos resultados sugieren que el receptor LPA3 está involucrado en la vascularización del sitio de implantación que tiene lugar durante la implantación.

285. (425) EL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G-CSF) PROMUEVE LA MIGRACIÓN DE UNA LÍNEA DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS DE PRIMER TRIMESTRE

Furmento V.¹; Madhivanan K.²; Aguilar C.²; Marino J.¹; Roguin L.¹
Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; University of Purdue, USA².

Previamente determinamos la presencia del receptor para el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la línea de células trofoblásticas Swan 71, derivada de placenta humana de primer trimestre. Demostramos que el G-CSF induce un aumento de la actividad proteolítica de la metaloproteínasa-2 y de la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular, a través de la activación de las vías MAPK Erk1/2, PI3K/Akt y del factor nuclear kB (NFkB). Con el fin de estudiar el rol biológico del G-CSF en la migración celular, evaluamos las características morfológicas del citoesqueleto de actina mediante ensayos de inmunofluorescencia con rodamina-faloídina. Encontramos un incremento de aproximadamente un 50% en el número de células que presentan fenotipo migratorio (presencia de lamelipodio y cola) luego de 9 horas de incubación con 100 ng/ml de G-CSF (n=4, p<0.05). Mediante ensayos de migración en cámaras Transwell demostramos que el G-CSF indujo un aumento significativo del número de células que migran luego de 9 horas de incubación (valores de las medianas: 4,1 para el control versus 21,4 para G-CSF; n=10, p<0.02). Asimismo, por "ensayos de herida" (wound healing assay) comprobamos que el G-CSF produjo un incremento del 10% (n=3, p<0.05) en el cierre de la herida de células tratadas con respecto al control (células incubadas en ausencia de G-CSF). También demostramos que el G-CSF activó la MAPK p38, y que esta vía, junto con la cascada de MAPK Erk1/2, estarían mediando la migración celular. En su conjunto, los resultados ob-

tenidos revelaron que el G-CSF constituye un estímulo suficiente para inducir la migración de las células trofoblásticas Swan 71, y sugieren que entre las MAPK, Erk1/2 y p38 participan en esta respuesta biológica.

286. (562) PARTICIPACIÓN DE LAS PEQUEÑAS GTPASAS EN LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA ESPERMÁTICA DURANTE LA CAPACITACIÓN Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL

Romarowski A.¹; Przepiora E.¹; Battistone M.¹; La Spina F.¹; Cuasnicu P.¹; Visconti P.²; Buffone M.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET¹; Department of Veterinary and Animal Science, University of Massachusetts, USA².

Los espermatozoides (Ezs) de mamífero adquieren capacidad fecundante durante su paso por el tracto femenino en un proceso denominado capacitación, en el cual desarrollan la posibilidad de realizar exocitosis acrosomal (EA). Esta última se adquiere, entre otras cosas, debido a la polimerización de la actina globular (G) en filamentos (F). El objetivo de este trabajo fue evaluar en Ezs murinos el proceso de polimerización de actina durante la capacitación y estudiar las vías de transducción de señales involucradas, en particular, la participación de las pequeñas GTPasas. Los cambios en los niveles de actina-F fueron evaluados utilizando microscopía de fluorescencia, citometría de flujo e inmunoblot (WB) a distintos tiempos de la capacitación. Observamos un aumento gradual en los niveles de actina-F. Utilizando distintas condiciones experimentales, evidenciamos que este fenómeno no dependería exclusivamente de la activación de la vía de PKA ya descrita en la capacitación. Para estudiar la participación de las pequeñas GTPasas y sus efectores, evidenciamos la expresión de RhoA, RhoC, Rac1, ROCK1, LIMK1/2 y cofilin. Utilizando inhibidores farmacológicos, observamos una disminución en los niveles de actina-F al inhibir Rac1 y no observamos efectos al inhibir RhoA y ROCK. Al evaluar por WB la fosforilación de los efectores LIMK y cofilin, los únicos sustratos conocidos que vinculan la activación de Rac con el proceso de polimerización de actina, observamos un aumento en los niveles de fosforilación de LIMK1/2 pero no de cofilin durante la capacitación. Solamente al inhibir Rac1, se observó una disminución en los niveles de fosforilación de LIMK1/2. Asimismo, al evaluar el porcentaje de EA, observamos una disminución en aquellos Ezs tratados con el inhibidor de Rac1, y no con el de RhoA o ROCK. Estos resultados sugieren que Rac1 se encontraría involucrada en la regulación de la polimerización de actina durante la capacitación vía la activación de la kinasa LIMK1/2.

287. (569) INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE TGFβ Y DEL RECEPTOR TGFβ-R1 EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA EN BOVINOS LECHEROS

Matiller V.; Stangaferro M.; Díaz P.; Amweg A.; Rey F.; Ortega H.; Salvetti N.

Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVet-Litoral)-CONICET, Universidad Nacional del Litoral.

Existen tres isoformas del factor de crecimiento transformante-β (TGFβ-1, -2 y -3) que actúan de manera autocrina y paracrina en el ovario a través de receptores específicos. Debido a las múltiples funciones que poseen estas proteínas, su expresión podría afectar el normal desarrollo folicular, formando parte de la patogenia de la enfermedad quística ovárica (COD) en bovinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de las tres isoformas de TGFβ y del receptor TGFβ-R1, en ovarios de animales con COD espontánea e inducida mediante ACTH. Se trabajó con secciones de ovarios bovinos sobre las que se determinó la presencia de las proteínas citadas por inmunohistoquímica indirecta. Se digitalizaron imágenes de las distintas categorías de folículos de ambos grupos y se realizó el análisis digital mediante el programa Image-Pro Plus 3.0.1. Los tres ligandos y el receptor fueron detectados en el citoplasma de todas las células ováricas estudiadas. La expresión de TGFβ-1 en células de la

granulosa fue mayor que en células de la teca interna. Se estudió la inmunomarcación en las estructuras foliculares para evaluar las diferencias a lo largo de la foliologénesis y se determinó que los quistes espontáneos presentaron la mayor expresión de las tres isoformas y del receptor ($p < 0.05$). Además se hallaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión del receptor en la granulosa entre folículos secundarios y terciarios en desarrollo de animales controles e inducidos, que expresaron una menor expresión que los quistes espontáneos. Considerando la funciones de las isoformas de TGFβ en el ovario, es probable que su expresión aumentada en los quistes foliculares este vinculada con la persistencia en el tiempo de las estructuras quísticas. Por otra parte, una mayor expresión del TGFβ-R1 podría favorecer las acciones del ligando, actuando de manera específica en los folículos en crecimiento, favoreciendo la persistencia y el recambio por nuevas estructuras quísticas.

288. (608) ROL DE LAS ACUAPORINAS EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CITOTROFOBLASTO HUMANO

Reca A.; Martínez N.; Damiano A.

Catedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Las acuaporinas (AQP) son canales que permiten el pasaje rápido de agua a través de la membrana plasmática en respuesta a gradientes osmóticos o hidrostáticos. Si bien existen 13 isoformas sólo ha sido reportada una expresión considerable de AQP1, AQP3 y AQP9 en vellosidades coriónicas humanas durante el primer trimestre de gestación. Recientemente se han descubierto nuevas funciones para estos canales, destacándose su participación en la migración de células epiteliales, endoteliales y tumorales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el rol de las AQPs en la migración del citotrofoblasto durante los estadios iniciales de la gestación. La línea celular de citotrofoblasto humano de primer trimestre, Swan 71, fue mantenida en DMEM/F12 suplementado con 10% SFB y antibióticos a 37°C en 5% de CO₂. Para el ensayo de *wound healing*, monocapas confluentes fueron sometidas a un arresto de 18 horas previo a realizar manualmente el *wound* y se evaluó el cierre del mismo a las 8 horas en 3 condiciones experimentales: a) control, b) 50 μM HgCl₂ (inhibidor general de AQPs) y c) 100 μM Floretina (inhibidor de AQP9). Se corroboró la expresión de AQPs en la línea celular por medio de Western Blot y la viabilidad se ensayó por medio del método de MTT. El porcentaje de cobertura de la herida obtenido en el ensayo de *wound healing* para cada grupo fue el siguiente: a) control: 37,69 ± 2,96, b) 50 μM HgCl₂: 24,37 ± 2,46* y c) 100 μM Floretina: 31,56 ± 2,28*. * $p < 0,05$, n=12. El tratamiento con HgCl₂ y Floretina redujo el cierre de la herida en un 35% y en un 17% respectivamente con respecto al control, lo que indicaría que las AQPs participarían en la modulación de la migración del citotrofoblasto durante el primer trimestre de gestación. Futuros estudios serán necesarios para dilucidar cual/cuales isoformas se encuentran involucradas en este proceso.

289. (643) EL ANTIOXIDANTE N-ACETIL-CISTEÍNA REVIERTE EL EFECTO DEL MONO (2-ETILHEXIL) FTALATO (MEHP) SOBRE LAS UNIONES INTERCELULARES EN CÉLULAS DE SERTOLI (CS)

Sobarzo C.¹; De Moraes R.^{2,3}; Lustig L.¹; Denduchis B.¹; Schteingart H.²

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Centro Investigaciones Endocrinológicas Dr. "César Bergada" (CEDIE)-CONICET-FEI-División Endocrinología²; Departamento de Fisiología, Universidade Federal Do Paraná Curitiba, Pr, Brasil³.

MEHP es un reconocido tóxico reproductivo que causa atrofia testicular y desbalance del estado redox celular. Previamente demostramos que el tratamiento de CS en cultivo con MEHP induce modificaciones en la expresión de las proteínas de unión intercelular y disminución en la concentración de Glutatión intracelular (GSH) (SAIC 2011). El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de un agente antioxidante (N-acetil-cisteína) sobre las

alteraciones, inducidas por MEHP, en las uniones intercelulares y el nivel de estrés oxidativo. Se aislaron CS de ratas de 20 días de edad y se cultivaron por 5 días en medio químicamente definido. Las CS controles o estimulados con MEHP (200 μ M) fueron tratados con N-acetil-cisteína 1 mM (NAC) las últimas 24hs. Los niveles de GSH se determinaron por espectrofotometría. Los datos se expresan como% del control, media \pm DS, n=6, * P<0.05 (Control: 344.7 \pm 21.8 pmolGSH/ μ gDNA). La localización y expresión de las proteínas de uniones adherentes: N-cadherina (N-Cad), α y b-cateninas (cat) y ZO-1; y de uniones nexa: conexina-43 (Cx-43) se determinaron por inmunofluorescencia (IF) y Western Blot (WB). El tratamiento con NAC fue capaz de prevenir la disminución de GSH inducida por MEHP (GSH% vs control; MEHP: 24 \pm 5*; NAC: 188.1 \pm 16.5*; MEHP+NAC: 162.2 \pm 26*). Por IF se observó una deslocalización e incremento de la señal de las proteínas N-cad y α -cat por la acción del MEHP. Por WB también se detectó, un aumento significativo en la expresión de las proteínas N-cad, α y b-cat y ZO-1 y una disminución significativa de Cx-43 en CS tratadas con MEHP. La adición de NAC fue capaz de revertir el efecto del MEHP sobre N-cad y α -cat. Sin embargo NAC no pudo revertir el efecto de MEHP sobre la Cx-43 y ZO-1. Los resultados obtenidos con el antioxidante NAC muestran que las alteraciones en las uniones intercelulares inducidas por el MEHP ocurren, al menos en parte, por el aumento del estrés oxidativo generado por el tóxico.

- 290. (667) EFECTO DE LA LEPTINA SOBRE LAS METALOPROTEASAS DE MATRIZ DURANTE LA DECIDUALIZACIÓN**
Vaccarezza A.; Cerchi G.; Vitullo A.; Cameo P.; Farina M.²
CEBBAD, Universidad Maimónides¹; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET².

Durante la receptividad endometrial se decidualizan los fibroblastos uterinos y se expresan diversas moléculas, como la leptina. La acción biológica de la leptina es ejercida a través del receptor de leptina, el cual presenta numerosas isoformas durante la decidualización. La interacción ligando/receptor desencadena diversos caminos de señalización entre los cuales se encuentra la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Recientemente se ha demostrado que AMPK regula la expresión de las metaloproteasas (MMPs), esenciales en el remodelado de la matriz extracelular. Sin embargo, su rol en la decidualización no ha sido determinado. Por ello, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la leptina recombinante humana sobre la activación de la vía AMPK y la expresión de MMP-2 y MMP-9 durante la decidualización. Para ello, se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos uterinos humanos (HuF) provenientes de placentas normales a término. Bajo determinados estímulos las células HuF (endometrio) se decidualizaron *in vitro* (decidua). Analizamos por distintos tiempos el efecto de 50 y 500 ng/ml leptina sobre AMPK α -P, MMP-2 y MMP-9 mediante inmuno-blot. Detectamos un incremento en la fosforilación de AMPK α durante la decidualización, así como en las HuF tratadas con leptina. Observamos un aumento en la expresión de MMP-2 durante la decidualización, sin embargo, este efecto fue revertido tanto en endometrio como en decidua cuando las HuF fueron tratadas con leptina. Por otro lado, no observamos cambios en la expresión de MMP-9 durante la decidualización, mientras que el tratamiento con leptina provocó una disminución en la expresión de MMP-9 en endometrio. Estos resultados nos permiten sugerir que la leptina podría modular, vía AMPK, la producción de MMPs, moléculas cruciales en el control de la receptividad endometrial durante la decidualización.

- 291. (695) LA MELATONINA PREVIENE EL DAÑO FETAL EN UN MODELO DE PARTO PREMATURO INDUCIDO POR LPS**
Domínguez Rubio A.; Aisemberg J.; Waremkraut M.; Zorrilla Zubilete M.; Franchi A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET.

El nacimiento prematuro es la causa más importante de morbi-mortalidad perinatal a nivel mundial. La melatonina (M) previene

las alteraciones en el crecimiento fetal y la fisiología placentaria en modelos de parto prematuro (PP). En trabajos previos, desarrollamos un modelo de PP en hembras BALB/c. La administración, en el día 15 de preñez, de dos dosis relativamente bajas de LPS produce 100% de PP, sin comprometer la supervivencia de la madre. La M administrada en forma de pastilla subcutánea (25 mg, 3% p/v) en el día 14 de preñez, previno el parto prematuro inducido por LPS en el 50% de los casos. A su vez la M revirtió el aumento de distintas moléculas inflamatorias inducidas por el LPS, como el TNF- α , la PGE₂, la PGF_{2 α} y el NO en el útero. En este trabajo analizamos el efecto de la M en las crías donde se previno el PP. Se analizó el efecto de la M sobre el estado general del feto y en las crías, evaluándose parámetros de desarrollo físico y el peso de las mismas hasta el destete. Finalmente a los machos adultos provenientes de hembras tratadas con M+LPS se les realizó un test de evitación inhibitoria con el objeto de evaluar memoria asociativa. La M revirtió el daño generalizado en los fetos debido al LPS, como la falta irrigación cerebral y el deterioro del hígado. Las crías provenientes de hembras tratadas con M+LPS no presentaron diferencias en cuanto a la apertura de ojos, el crecimiento del pelo y las uñas y la erupción de los dientes. La tasa de crecimiento hasta el destete fue la misma que la de las crías provenientes de hembras C (p>0,05). Los machos adultos provenientes de hembras tratadas con M+LPS tampoco presentaron diferencias en memoria asociativa (p>0,05). Estos resultados sugieren que la melatonina podría contribuir a un nuevo abordaje terapéutico para la prevención del PP y la supervivencia de los neonatos sin consecuencias en procesos de memoria y aprendizaje.

- 292. (822) ITIH4 BOVINA: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN EN LA PREÑEZ**
Ruiz Álvarez J.; Roldán M.; Charmandarian A.; Haumlir J.²; Marini P.¹
Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET¹; Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario².

Los mecanismos del establecimiento y mantenimiento de la preñez en bovinos y otros animales de granja son actualmente foco de estudio dada la importancia económica de estas especies. Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4 (ITIH4) ha sido descrita como una glicoproteína plasmática asociada a la inflamación de fase aguda en bovinos. Estudios recientes han relacionado la expresión de ITIH4 y su ARNm con el proceso reproductivo en mamíferos. Hasta el momento se ha analizado su expresión en endometrio porcino durante el ciclo estral y el establecimiento de la preñez y en sueros humanos como posible marcador del síndrome del nacimiento prematuro espontáneo, (subsequent spontaneous preterm birth, SSPB). El objetivo de nuestro trabajo consistió en evaluar la expresión de esta proteína en diferentes tejidos y órganos reproductivos de la vaca. Para ello se obtuvo un péptido recombinante de ITIH4 bovina a partir de un vector de expresión en un sistema procarionota. Luego se purificó y utilizó para desarrollar anticuerpos específicos contra ITIH4 en conejos. Se obtuvieron muestras de sangre bovina, mediante la Cátedra de Obstetricia y Fisiopatología de la Reproducción de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNR, y de órganos reproductivos bovinos, a partir de un frigorífico local, transportadas al laboratorio en frío y procesadas inmediatamente. La presencia de ITIH4 se evidenció por Western-blot en sueros de vacas preñadas (n = 12) y no preñadas (n = 12) obtenidos a los 20, 30 y 40 días post-inseminación. También se observó la presencia de la proteína en ovario, oviducto y cuerno uterino de vacas preñadas y no preñadas (n = 8). Estos resultados concuerdan con la hipótesis planteada a cerca de un posible rol de ITIH4 en la reproducción en bovinos y otros mamíferos y aportan información útil a partir de la cual seguir trabajando en ese sentido.

- 293. (833) DINÁMICA DE LA REACCIÓN CORTICAL EN TIEMPO REAL DE OVOCITOS DE RATÓN**
Cappa A.¹; De Blas G.^{1,2}; De Paola M.¹; Mayorga L.^{1,2}; Michaut M.^{1,3}

Instituto de Histología y Embriología (IHEM)-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo¹; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo²; Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Cuyo³.

La fecundación de un ovocito desencadena la exocitosis de los gránulos corticales (GC), proceso conocido como reacción cortical (RC). Debido a la falta de un marcador específico de GC, no se ha podido estudiar la cinética de la RC. El objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica de la RC en tiempo real en ovocitos activados partenogenéticamente y comparar su cinética entre ovocitos ovulados (madurados *in vivo*) y madurados *in vitro*. Para observar la RC se utilizó la lectina *Lens culinaris*-FITC para teñir el contenido de los GC secretado al espacio perivitelino. Los ovocitos ovulados fueron obtenidos a partir de oviductos provenientes de hembras estimuladas hormonalmente con PMSG y hCG. Para la maduración *in vitro*, los ovocitos fueron colectados a partir de ovarios de hembras estimuladas con PMSG y madurados *in vitro* en medio CZB durante 15 hs. Los ovocitos fueron montados en una cámara conteniendo medio M2 libre de calcio y magnesio y activados partenogenéticamente con cloruro de estroncio en presencia de la lectina. Las imágenes fueron capturadas en un microscopio invertido acoplado con un sistema de iluminación LED y una cámara de alta resolución. Se tomaron imágenes cada 1 min durante 1 h. Los resultados preliminares muestran que el 82% de los ovocitos ovulados reaccionaron a los 10 min; por el contrario sólo el 50% de los ovocitos madurados *in vitro* reaccionaron recién a partir de los 25 min. Además, observamos que la cinética de la RC transcurre de manera gradual y simultánea en los ovocitos ovulados, mientras que en los madurados *in vitro* lo hace de manera abrupta y asincrónica. En conclusión, la cinética de la RC en los ovocitos ovulados es sincrónica y similar en tiempo a la fisiológica desencadenada por la fecundación, mientras que en los ovocitos madurados *in vitro* es asincrónica y tardía. Nuestros resultados muestran por primera vez la dinámica de la RC en tiempo real y revelan que las condiciones de maduración afectan la cinética de la misma.

294. (841) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE COMPONENTES DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR COMO MODULADORES DE LA RESPUESTA A INSULINA EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE BOVINOS CON ENFERMEDAD QUÍSTICA

Hein G.; Panzani C.; Rodríguez F.; Benitez G.; Huber E.; Salvetti N.; Ortega H.; Rey F.
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVET-Litoral)-CONICET, Universidad Nacional del Litoral.

La insulina potencia la esteroidogénesis, el desarrollo folicular y la proliferación de las células de la granulosa y se ha determinado un rol fundamental de los intermediarios de su cascada de señalización para la correcta funcionalidad ovárica. Dado que la enfermedad quística ovárica (COD) bovina se asocia con alteraciones en mecanismos intraováricos, nos propusimos evaluar la expresión génica y proteica del receptor de insulina (IR), de la fosfatidilinositol 3'-OH quinasa (PI3K) y del receptor nuclear activador de la proliferación peroxisomal gamma (PPAR γ) como moduladores locales de la diferenciación folicular y proliferación celular. Se evaluaron muestras ováricas provenientes de animales con COD espontánea e inducida mediante ACTH y de animales en proestro (control). Se utilizaron folículos terciarios pequeños, medianos, grandes, y quistes espontáneos de los cuales se obtuvieron células de la granulosa y de la teca para evaluar por PCR en tiempo real. La expresión proteica se realizó por inmunohistoquímica indirecta sobre secciones de ovarios de los tres grupos. Se determinó una disminución en la expresión génica y proteica del IR en células de la granulosa de quistes y folículos en diferentes estadios de desarrollo provenientes de ovarios de bovinos con COD ($p < 0.05$). En células de la teca se obtuvo el mismo patrón de expresión génica de IR y PI3K, observando un incremento en la expresión en folículos medianos ($p < 0.05$) que no difirió de la expresión en quistes. La expresión proteica de PPAR γ evidenció una disminución en células de la granulosa de quistes y

folículos terciarios de animales con COD inducida ($p < 0.05$) y niveles similares de expresión en la teca. Estos resultados muestran que la expresión de intermediarios de la respuesta a insulina se encuentra disminuida en estructuras foliculares de bovinos con COD, pudiendo afectar mecanismos claves para la funcionalidad ovárica y favorecer el desarrollo de la enfermedad.

INFECTOLOGÍA, INFLAMACIÓN, INMUNOLOGÍA 2

295. (209) UN ANÁLOGO SINTÉTICO DE ESTIGMASTANO CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL QUE MODULA LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

Bueno C.; Michelini F.; Alché L.
Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

La queratitis estromal herpética (QH) es un síndrome inmunoinflamatorio ocular crónico en humanos, inducido por la infección con el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), que puede llevar a la ceguera. El compuesto **1** es un análogo sintético de estigmastano que reduce significativamente la incidencia y severidad de las lesiones de QH en el modelo murino de la enfermedad. A pesar de que el compuesto previene la multiplicación de HSV-1 *in vitro*, el mismo carece de actividad antiviral *in vivo*, por lo que probablemente esté ejerciendo un efecto inmunomodulador en el desarrollo de la patología. Hemos demostrado que el compuesto **1** modula la producción de citoquinas en macrófagos estimulados con LPS. Los receptores tipo Toll (TLRs) 2, 4 y 9 están involucrados en la producción de citoquinas inducida por HSV-1 a través de vías de señalización tales como NF-kB y ERK. Considerando que el compuesto **1** es capaz de modular la respuesta al TLR4 (LPS), decidimos evaluar su efecto sobre la producción de citoquinas estimuladas por ligandos de TLR2 y TLR9 y sobre las vías de señalización NF-kB y ERK desencadenadas por los tres TLRs. Para ello, los macrófagos J774A.1 fueron estimulados con ligandos de TLR2, TLR4 y TLR9 (Pam2CSK4, LPS y ODN2395, respectivamente) y tratadas o no con el compuesto **1**. Se determinó la producción de citoquinas por medio de ELISAs, la fosforilación de ERK por Western Blot y la activación de NF-kB a través de un plásmido reportero. El compuesto **1** redujo la producción de IL-6 y TNF-alfa en células estimuladas con Pam y ODN, tal como se había descrito previamente para el LPS. El compuesto no inhibió la activación de NF-kB, pero sí redujo la fosforilación de ERK. Por lo tanto, proponemos que el efecto inmunomodulador del compuesto **1** observada previamente *in vivo* podría ser consecuencia de la inhibición de la vía de ERK y de la disminución de las citoquinas observadas en los macrófagos activados a través de TLRs.

296. (264) LA INMUNIZACIÓN PARENTERAL CON MICROESFERAS DE QUITOSANO CONTENIENDO LA QUIMERA BLSOMP31 INDUCE LA RESPUESTA HUMORAL Y PROTEGE CONTRA BRUCELLA OVIS EN EL MODELO RATÓN

Díaz A.; Quinteros D.; Llabot J.; Ghersi G.; Palma S.; Allemanni D.; Goldbaum F.; Estein S.
Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Las proteínas recombinantes poseen un gran potencial como antígenos en el desarrollo de vacunas debido a su seguridad y especificidad. Sin embargo, generalmente requieren el empleo de adyuvantes para aumentar su inmunogenicidad. Objetivo: evaluar en el modelo ratón la respuesta inmunitaria humoral y la protección conferida por la inmunización con la quimera BLSomp31 formulada en un nuevo sistema de liberación: las microesferas de quitosano (MEQ) contra *Brucella ovis* (BO). Animales y vacunas. Se inmunizaron ratones BALB/c hembras con A) MEQ+BLSomp31 (n=3) y B) Quil A+BLSomp31 (n=4). Los

controles negativos fueron C) MEQ vacías (n=4) y D) No vacunado (n=4). Los animales recibieron dos dosis (vía subcutánea) los días 0 y 25. Determinación de anticuerpos séricos específicos. Los días 0 y 35 se obtuvieron muestras de suero para su análisis en Elisa indirecto anti-BLSOmp31. Desafío y ensayo de protección. El día 70 los ratones se inocularon por la vía intraperitoneal con $1,6 \times 10^4$ UFC de BO PA76250. Treinta días después se sacrificaron y sus bazos fueron extraídos, homogeneizados y sembrados para determinar las UFC/bazo. Las unidades de protección fueron calculadas como la diferencia entre el promedio de \log_{10} UFC del grupo control (D) y el promedio de cada grupo. Resultados: Sólo se detectaron niveles de anticuerpos IgG significativos en los grupos inmunizados con la quimera BLSOmp31 (Grupos A y B). Las DO promedio \pm D.E. fueron: $2,452 \pm 0,47$, $2,397 \pm 0,34$, $0,128 \pm 0,01$, y $0,123 \pm 0,001$, respectivamente para los grupos A, B, C y D. Los mejores niveles de protección se observaron en los ratones inmunizados con MEQ+BLSOmp31 ($2,41 \pm 0,058 \log_{10}$ UFC de protección) mientras que en el grupo Quil A+BLSOmp31 fueron inferiores ($1,46 \pm 0,297 \log_{10}$ UFC de protección). Conclusión. La formulación MEQ+BLSOmp31 administrada por la vía subcutánea indujo anticuerpos IgG específicos y confirió los mejores niveles de protección. Estos resultados alientan a ensayar dicha formulación en ovinos contra *B. ovis*.

297. (288) EL GENOTIPO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y SU PERSISTENCIA IN VIVO INFLUYEN EN LA HABILIDAD DE INVASIÓN A LA CÉLULA EPITELIAL MAMARIA BOVINA

Pereyra E.^{1,2}; Renna M.^{1,2}; Andreotti C.^{1,2}; Baravalle C.^{1,2}; Calvino L.³; Dallard B.^{1,2}
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral¹; Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVET-Litoral)- CONICET²; Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA)³.

El objetivo del trabajo fue evaluar y comparar la habilidad de invasión de cepas de *Staphylococcus aureus* diferenciadas genéticamente y caracterizadas como de alta y baja adaptación a la glándula mamaria en la línea celular epitelial mamaria bovina (MAC-T). A partir de 40 aislamientos provenientes de tambos de la Provincia de Santa Fe se seleccionaron 12 cepas de baja adaptación a la glándula mamaria (transitorias) aisladas de mastitis clínicas y 21 cepas con alta adaptación a la glándula mamaria (persistentes). Las cepas seleccionadas fueron caracterizadas fenotípicamente por procedimientos estándares y genéticamente utilizando pruebas de electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE). A partir de los dendogramas obtenidos se seleccionaron cuatro cepas con genotipos diferentes, dos de baja adaptación a la glándula mamaria (A y B) y dos de alta adaptación a la glándula mamaria (C y D). Para la selección también se tuvieron en cuenta datos epidemiológicos del rodeo de origen y recuento de células somáticas (RCS) promedio. Las cepas A y C provenían de tambos con baja prevalencia de mastitis por *S. aureus* (<7%) y bajo RCS (<200.000 cél/ml) y las cepas B y D de tambos con alta prevalencia (>40%) y alto RCS (>500.000 cél/ml). En los ensayos de internalización, monocapas de MAC-T fueron infectadas con las cepas seleccionadas utilizando una multiplicidad de infección de 100. Los porcentajes de internalización difirieron entre las cepas evaluadas ($p < 0,05$). Las cepas C y D presentaron los mayores porcentajes de internalización ($8,72 \pm 1,08$ y $11,65 \pm 0,45$, respectivamente), difiriendo en forma significativa entre sí y con las cepas A y B ($p < 0,05$). La cepa A presentó porcentajes de internalización menores ($p < 0,05$) a los de la cepa B con valores promedios de $3,36 \pm 0,61$ y $5,05 \pm 1,12$, respectivamente. Estos resultados preliminares sugieren que la habilidad de invasión de *S. aureus* a las células epiteliales podría reflejar las características de adaptación a la glándula mamaria bovina.

298. (403) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE OLIGOSACARILTRANSFERASA (OST) EN INTESTINO DELGADO EN UN MODELO MURINO DE ESTRÉS SONORO

Rojo J.; Toledo P.; Roux M.; Miranda S.
Instituto de Investigaciones Cardiológicas Prof. Dr. Alberto C Taquini (ININCA)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

En trabajos anteriores se demostró que progesterona modifica el patrón de N-glicosilación de IgG *in vitro* regulando la expresión de isoformas de la subunidad catalítica STT3 de la enzima oligosacariltransferasa a través de un mecanismo dependiente de PIBF (*progesterone induced blocking factor*). Para comprobar si este mecanismo opera *in vivo*, empleamos un modelo de estrés sonoro en ratón que demostró disminuir la concentración sérica de progesterona y de PIBF. Primeramente observamos que el estímulo de estrés sonoro induce inversión en la relación STT3A/Ben el epitelio uterino de hembras CBA/J de 6,5 días de gestación. Seguidamente, demostramos que el estímulo de estrés sonoro induce sobre el intestino delgado importantes daños tisulares e inflamación caracterizada por leucocitosis, aumento de células caliciformes y alta expresión de IL-17, CCL25 y VCAM. En el presente trabajo investigamos la expresión de STT3-A y STT3-B en intestino delgado de hembras CBA/J vírgenes analizando la influencia del estrés sonoro. Para ello los animales se dividieron en grupos control y estrés (300Hz, 70dB durante 24hs) y luego en subgrupos: I-sacrificados post-estrés, II- sacrificados 3 semanas después y III- sometidos a estrés 1 día por semana durante 1 mes. Se aislaron los intestinos delgados y se estudió la expresión de STT3-A y STT3-B en fracción microsomal mediante dot-blot semiquantitativo y western-blot. En condiciones normales por primera vez demostramos que ambas isoformas de STT3 se expresan en intestino delgado, siendo STT3-A la isoforma predominante. Post-estrés se observó incremento en la expresión de STT3-B importante disminución de STT3-A. Las alteraciones histológicas observadas no revierten 3 semanas post-estrés y se agravan sustancialmente por estímulos repetidos. En ambos casos, la inversión en la expresión STT3-A/STT3-B persiste. Se investigará la relación de este efecto con cambios en la glicosilación de inmunoglobulinas presentes en fluido intestinal.

299. (453) ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DEL CALOSTRO DE VACAS INMUNIZADAS CON TOXINA SHIGA TIPO 2 SOBRE LA ACCIÓN DE LA TOXINA EN LINEAS CELULARES DERIVADAS DE RIÑÓN E INTESTINO

Albanese A.¹; Rabinovitz B.²; Galarza R.³; Cataldi A.⁴; Mercado E.²; Ibarra C.¹
Laboratorio de Fisopatología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Patobiología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)²; Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)³; Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)⁴.

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es el patógeno emergente con mayor impacto en los alimentos, siendo su principal reservorio el ganado bovino. La infección en humanos puede ser directa, vía productos cárnicos o lácteos, o indirecta, por la excreción fecal en el medio ambiente. STEC puede causar diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH es endémico en Argentina con una incidencia de 10-15 casos/100.000 niños menores de 5 años, siendo la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica. El SUH está asociado con la actividad citotóxica de las toxinas Shiga tipo 1 y 2 (Stx1, Stx2), siendo *E. coli* O157:H7 el serotipo asociado con mayor frecuencia. El objetivo del presente trabajo fue determinar y caracterizar anticuerpos presentes en el calostro de vacas Holstein inmunizadas con 100 µg/dosis de Stx2 (Phoenix, USA) inactivada 10 min a 75°C, a 40 y 20 días preparto empleando el adyuvante W/O/W ISA206 (Seppic, Francia). Muestras de calostro se recogieron al momento del parto y se deslipidizaron. Se analizó la presencia de anticuerpos IgG anti-Stx2 por Western blot y se determinó la capacidad neutralizante del calostro sobre la acción citotóxica de Stx2 en cultivos de células Vero y HCT-8, derivadas de epitelio renal e intestinal, respectivamente. Los cultivos celulares fueron inocula-

dos con la toxina preincubada durante 1 h con diluciones seriadas de calostro. Se determinó la viabilidad de las células tratadas a las 72 hs mediante la incorporación de Rojo Neutro. El calostro hiperinmune en la dilución 1/1000 fue capaz de neutralizar 1DC₅₀ de Stx2 (DC₅₀: dosis citotóxica que reduce la viabilidad celular al 50%). Se demostró la presencia de anticuerpos IgG específicos anti-subunidad A de Stx2 por Western blot. Los resultados abren la perspectiva de desarrollo de una leche hiperinmune o de cápsulas de calostro para ser usados con nutracéuticos en niños con riesgo de contraer SUH.

300. (489) CARACTERIZACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS POLIOMA MURINO EN CÉLULAS RENALES

Mattioni L.; Sanjuan P.; Sanjuan N.

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El riñón es el órgano del ratón donde el virus Polioma se amplifica antes de ser eliminado por la orina, que es la fuente de su diseminación en la naturaleza en infecciones agudas y en ratones con neoplasias inducidas por el mismo virus. Los mecanismos subcelulares involucrados en este fenómeno son poco conocidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el proceso de replicación de Polioma en cultivos de células renales y en el riñón entero. Se realizaron cultivos primarios de células tubulares renales de ratones C3H Bi/Da en cubreobjetos de vidrio dentro de placas de Petri, con DMEM más 10% de suero fetal bovino, que fueron infectados por la cepa A2 de Polioma con una MOI de 1 ufp/célula. A las 2, 18, 24 y 48 hs post-inoculación (pi), se fijaron sendos cubreobjetos con metanol, y la presencia de la proteína mayor de la cápside viral, VP-1, fue determinada por inmunofluorescencia indirecta, usando como contraste la inmunomarcación de tubulina. Seis ratones de la misma cepa fueron inoculados subcutáneamente con 106 ufp de A2, sacrificados a los 30 días pi, y los riñones procesados histológicamente. La detección de VP-1 se realizó por inmunoperoxidasa. Tanto los cultivos celulares cuanto los riñones fueron estudiados también por ME. A las 18 hs pi, las células infectadas mostraron vesículas intracitoplásmicas positivas para VP-1, que por ultraestructura, no contenían partículas virales. En el riñón entero se observaron también vesículas intracitoplásmicas, pero repletas de virus. Se concluye que: 1. En el ciclo de replicación *in vitro*, Polioma sintetiza VP-1 que luego es acumulada en vesículas intracitoplásmicas, antes de su migración hacia el núcleo, donde ocurrirá el ensamblaje en el tiempo 24 hs pi. 2. Una vez ensamblado, el virus alcanza la superficie celular del riñón migrando dentro de vesículas del sistema de endomembranas. En ningún caso se observó "estallido celular" que es la forma en que –se acepta– son liberados los virus carentes de envoltura.

301. (507) ESTUDIO DE UNA PROTEÍNA TIPO MUCINA, FHMUC, COMO CANDIDATO VACUNAL CONTRA LA FASCIOSIS EN UN MODELO MURINO

Noya V.¹; Brossard N.¹; Rodríguez E.¹; Carmona C.²; Freire T.¹

Facultad de Medicina, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay¹; Instituto de Higiene².

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.

302. (555) PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS CELULARES Y EXTRACELULARES DE CLOSTRIDIUM SEPTICUM POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS (FPLC).

Caliri Ortiz M.; Guerra R.; Villa M.; Cortias T.

Area Microbiología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, San Luis.

Clostridium septicum es el agente causal del edema maligno, enfermedad mortal que afecta a todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre. Para el control de esta enfermedad se emplean vacunas polivalentes clostridiales que incluyen el toxoide de la alfa toxina, considerada el único factor letal y principal antígeno protector de este patógeno. Es bien conocido que el empleo del toxoide, aun a altas concentraciones, no alcanza el 100% de protección. Estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio, indican que otras proteínas antigénicas participan de la respuesta inmuprotectora de *C. septicum*. El objetivo de este trabajo fue separar proteínas antigénicas con posible capacidad inmuprotectora a partir de fracciones celulares y extracelulares de *C. septicum*, mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). Se realizaron cultivos de la cepa de *C. septicum* ATCC 12464 en condiciones anaerobias, separación de las células por centrifugación y posterior precipitación fraccionada de proteínas extracelulares con (NH₄)₂SO₄. Las fracciones fueron dializadas, y un volumen de 1 ml fue sembrado en columna de intercambio aniónico (Resource Q) de 1ml empleando un equipo Akta Prime Plus (GE Healthcare Amersham). Las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en SDS-PAGE. A partir de las fracciones extracelulares precipitadas con 75% y 40% de (NH₄)₂SO₄ y posterior cromatografía de intercambio aniónico se logró purificar una proteína inmunorreactiva de 130 kDa que se identificó por MALDI TOF como piruvato flavodoxina ferredoxina oxidoreductasa y una proteína inmunorreactiva de 76 kDa. A partir de la fracción celular se obtuvo una fracción con la presencia predominante de la proteína de 76 kDa. La purificación e identificación de proteínas antigénicas con capacidad inmuprotectora de *C. septicum*, contribuirá a la formulación de vacunas contra el edema maligno mas protectoras y menos reactivas.

303. (600) CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) COMO POTENCIAL TERAPIA PARA ARTRITIS REUMATOIDEA: ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN DE 2 COMPUESTOS BORADOS EN UN MODELO DE ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO EN CONEJOS

Trivillin V.^{1,2}; Abramson D.³; Bumaguin G.³; Bruno L.³; Garabalino M.¹; Monti Hughes A.¹; Heber E.¹; Feldman S.^{3,4}; Schwint A.^{1,2}

Comisión Nacional de Energía Atómica¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; LABOATEM-Universidad Nacional de Rosario³; CIUNR⁴.

BNCT es una terapia binaria que se basa en la incorporación preferencial de compuestos borados al tejido blanco y la posterior irradiación con neutrones. Se demostró, a nivel experimental y en ensayos clínicos, la eficacia terapéutica de BNCT para diversos tumores, sin radiotoxicidad significativa en tejido normal. Asimismo, se exploran nuevas aplicaciones de BNCT como el tratamiento de artritis reumatoidea (AR) con el objeto de dañar selectivamente la membrana sinovial patológica. El objetivo del presente trabajo

fue poner a punto el sistema de muestreo en un modelo de artritis inducida por antígeno (AIA) en conejos hembras *New Zealand* y realizar estudios de biodistribución de los compuestos borados borofenilalanina (BPA) y decahidrodecaborato (GB-10) para determinar las concentraciones absolutas de boro en el tejido blanco y en los tejidos normales que se desea preservar. Se indujo AIA mediante 2 inmunizaciones sucesivas con emulsión de ovoalbúmina (OVA), (1 mg/ml; 1:1 AFC), intervalo de 15 días, y posteriores inyecciones intra-articulares (ia) con solución de OVA (1 mg/ml) sucesivas, con intervalo de 10 días entre una y otra. A los 50 días de la primer inmunización (ingreso a la fase crónica de la patología inflamatoria inducida), se realizaron los estudios de biodistribución con 4 protocolos: **a)** 0.5 ml de BPA 0.05M (0.26 mg ¹⁰B) **ia b)** 0.5 ml de GB-10 (5 mg ¹⁰B) **ia c)** BPA (15.5 mg ¹⁰B/Kg) **iv y d)** GB-10 (50 mg ¹⁰B/Kg) **iv**. A distintos tiempos post administración (13 a 85 min. para ia y 3 h para iv) se tomaron muestras de tejidos (sangre, membrana sinovial, cartilago, tendón, músculo y piel) para medición de boro por ICP-MS. Los protocolos intra-articulares a tiempos cortos (<40 min.) y el protocolo sistémico con GB-10 presentan valores terapéuticos (>20ppm) en sinovial. Sería de particular interés aumentar la selectividad de incorporación de boro de la membrana sinovial versus el cartilago ya que se espera que el cartilago sea el tejido limitante de dosis.

304. (782) REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS CELULAR POR LA VÍA NTB-A-SAP EN TUBERCULOSIS

Hernández Del Pino R.^{1,2,3}; ,Rovetta A.^{1,2}; Álvarez G.³; Pea D.^{1,2}; Pellegrini J.^{1,2}; Musella R.⁴; Palmero D.⁴; Malbrán A.⁵; Pasquinelli V.^{2,3}; García V.^{1,2}

Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUBICEN-UBA-CONICET¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires³; División Tisiología, Hospital F.J. Muñiz⁴; Unidad de Alergia, Asma e Inmunología Clínica, Hospital Británico de Buenos Aires⁵.

El IFN- γ es clave en la generación de una respuesta protectora en tuberculosis (TB). Previamente reportamos que la expresión de IFN- γ es inhibida por SAP (proteína de unión a SLAM) en correlación directa con una mayor severidad de la enfermedad. Observamos mayores niveles de expresión del ARNm de SAP en respuesta a *M. tuberculosis* (*Mtb*) en pacientes con enfermedad más severa y respuesta inmune disminuida (bajos respondedores-BR) comparado con pacientes altos respondedores (AR) y dadores sanos (DS) ($p < 0.05$). Más aún, la producción de IFN- γ correlaciona inversamente con los niveles de SAP ($r = -0.7217$, $p < 0.0001$). Los pacientes BR restauraron los niveles de IFN- γ luego del bloqueo de SAP con siRNA alcanzando valores similares a los de pacientes AR y DS. SAP posee además un rol esencial en la vía de la molécula coestimuladora NTB-A promoviendo la apoptosis inducida por re-estimulación (RICD). Las células T de individuos XLP (deficientes en SAP) son resistentes a este mecanismo. Nuestros estudios demostraron que NTB-A induce la RICD en pacientes AR y en DS ($p < 0.05$), pero no en BR. Para evaluar los mecanismos involucrados en la inhibición de RICD en pacientes BR, analizamos la proliferación celular, la expresión de IL-2 y de CD25 luego de re-estimulación con CD3/CD28 en pacientes con TB y DS. NTB-A no moduló los niveles de IL-2, CD25 y proliferación celular. Más aún, pacientes XLP presentaron menores niveles de la citoquina pro-apoptótica TNF- γ en comparación a BR, AR y DS, mientras que la menor RICD de los BR no se debe a una regulación diferencial del TNF- γ . Interesantemente NTB-A moduló positivamente el IFN- γ y la IL-17 sólo en células estimuladas con *Mtb* pero no en células re-estimuladas. Estos resultados demuestran que NTB-A induce respuestas pro-inflamatorias durante la activación/diferenciación T y regularía la homeostasis de la respuesta inmune frente a *Mtb* a través de la inducción de la RICD en pacientes AR y DS, pero que la falta de respuesta de pacientes BR no se debe a una RICD incrementada.

305. (789) EVOLUCIÓN DE CEPAS HIV-1 CON TROPISMO X4 Y R5 EN NIÑOS INFECTADOS

Fernández M.¹; Rossi A.¹; Golemba M.¹; Mangano A.¹; Ghiringhelli P.²; Sen L.¹; Alicino P.¹
Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires¹; Universidad Nacional de Quilmes².

El tropismo del virus HIV-1 está definido por el co-receptor que utiliza para ingresar a la célula blanco y esta característica está ligada a la evolución clínica de los individuos infectados y las opciones terapéuticas. In vitro, el tropismo viral puede determinarse mediante el ensayo de formación de sincicios sobre las células MT2, siendo las cepas SI las que usan el co-receptor CXCR4 y las NSI las que usan el CCR5. Dado que el HIV-1 interactúa con sus co-receptores por medio de la glicoproteína de envoltura, las secuencias del gen env del HIV-1 pueden analizarse para predecir el tropismo y caracterizarlo como X4 o R5. El objetivo del trabajo fue estudiar la evolución, frecuencia y diversidad de variantes de HIV-1 con tropismo diferencial en 4 individuos infectados por transmisión vertical que poseían cepas SI y NSI a lo largo del tiempo. Se amplificó y clonó un fragmento del gen env a partir de células mononucleares totales en 3 tiempos de cada individuo. Se secuenciaron 8-10 clones de cada tiempo y se analizaron con los programas PSSM y Geno2pheno para predecir el tropismo viral (X4/R5) y las relaciones filogenéticas entre los clones se evaluaron por Neighbor-Joining con el programa MEGA 5.05. En tres de los niños estudiados se halló una mezcla de poblaciones HIV-1 X4 y R5 en cada tiempo con una frecuencia mayor a un 50% cuando el tropismo caracterizado era SI. En el cuarto caso, a pesar de presentar fenotípicamente variantes NSI y SI, genotípicamente todos los clones en los tres tiempos presentaron variantes R5. Es importante remarcar que al contrario de lo esperado las variantes X4 tempranas y tardías difieren evolutivamente, lo cual sugiere que no presentan un ancestro en común. Estos hallazgos nos indican que es importante mejorar el conocimiento de los determinantes del tropismo del gen env del HIV-1 para el empleo de los métodos predictivos antes de la administración de drogas inhibitoras de los co-receptores.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN 2

306. (20) USO DE UNA MEZCLA DE GOS/FOS® COMO HERRAMIENTA PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD FOSFO-CÁLCICA EN UN MODELO DE CRECIMIENTO NORMAL

Bryk G.^{1,2}; Zeni Coronel M.¹; Daniela Medina D.¹; Gretel Pellegrini G.^{1,2}; Mandalunis P.⁴; Pita Martin de Portela M.³; Zeni S.^{1,2}

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)- CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²; Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires⁴.

Según las últimas encuestas nutricionales la ingesta de calcio (IcCa), en la población general, está por debajo de las recomendaciones diarias internacionales. El aumento de la absorción y/o biodisponibilidad sería una estrategia importante para prevenir sus efectos sobre la masa ósea. La acción de los prebióticos en la absorción y retención mineral es tema de discusión. Se evaluó el efecto de una mezcla GOS/FOS® sobre la absorción y retención de una dieta con bajo aporte de calcio (Ca) en ratas en crecimiento. Al destete, 32 ratas macho Wistar recibieron 1 de 4 dietas isocalóricas (n=8): A1N'93-G con 0.5% y 0.3% Ca (A5 y A3 respectivamente), A5 y A3 conteniendo 5% GOS/FOS® (P5 y P3 respectivamente), hasta los 50 días. Se determinó: semanalmente, ganancia de peso corporal (GPC), desarrollo intestinal de lactobacilos (DL) (en agar MRS) y, al finalizar la experiencia, balance y absorción de Ca y fósforo (P). Al sacrificio se midió peso y pH cecal, contenido y densidad mineral ósea (CMO, DMO) de

esqueleto total (ET) (Lunar DXA), contenido mineral de Femur, volumen óseo (VO), ancho total del cartílago epifisario (Ce) y ancho del cartílago hipertrofico (Ch). No se encontraron diferencias significativas en GPC; el consumo de GOS/FOS® aumentó significativamente el DL ($p<0.0001$), aumentando el peso cecal y disminuyendo el pH, en relación a los grupos que consumieron GOS/FOS® ($p<0.001$). La absorción de Ca y P (mg/d) ($p<0.05$ para ambos), CMO de ET ($p<0.05$), contenido de Ca y P en Femur ($p<0.01$), así como VO, Ce y Ch ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.01$ respectivamente) aumentaron en los grupos que consumieron prebióticos. No hubo diferencias significativas en DMO de ET. Conclusión: los parámetros estudiados del grupo P3 alcanzan los valores del grupo normocalcico sin prebióticos (A5). Esto sugiere que ante una baja ICa, los prebióticos serían una herramienta útil para favorecer la salud ósea. © N.V.Nutricia

307. (90) EVOLUCION DE DIFERENTES MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO ADIPOSO DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN SACAROSA (DRS)

D' alessandro M.; Selencsig D.; Illesca P.; Lombardo Y.
Departamento de Ciencias Biológicas, Cátedra de Química Biológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Se ha sugerido que la administración de una DRS, que conduce a dislipemia e insulino resistencia, favorece la generación de sustancias reactivas del oxígeno e induce estrés oxidativo en diferentes tejidos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar en tejido adiposo (TA) epididimal la actividad de enzimas oxidantes y antioxidantes, contenido de glutatión y los niveles plasmáticos de citoquinas (TNF α , leptina, adiponectina) de ratas alimentadas con una DRS durante 21, 90 y 180 días de ingesta. Ratas machos Wistar de 180-200g se dividieron aleatoriamente en dos lotes: control (DC) y experimental (DRS = 62.5% sacarosa, 8% aceite de maíz). Los animales fueron sacrificados luego de 21, 90 y 180 días de ingesta. En TA se determinaron las actividades enzimáticas de: Xantina Oxidasa (XO), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR), el contenido de glutatión total (GT) y estado redox del glutatión y en plasma los niveles de TNF α , leptina y adiponectina. Resultados: Comparado con DC (6 ratas por grupo) las actividades CAT, GPX y GR disminuyeron significativamente ($p<0,05$) en el TA del grupo DRS en los tres periodos estudiados. La actividad SOD sólo disminuyó ($p<0,05$) a los 90 y 180 días de ingesta de DRS. Por otro lado, en estos animales la actividad XO incrementó ($p<0,05$) a los 90 y 180 días. En DRS se observó una disminución del estado redox del glutatión a los 180 días respecto a DC. Los niveles plasmáticos de TNF α en DRS 180 días fueron significativamente mayores ($p<0,05$), mientras que los niveles de leptina y adiponectina significativamente menores ($p<0,05$) que DC. Los resultados señalan que la DRS induce disfunción del TA epididimal, incrementando las actividades de las enzimas oxidativas y reduciendo las antioxidantes alterando también diferentes citoquinas. Estas alteraciones se profundizan gradualmente con el mayor tiempo de administración de la DRS.

308. (107) EFECTO DE LA INCUBACION CON PIROGALOL, DIETILDITIOCARBAMATO O TIRON SOBRE LA DISFUNCION ENDOTELIAL EN ANILLOS DE ARTERIA PULMONAR OBTENIDOS DE RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO EXPERIMENTAL POR FRUCTOSA

Linares L.; Wallinger M.; Viglione P.; Planells F.; Batan J.; Reyes Toso C.
Departamento de Fisiología y Biofísica, UAI, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La administración crónica de fructosa al 10% (F10%) produce en la rata un cuadro similar al síndrome metabólico (SM). En estos animales se ha descrito una disfunción endotelial tanto en vasos sistémicos como pulmonares con alteración de la vasodilatación endotelio-dependiente (Ved). La misma se produciría por un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno

(aniones superóxido O $_2^-$), con disminución en la formación o incremento de la metabolización del óxido nítrico (ON) producido a nivel endotelial. En este trabajo, se ha evaluado el efecto de la incubación de anillos pulmonares (obtenidos de animales que recibieron F10%), con pirogalol -PIRO-(agente generador de O $_2^-$), dietilditiocarbamato -DETCA- (inhibidor de superóxido dismutasa), Tirón (secuestrador de O $_2^-$). Las ratas se dividieron en dos grupos (n=10 c/u): a) dieta estándar -DE-, b) DE+F10%. A las 20 semanas se sacrificaron y se obtuvieron anillos de arteria pulmonar. Se colocaron en un baño para tejidos en solución de Krebs estándar (KE) y con glucosa -22mM/l- (KG). Después de un período de estabilización se efectuaron curvas acumulativas dosis-respuesta a la fenilefrina (Phe) y acetilcolina (Ach) (10^{-9} - 10^{-4} M) o al nitroprusiato de sodio (NPS) (10^{-10} - 10^{-5} M) sin o con previa incubación con PIRO (50×10^{-6} mol/L), DETCA (10×10^{-3} mol/L) y Tirón (9.4×10^{-3} mol/L). Resultados: ANOVA. La incubación con PIRO y DETCA incrementó la contracción a la Phe (DE $P<0.01$ y DE+F10% $P<0.0001$), DE vs DE+F10% $P<0.05$), mientras que la Ved se redujo (DE $P<0.05$ y DE+F10% $P<0.0001$, DE vs DE+F10% $P<0.01$). El PIRO no afectó la relajación al NPS ($P>0.05$). La incubación con PIRO, DETCA y Tirón previno la alteración de la reactividad de los anillos de ratas con DE y mejoró la de los DE+F10 ($P<0.01$). Estos resultados sugieren que la alteración observada en la Ved estaría vinculada a un incremento en la producción de endógena de ERO $_2$ que provocaría una disminución en la biodisponibilidad de ON.

309. (140) EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LIPOPROTEÍNAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN HEMODIÁLISIS

Cacciagu L.¹; Gonzalez A.¹; Zago V.¹; Demarzianni G.²; Merco T.¹; Brites F.¹; Elbert A.²; Schreier L.¹
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial (CEREHA)²

La enfermedad renal crónica se asocia a inflamación crónica y aterosclerosis. La dislipemia característica consiste en aumento moderado de triglicéridos (TG) y disminución de HDL. Alteraciones cualitativas en las lipoproteínas afectarían su funcionalidad. Objetivo: evaluar la funcionalidad de VLDL y de HDL en pacientes en hemodiálisis (HD). Se estudiaron 15 HD de diversas etiologías y 10 controles sanos (C), de ambos sexos y edad HD: 61 ± 17 años y C: 32 ± 10 ; $p<0,001$. En suero en ayunas se midió perfil lipídico-lipoproteico y actividad de proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP). Se aisló VLDL y se determinó su capacidad como sustrato de lipoproteína-lipasa (LPL) mediante un ensayo de lipólisis *in vitro* incubando con LPL bovina y se calculó la constante Km, inversa a la afinidad. Por otro lado se aislaron LDL y HDL para evaluar *in vitro* el efecto antioxidante de HDL sobre LDL expresado como% de inhibición de la oxidación de LDL. Los resultados se ajustaron por edad. En HD se observó TG aumentados (143 ± 88 mg/dL vs 92 ± 32) y col-HDL disminuido (41 ± 15 mg/dL vs 60 ± 15) $p<0,001$. VLDL en HD presentó mayor contenido en colesterol según índice col/TG (HD: $0,36 \pm 0,10$ vs C: $0,22 \pm 0,11$ $p<0,004$). CETP fue mayor en HD: $247(131-417\% \text{ml/h})$ vs C: $181(92-354)$ $p<0,007$ y se asoció positivamente con col-VLDL ($r=0,33$ $p<0,001$). VLDL en HD presentó menor afinidad por LPL (Km: $4,0 \pm 3,0$ mM) respecto a C ($2,1 \pm 0,9$; $p<0,05$), Km se asoció con el contenido de colesterol en VLDL ($r=0,38$; $p<0,001$). Si bien HDL inhibió la oxidación de LDL en todos los casos, su capacidad antioxidante fue menor en los HD (HD: $22 \pm 23\%$ vs C: 54 ± 33 ; $p<0,05$). Conclusiones: 1-Pacientes en HD presentaron VLDL con menor capacidad de sustrato en la lipólisis, asociado con un enriquecimiento en colesterol inducido por la mayor actividad de CETP. 2-HDL fue menos eficiente en proteger a LDL de la oxidación. VLDL y HDL no sólo alteran su concentración sino también su funcionalidad agravando el cuadro aterogénico.

310. (176) DIETAS CON DIFERENTES FUENTES LIPÍDICAS: CONSECUENCIA SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS SÉRICOS, EN MODELO EXPERIMENTAL

Perris P.; Silva C.; Fernandez I.; Mambrín C.; Slobodianik N.; Feliu M.

Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El perfil de lípidos de la dieta es fundamental en la prevención de las enfermedades crónicas. Objetivo: estudiar el efecto de dietas con diferentes fuentes lipídicas sobre el perfil de ácidos grasos séricos (AG) de ratas en período de crecimiento activo. Metodología: ratas Wistar al destete divididas en 8 grupos fueron alimentadas durante 10 y 40 días con dieta experimental conteniendo 15Kcal lipídicas% aportadas por: manteca (M10 y M40); aceite de oliva (O10 y O40); aceite de girasol (G10 y G40); y aceite de soja (dieta control C10 y C40) y completas en el resto de los nutrientes según recomendaciones internacionales (AIN93). El perfil de ácidos grasos de las dietas se determinó por cromatografía gaseosa (CG). Se calcularon las relaciones $\omega 6/\omega 3$ y AG Insaturados/AG Saturados (AGI/AGS). Al finalizar las experiencias se determinó el perfil de AG en suero por CG. Resultados: Dieta: la relación $\omega 6/\omega 3$ fue: M=5.6, O=49.6, G=250, C=9 y la relación AGI/AGS fue: M=0.7, O=7.33, G=9.2, C=5.5. Suero: los principales AG ($X \pm DS$) son: OLEICO M10:18,18 \pm 1,55*; O10:19,40 \pm 3,36*; G10:8,91 \pm 1,04; C10:10,60 \pm 2,01; M40:19,26 \pm 1,97*; O40:21,33 \pm 2,35*; G40:11,23 \pm 3,78; C40:11,29 \pm 2,27. LINOLEICO (LA) M10:7,70 \pm 1,94*; O10:12,44 \pm 1,85*; G10:19,49 \pm 3,94; C10:19,01 \pm 3,94; M40:5,71 \pm 3,35*; O40:8,40 \pm 0,96*; G40:18,94 \pm 2,76; C40:17,45 \pm 4,11. ALFALINOLÉNICO (ALA) M10:0,37 \pm 0,11*; O10:0,34 \pm 0,06*; G10:0,20 \pm 0,07*; 22 \pm 0,27; M40:0,33 \pm 0,16*; O40:0,35 \pm 0,15*; G40:0,38 \pm 0,12*; C40:0,81 \pm 0,22. (*p<0.01 con respecto a C; Anova-Dunnett). Conclusión: Independientemente del tiempo C10:1, de alimentación, los grupos experimentales M y O presentan en suero disminución de LA y ALA con aumento de ácido oleico. El grupo G sólo presenta disminución de ALA. Las modificaciones observadas en el perfil de ácidos grasos séricos serían consecuencia de la distorsión en el aporte de los principales ácidos grasos por parte de las fuentes. En los grupos M y O se infiere exacerbación de la ruta de la familia $\omega 9$. Financiado UBA N°20020120200068.

311. (241) EN EL SÍNDROME METABÓLICO EXPERIMENTAL POR FRUCTOSA SE OBSERVA UNA ALTERACION DE LA REACTIVIDAD VASCULAR PULMONAR ENDOTELIO-DEPENDIENTE

Torres Batán J.; Linares L.; Reyes Toso M.; Ricci C.; Ponzio O.; Reyes Toso C.

Laboratorio de Reactividad Vascular, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Se ha descrito últimamente que pacientes con diabetes tipo II presentan una mayor prevalencia de hipertensión arterial pulmonar (HAP) no vinculada a otros factores de riesgo. También se conoce que la diabetes gestacional incrementa el riesgo de presentación de HAP en el recién nacido. En ambos casos se ha propuesto que el mecanismo fisiopatológico estaría relacionado con el desarrollo de disfunción endotelial. Teniendo presente que la administración de fructosa al 10% en el agua de bebida (F10%) induce el desarrollo de un cuadro de resistencia insulínica, similar al síndrome metabólico (SM), se decidió estudiar en este modelo la reactividad de arterias pulmonares. Las ratas se dividieron en dos grupos (n=10 c/u): a) dieta estándar -DE-, b) DE+F10%. La dieta se administró durante 20 semanas. Se obtuvieron anillos de arteria pulmonar y se colocaron en un baño para tejidos en solución de Krebs estándar (KE) y con glucosa -22mM/l- (KG). Después de un período de estabilización se efectuaron curvas acumulativas dosis-respuesta a la fenilefrina (Phe) y acetilcolina (Ach) (10^{-9} - 10^{-4} M) o al nitroprusiato de sodio (NPS) (10^{-10} - 10^{-5} M). Otros anillos se incubaron con el inhibidor de la ON sintasa N-Nitro-L-Arginina (NNLA) (10^{-4} M) y se realizaron curvas dosis respuesta a la Ach. Resultados: ANOVA. La F10% aumentó la contracción a la Phe (F= 11.80 P<0.001) y disminuyó la relajación vascular endotelio-dependiente (RVED) a la Ach (10^{-8} P<0.01, 10^{-7} a 10^{-5} P<0.001, 10^{-4} P<0.01). La incubación con NNLA o NPS

no mostró diferencias significativas entre los anillos pulmonares obtenidos de ratas con DE o DE+F10%. La incubación con NNLA de anillos pulmonares de ratas con DE indujo una respuesta contráctil significativamente mayor que la obtenida en anillos de ratas con DE+F10% (P P<0.001). Estos resultados muestran que la dieta con F10% disminuye la RVED en anillos pulmonares por una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico.

312. (262) ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN UN MODELO DE TOXICIDAD CRÓNICA POR COBRE EN HÍGADO Y CEREBRO DE RATA

Musacco Sebío R.; Saporito Magri C.; Semprine J.; Araujo J.; Repetto M.

Cátedra de Química General e Inorgánica, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La acumulación de cobre en cerebro produce daño oxidativo y disfunción mitocondrial. Este metal está involucrado en la etiología y progreso de enfermedades neurodegenerativas, patologías asociadas a disfunción mitocondrial y daño oxidativo. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos tóxicos del Cu en mitocondrias de hígado y cerebro de rata. Ratas macho Sprague-Dawley (150g; 40 días de edad) recibieron Cu(II) en el agua de bebida (0,5g/L) durante 21 días. Se evaluó la funcionalidad mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado y cerebro. Se observaron aumentos significativos en el consumo de oxígeno (ΔO_2) de cubos de 1 mm de arista de cerebro desde los 7 d. de tratamiento (aumento del 85%, control: 507 nmolO₂/min.g) mientras que no se observaron cambios en el hígado. El ΔO_2 mitocondrial con malato-glutamato como sustratos, incrementó 77% y 65% después de 21 d. en los estados 4 y 3 (control: 4,7 y 17,0 ng-atO/min.mg en los estados 4 y 3) en el cerebro, en hígado incrementó el ΔO_2 : 33% en estado 4 y 57% en estado 3 (control: 5,1 y 28 ng-atO/min.mg). Con succinato, solo se encontraron aumentos del ΔO_2 en cerebro, de 79% y 33% (control: 9,5 y 23,9 ng-atO/min.mg en los estados 4 y 3). La actividad del complejo I mitocondrial, en hígado disminuyó un 17% a los 7 d. (control: 140 nmol/min.mg prot), en cerebro disminuyó a los 21 d. un 20% (control: 130 nmol/min.mg). La actividad del complejo II aumentó a los 14 d. en ambos órganos. La actividad de la enzima antioxidante SOD (MnSOD) en mitocondrias disminuyó en cerebro a los 7 d. un 30% (control: 2,6 U/mg), en mitocondrias de hígado, su actividad incrementó desde los 7 d. un 70% (control: 1,8 U/mg). Los efectos tóxicos del Cu en mitocondrias incluyen una inhibición de la actividad del complejo I tanto en hígado como en cerebro. El cerebro es el órgano blanco de la toxicidad del Cu, ya que el ΔO_2 mitocondrial y la actividad de MnSOD se ven más afectados en cerebro que en hígado.

313. (340) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN SISTEMAS BIOLÓGICOS MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Saporito Magri C.1; Almaleck H.1; Musacco Sebío R.1; Semprine J.1; Gordillo G.2; Boveris A.3; Repetto M.1

Cátedra de Química General e Inorgánica, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires1; Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física - (INQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires2; Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires3.

El objetivo de este trabajo es analizar y comparar las respuestas de tres técnicas electroquímicas utilizadas para la determinación de la capacidad antioxidante de muestras obtenidas a partir de tejidos y fluidos biológicos, donde el daño oxidativo es causado por la acumulación de metales. Las técnicas electroquímicas utilizadas son voltametría cíclica (CV), cronoamperometría (CA) y voltamperometría de onda cuadrada (SWV). Las determinaciones de capacidad antioxidante fueron realizadas sobre homogeneiza-

dos de hígado de rata. Los resultados se obtuvieron a partir del análisis de las formas de onda de corriente registradas cuando un potencial oxidativo programado se aplica al electrodo de trabajo inmerso en una celda electroquímica que contiene la muestra. La capacidad antioxidante total de la muestra es una función de la combinación del potencial de oxidación en el medio biológico y la intensidad de la corriente anódica, reflejando esta última la concentración de los componentes. La carga eléctrica (el área bajo la onda) por lo general se correlaciona con la concentración. En el caso de CV y SWV, la existencia de más de un pico es indicativa de la presencia de más de una especie. Por otra parte, cuanto menor es el potencial del pico de oxidación, mayor es la capacidad antioxidante. Trolox fue elegido como un antioxidante de referencia y el método del agregado patrón se empleó con el fin de determinar las concentraciones de los antioxidantes naturales presentes. Las capacidades antioxidantes, expresadas en equivalentes de trolox fueron: 257 mM por voltametría cíclica, 259 mM por voltamperometría de onda cuadrada y 298 mM cronamperometría. Los resultados obtenidos a partir de las tres metodologías son coherentes entre sí, y demuestran la utilidad de estas técnicas para su aplicación en investigación clínica.

314. (420) MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CORTEZA VISUAL Y GLÓBULOS ROJOS EN UN MODELO DE GLAUCOMA EXPERIMENTAL

Reides C.¹; Lasagni Vitar R.¹; Lerner F.¹; Musi Tanuri C.¹; Ferreira S.^{1,2}; Llesuy S.^{1,2}

Cátedra de Química General e Inorgánica¹, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET², Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo fue evaluar el balance oxidativo en corteza visual (CV) y glóbulos (GR) rojos en un modelo de glaucoma experimental. Para llevar a cabo dicho objetivo se determinaron los siguientes parámetros a los 45 días postquirúrgico en homogeneizados de corteza visual izquierda (CVI) y derecha (CVD): quimioluminiscencia espontánea de cerebro (QL); TBARS; capacidad antioxidante total (TRAP), tioredoxina reductasa (TR) y glutatión peroxidasa (GPx). En GR se determinó el contenido de glutatión total (GSH), las actividades de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). 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 obtenidos en corteza visual mostraron: a-un aumento de la QL del 89% en CVI/GG y del 104% en CVD/GG (CVI/GC 1878±210 cpm/mg proteína $p<0,001$, CVD/GC 1617±171 cpm/mg proteína $p<0,001$); b-un aumento de los TBARS del 75% en CVI/GG y del 78% para CVD/GG (CVI/GC 2,74±0,13 pmoles/mg proteína $p<0,001$, CVD/GC 2,58±0,15 pmoles/mg proteína $p<0,001$), c- una disminución de la TR del 34% en CVI/GG y del 54% en CVD/GG (CVI/GC 5,6±0,8 nmol/min.mg proteína $p<0,05$, CVD/GC 6,0±0,5 nmol/min.mg proteína $p<0,001$) y d- un aumento de la GPx del 51% en CVI/GG y del 71% en CVD/GG (CVI/GC 7,1±0,4 nmol/min.mg proteína $p<0,05$, CVD/GC 7,9±0,5 nmol/min.mg proteína $p<0,001$). En GR la actividad de SOD aumentó un 48% en GG (GC 0,92±0,10 U/mg proteína $p<0,01$). El resto de los parámetros evaluados en CV y GR no mostraron cambios significativos. Estos resultados sugieren que las especies activas del oxígeno se encuentran incrementadas en CV en el glaucoma evidenciado por el incremento en la QL y los TBARS. La disminución de la actividad de la TR y el aumento en la actividad de GPx en CV y SOD en GR puede ser una consecuencia del incremento del proceso oxidativo.

315. (482) EFECTOS BENEFICIOSOS DE HARINA INTEGRAL DE AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS SOBRE EL PARÉNQUIMA HEPÁTICO EN RATAS INTOXICADAS CON ALCOHOL

Razzeto G.^{1,2}; López V.^{1,2}; Biaggio V.^{1,2}; Gomez N.^{1,2}; Giménez M.^{1,2}; Escudero N.^{1,2}

Universidad Nacional de San Luis¹; Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO-SL)-CONICET, Universidad Nacional de San Luis².

El etanol afecta a los lípidos y causa estrés oxidativo. Estudios previos en nuestro laboratorio, mostraron que *Amaranthus hypochondriacus* var. *Antorcha* (Ah) produciría en hígado de ratas intoxicadas con alcohol una disminución de colesterol y triglicéridos, reduciendo significativamente colesterol libre ($p<0,05$) y esterificado ($p<0,01$). Nuestro objetivo fue evaluar los cambios morfológicos, especialmente si había infiltración grasa en hígado de rata con los distintos tratamientos y cotejarlo con marcadores bioquímicos de estrés oxidativo, malondialdehído (MDA) y de lesión hepática, aspartato transaminasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP). Se trabajó con 4 grupos de 6 animales cada uno, 2 de ellos recibieron dieta AIN-93M conteniendo caseína como fuente proteica y los otros 2 dieta AIN-93M conteniendo Ah. A su vez, uno de cada grupo proteico recibió etanol al 20% en el agua de bebida, conformando los grupos: control caseína (CC), alcohol caseína (AC), control Ah (CAh) y alcohol Ah (AAh). El tratamiento duró 4 semanas. El estudio histológico de hígado se realizó por microscopía óptica, donde secciones de 5-6 micras de espesor se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE); previa fijación, deshidratación e inclusión. La presencia de macrovacuolas compatibles con depósito de grasa es el cambio histopatológico predominante del presente estudio. Los grupos CC y AC presentaron depósitos grasos con modificaciones estructurales en el parénquima hepático, siendo mayor los cambios en AC. En CAh se visualizó un parénquima hepático normal, sin depósitos grasos o signos degenerativos. AAh exhibió acumulación difusa de lípidos. Pero, al comparar AAh vs. AC, se apreció que amaranto disminuyó el depósito de grasa respecto a caseína. Estos resultados mostraron un efecto hepatoprotector de Ah en comparación a caseína, y en menor medida en relación al consumo de alcohol, siendo congruente con la reducción en AAh vs. AC de MDA (nmol/g tej.) $p<0,05$; de AST (UI/L), $p<0,001$ y de ALP (UI/L), $p<0,05$.

316. (622) AGENTES PORFIRINOGÉNICOS EN UN MODELO MURINO GENÉTICO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE: SU ACCIÓN SOBRE EL METABOLISMO DEL HEMO Y EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Ruspini S.¹; Zuccoli J.¹; Lavandera J.²; Battlé A.¹; Buzaleh A.^{1,3}

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral²; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³.

La porfiria aguda intermitente (PAI) se caracteriza por una disminución de la Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-D) y por ataques agudos con síndrome neuroabdominal. En el modelo de PAI, los ratones knockout son deficientes en la enzima PBG-D (Pbgd^{-/-}, descenso al 30% de la actividad normal). Previamente observamos que la administración de anestésicos volátiles y allisopropilacetamida exacerbaron las alteraciones de la biosíntesis del hemo causada por la mutación (SAIC 2011/2012). El objetivo fue estudiar en este modelo de PAI la acción de otras drogas porfirinogénicas como Veronal (3 dosis de 167 mg/kg) y etanol (30% en el agua de bebida, 1 semana) y el efecto del ayuno (24 horas) sobre el metabolismo del hemo y el sistema de defensa antioxidante. Se realizó un estudio comparativo frente a la mutación: homocigotas (Pbgd^{-/-}) vs heterocigotas (Pbgd^{+/-}, actividad disminuida al 55%), al sexo y a otros tejidos. El etanol indujo 100% y 320% ($p<0,01$) la actividad de la enzima 5-Aminolevulico sintetasa en hígado y riñón respectivamente en los ratones hembras Pbgd^{+/-}; y 180% ($p<0,01$) en hígado del grupo Pbgd^{-/-} hembras. La respuesta de la actividad de la PBG-D hepática frente a esta droga difirió en cuanto al sexo y a la mutación observándose disminución del 45% ($p<0,05$) en los machos Pbgd^{+/-} y en las hembras Pbgd^{-/-}. El veronal no produjo alteraciones adicionales sobre la biosínte-

sis del hemo en los ratones hembras Pbgd +/- . La actividad de Catalasa aumentó 100% ($p < 0,05$) en ratones Pbgd +/- hembras debido al etanol, el cual redujo 22% ($p < 0,05$) los niveles de glutatión reducido (GSH) en machos. Los ratones Pbgd +/- hembras mostraron un descenso en los niveles de GSH sólo en riñón (17%, $p < 0,05$) por efecto del Veronal. En conclusión, los resultados obtenidos, indican que en este modelo los agentes estudiados producen alteraciones adicionales sobre el metabolismo del hemo y además estarían induciendo la instauración de estrés oxidativo independientemente del sexo.

317. (676) LA MODIFICACIÓN TEMPRANA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA NO DISMINUYE LA PÉRDIDA ÓSEA ALVEOLAR INDUCIDA POR ENFERMEDAD PERIODONTAL
Ferreira Monteiro A.¹; Antona M.¹; Gamba A.¹; Mandalunis P.¹; González Chaves M.¹; Zago V.²; Schreier L.²; Macri E.¹
Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

La enfermedad periodontal (EP) se asocia con pérdida ósea alveolar (POA) y dentaria. La inflamación persistente y la infección asociada determinan riesgo aumentado de desórdenes sistémicos, incluyendo ECV. En estudios previos demostramos un efecto sinérgico entre la hipercolesterolemia (hipercol) y EP. **Objetivo:** investigar en ratas hipercol si, a corto plazo, la mejora del perfil lipídico modifica la POA inducida por EP. **Métodos:** Se utilizaron ratas Wistar adultas controles (C, n=10), alimentadas con pellets, o hipercol (HC, n=20). Hipercol se generó con dieta aterogénica (DA) previa a EP. A las 3 semanas HC presentó hipercol (149mg/dL, $p < 0,001$) y se subdividió en: HC (continuó con DA) y HCn3 (reemplazó grasa saturada por aceite de pescado). EP se indujo c/ ligadura del primer molar de hemimandíbula derecha (C+L; HC+L; HCn3+L); el contralateral se usó de control. En 2 semanas los animales se sacrificaron. En suero se midió perfil lipídico (mg/dL): colesterol total (coT), triglicéridos (TG) y colnoHDL. Las hemimandíbulas fueron resacadas. Por radiología (RVG Kodak5100) se midió hueso de soporte periodontal (HSP, % interdental remanente). Luego se procesaron cortes histológicos orientados mesio-distal y colorearon con H&E. En micrografías se evaluó volumen óseo [BV/TV (%)] interradicular. **Resultados:** HC mostró hipercol [coT: 119+16 vs 64+5(C)= 58+9(HCn3) mg/dL; $p < 0,001$]. HCn3 logró disminuir colnoHDL [HCn3: 19+7=20+3(C) vs 69+10(HC) mg/dL; $p < 0,001$] y TG ($p < 0,001$). Sin embargo, HCn3 no pudo impedir la resorción ósea interdental (HSP) en los molares ligados HCn3+L (43+4%) = C+L (42+2%) = HC+L (42+4%) ($p > 0,05$). Según BV/TV (%) la presencia de ligadura y antecedente de hipercol afectaron de igual modo POA C: 53+8 > C+L: 41+1 = HCn3: 37+6 = HCn3+L: 33+6 = HC: 36+6 = HC+L: 39+4, ($p < 0,001$). **Conclusión:** a corto plazo, la mejora del perfil lipídico no permite revertir los efectos deletéreos del colesterol en el metabolismo óseo alveolar. UBA-CyT 20020120200098BA.

318. (691) NIVELES DE VITAMINA D EN INDIVIDUOS CON EXCESO DE PESO
Dupraz H.¹; Gonzalez D.²; Felippoff A.¹; Weisstaub A.¹; Perdomo C.¹; González Infantino C.²; Ro M.¹; Zago L.¹
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires².

Introducción: La vitamina D (vitD) es un nutriente /hormona que se estudia en la actualidad por su múltiple vinculación con varias ECNT particularmente con el exceso de peso. **Objetivos:** Evaluar los niveles de vitD sérica en el inicio del tratamiento de pacientes con sobrepeso u obesidad que concurren a la División Nutrición del Hospital de Clínicas. UBA. **Diseño:** observacional y transversal. **Metodología:** Se estudiaron 56 individuos entre 20 y 75 años, 51 mujeres y 5 varones, 21 con sobrepeso (Sp), 22 con obesidad grado I (Ob1), 7 grado II (Ob2) y 6 grado III (Ob3). Como marcador de estado nutricional se determinó el nivel sérico de 25OH vitamina D por RIA (Diasorin). Asimismo se determinaron peso y talla y se calcularon los valores de IMC (Kg/m²) con los

que se obtuvo la categoría diagnóstica antropométrica según referencias internacionales. La insuficiencia o deficiencia de 25(OH)D total fue definida según los niveles fueran < 30 ng/mL (< 75 nmol/L) ó < 20 ng/mL (< 50 nmol/L) respectivamente. **Resultados:** Los resultados descriptivos de la muestra se presentan en la siguiente tabla como 25(OH)D (ng/mL) por categoría de peso. La variable no mostró distribución normal.

Categoría	Mediana	Q1	Q3	Min.	Máx.	n	Fr %
Sp	28,0	20,0	38,0	14,0	71,0	21	37,5
Ob1	31,5	22,0	41,0	10,0	87,0	22	39,3
Ob2	20,0	19,0	36,0	19,0	36,0	7	12,5
Ob3	26,0	21,0	51,0	12,0	54,0	6	10,7

Las diferencias entre los valores medios para cada categoría fueron no significativas. Se observó también una correlación negativa entre vit D e IMC pero no alcanzó significación estadística. La distribución de los valores de vit D según categoría diagnóstica fue:

25(OH)D (ng/mL)	Categorías	n	Fr %
< 20	Deficiente	13	23
20 - 30	Insuficiente	16	29
> 30	Adecuado	27	48

Conclusiones: no se encontraron diferencias en los niveles de 25(OH)D de las diferentes categorías antropométricas al inicio del tratamiento. Se observó que solo el 48% presentó valores adecuados de este nutriente. (UBACyT CB03)

319. (732) EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA 5-AMINOLEVULINATO SINTETASA EN ANIMALES DIABÉTICOS ES INDEPENDIENTE DE LA VÍA RAF-ERK
Oliveri L.¹; Davio C.²; Batlle A.¹; Gerez E.¹
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

En un modelo de diabetes murina la instauración de la diabetes causa un aumento en la transcripción del ALAS1 vía una caída en la fosforilación (P) de Akt. El tratamiento de los animales diabéticos con vanadato (V), inhibidor de fosfatasa de tiroxinas, activó Akt y revertió el aumento transcripcional del ALAS1. Numerosos estudios han descrito un crosstalk entre las vías PI3K/Akt y Raf/ERK. Akt fosforila Raf causando la inhibición de esta vía. CREB es un blanco río abajo de la vía Ras-Erk 1/2, que también es activado por AMPc y puede unirse a motivos CRE en el promotor del ALAS1. Dado que Akt modula los niveles de AMPc por activación de la fosfodiesterasa 3B, Akt podría estar regulando la expresión de ALAS1 vía CREB a través del control de los niveles de AMPc y/o la modulación de la vía Raf/Erk. El objetivo del trabajo fue determinar la participación de la vía Ras/Raf/Erk, y CREB, en la expresión de ALAS1 en animales diabéticos. Ratones machos CF1 se diabetizaron con una dosis de STZ (170mg/kg ip). Un subgrupo de ratones diabetizados recibió V (STZ+V) (0,2 mg/ml, en el agua de bebida). Otro subgrupo (STZ+I) recibió una dosis diaria de insulina Sigma (5 U/100 g, i.p.) más insulina humana (30 U/100 g, s.c.). A los 32 días de iniciada la diabetes, tanto los niveles del ARNm del ALAS1 como la P Erk 1/2 aumentaron en forma significativa, y fueron revertidos por el V. En el grupo STZ, la P de Akt disminuyó y los niveles de AMPc no se vieron modificados, mientras que en el grupo STZ+I o STZ+V hubo un aumento en la P de Akt acompañado por una caída de AMPc por debajo del control. A pesar de estos resultados, la P de la Ser133 de CREB y los niveles de proteína de la misma se mantuvieron inalterados en todos los grupos. La vía ERK 1/2 y/o los niveles de AMPc no participan vía CREB en el aumento de ALAS1 observado en los animales diabéticos ni en la acción inhibitoria causada por el vanadato y la insulina.

320. (757) SN1 LIPASAS EN EL CATABOLISMO DE LAS LIPO-PROTEÍNAS EN INSULINO-RESISTENCIA. PARTICIPACION DE LA LIPASA ENDOTELIAL COMO NUEVO INTEGRANTE DE LA FAMILIA

Miksztoiwicz V.¹; Billheimer J.²; Lucero D.¹; Zago V.¹; Fernández Machulsky N.¹; Fassio E.³; Rader D.²; Schreier L.¹; Berg G.¹

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica-INFIBIOC. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Inst Translational Medicine and Therapeutics, School of Medicine, University of Pennsylvania, USA²; Servicio de Hepatología, Hospital Muñiz, Buenos Aires, Argentina³.

La lipasa endotelial (LE), pertenece a la familia de las SN1 lipasas, junto con la lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa hepática (LH). Hasta el momento, no se disponía de un método para medir actividad de LE en humanos, desconociéndose su papel fisiológico, su comportamiento en insulino-resistencia (IR) y su acción sobre el perfil lipídico-lipoproteico. Objetivo: evaluar por primera vez LE y LH como fosfolipasas en pacientes con IR, mediante el desarrollo del primer método para la medida de su actividad enzimática. Asimismo evaluar el impacto de la actividad de las tres lipasas sobre las lipoproteínas en un mismo paciente. Sujetos y métodos: en 59 pacientes con síndrome metabólico (SM) y 36 controles sanos se midió perfil lipídico, marcadores de IR y actividad de LPL y LH como triglicérido (TG)-hidrolasa; se diseñó un método cromogénico para medir actividad de LE y LH como fosfolipasas. Resultados: LE estuvo aumentada en el mayor grado de IR ($p < 0,05$), asociada a menores niveles de HDL ($p < 0,01$). LH como TG-hidrolasa fue mayor en IR ($p = 0,025$), asociada a mayor grado de esteatosis ($p = 0,01$) y al predominio de LDL pequeñas y densas ($p = 0,04$). LPL estuvo disminuida en IR ($p < 0,001$) y correlacionó con VLDL grandes y ricas en TG ($p = 0,046$). Adiponectina se relacionó por primera vez con actividad de LE ($r = -0,32$; $p = 0,007$), también con LPL ($r = 0,36$; $p = 0,003$), y LH ($r = -0,28$; $p = 0,024$), condicionando su comportamiento. Conclusión: en IR, el aumento de actividad de LE sería el principal responsable del mayor catabolismo de HDL justificando, en parte, su disminución plasmática. La alteración en la actividad de LE junto con la de LPL y LH inducen modificaciones lipoproteicas asociadas a mayor riesgo cardiovascular. La regulación de la actividad de SN1 lipasas sería un interesante objetivo terapéutico como estrategia para mejorar el perfil lipoproteico y reducir el riesgo cardiovascular en pacientes con IR.

321. (808) ASOCIACIÓN ENTRE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS Y ENFERMEDADES METABÓLICAS

Iglesias Molli A.¹; Bugatto V.¹; Gauto M.¹; Dos Santos P.²; Panero J.²; Villarino J.³; Gonzales C.⁴; Slavutzky I.²; Frechtel G.¹; Cerrone G.¹

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina²; Departamento de Cardiología, FLENI³; Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁴.

Introducción: Las alteraciones metabólicas como Obesidad (OB), Síndrome Metabólico (SM) y Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se caracterizan por presentar un estado de inflamación crónica subclínica de bajo grado, que lleva a un aumento del estrés oxidativo, con el consecuente daño en los telómeros. Objetivo: Determinar la longitud de los telómeros en una población general de acuerdo a la presencia de alteraciones metabólicas. Diseño del estudio: Se reclutaron 220 mujeres de la población general de Venado Tuerto en forma aleatoria, de acuerdo al último censo poblacional. Se agruparon por edad: < 40 ($n = 89$), $41-60$ ($n = 89$) y > 61 ($n = 42$) años; y por fenotipos: Control ($n = 103$), OB ($n = 82$), SM ($n = 57$) y DM2 ($n = 21$). Se determinó la longitud de los telómeros en ADN extraído de sangre periférica por PCR cuantitativa en tiempo real, midiendo por duplicado la relación entre telómeros y copias

simples del gen 36B4 (radio T/S). Los resultados se analizaron por regresión lineal, por test Mann-Whitney y por test apareado Wilcoxon, según corresponda. Resultados: Se verifica un acortamiento de los telómeros con la progresión de edad de la población general ($p < 0,0001$) y en cada uno de los cuatro grupos analizados (control, $p = 0,0035$; casos, $p = 0,0013$; OB, $p = 0,0046$; SM, $p = 0,0336$; DM2, $p = 0,1515$). Además se verificaron diferencias en la longitud de los telómeros al comparar el grupo control con los grupos que presentaron alteraciones metabólicas (control vs casos, $p = 0,0026$; control vs OB, $p = 0,0054$; control vs SM, $p = 0,0017$; control vs DM2, $p = 0,0239$), e intra-grupos (OB vs DM2, $p = 0,0146$; SM vs OB, NS; SM vs DM2, $p = 0,0111$). Conclusiones: Los resultados obtenidos en los diferentes grupos etáreos confirmaron que la metodología utilizada fue adecuada para el estudio de la longitud de los telómeros. Se ven diferencias significativas al comparar la longitud de los telómeros en pacientes con alteraciones metabólicas respecto a los controles.

ONCOLOGÍA 2

322. (25) CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE VARIANTES DE SPLICING DE ARHGAP44 EN CÉLULAS DE CÁNCER COLORRECTAL

Trasci S.¹; Arriaga J.²; Rocca Y.²; Ruiz M.¹; Mordoh J.²; Bianchini M.¹

Centro de Investigaciones Oncológicas FUCA¹; Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET, CABA².

Los tumores colorrectales (CRC) se originan a partir de pólipos adenomatosos tras una serie de alteraciones genéticas que contribuyen al desarrollo de este cáncer. El gen ARHGAP44 codifica para la proteína RICH-2 que pertenece a la subfamilia de las Rho-GAP, un grupo de proteínas que regulan Rho, Rac y Cdc42. Mediante qRT-PCR de muestras microdisecadas de tejido tumoral y mucosa adyacente de 6 pacientes con CRC, observamos que la expresión de ARHGAP44 se encuentra significativamente disminuida en el tejido tumoral ($p < 0,01$). Interesantemente, la cuantificación de ARHGAP44 en 5 líneas celulares de CRC, nos indicó que en las K-RAS wild type (CACO-2 y HT-29) la expresión de ARHGAP44 era 100 veces menor con respecto a las K-RAS mutadas (HCT-116, DLD-1, T84). Además, por RT-PCR y secuenciación observamos la existencia de diferentes isoformas de splicing de ARHGAP44, una de ellas, presentando la delección de 2 exones (17 y 18) y la inserción de 52 nt entre los exones 20 y 21, no había sido todavía reportada (ARHGAP44-a). Esta observación fue confirmada por qRT-PCR mediante primers específicos en líneas celulares y en muestras de biopsias tumorales. No obstante, la cuantificación relativa de ARHGAP44-a no mostró diferencias significativas entre tejido tumoral y normal. Debido a que la inserción mencionada, produce un stop-codon prematuro que podría inducir Nonsense Mediated Decay (NMD) evaluamos los niveles de expresión de ARHGAP44-a por qRT-PCR en HT-29 y DLD-1 tratadas con cicloheximida, pero no encontramos cambios significativos. En CRC las mutaciones en el gen K-RAS tienen valor predictivo de respuesta al tratamiento con Cetuximab; sin embargo no todos los pacientes con K-RAS wild type son sensibles al mismo, sugiriendo que otras vías podrían estar alteradas. Nuestros resultados sugieren que la subexpresión de ARHGAP44 podría representar uno de estos mecanismos. Además, la resistencia a NMD de ARHGAP44-a, podría favorecer la acumulación de esta isoforma mutada.

323. (49) ALTERACIONES EN LA ADHESIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES SOMETIDAS A LA TERAPIA FOTODINÁMICA EMPLEANDO FOTOSENSIBILIZANTES DE USO CLÍNICO

Calvo G.¹; Saenz D.¹; Casas A.¹; Simian M.²; Sampayo R.²; Mamone L.¹; Vallecorsa P.¹; Batlle A.¹; Di Venosa G.¹
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires².

En la Terapia Fotodinámica (TFD) se administran fotosensibilizantes (FSs) que al irradiarlos desencadenan reacciones que

destruyen el tumor. La TFD restringe el daño a la zona tumoral, puede combinarse con otras terapias y emplearse luego de ellas. Verteporfina (Verte), ácido 5-aminolevulínico (ALA) que induce la acumulación de Ptoporfirina IX y Merocianina 540 (MC540), son FSs de uso clínico. Un 20-30% de los tumores tienen mutaciones en Ras que contribuyen al fenotipo maligno. El oncogén H-Ras confiere resistencia a la TFD independientemente del FS, por lo que hemos estudiado una línea de adenocarcinoma mamario que sobreexpresa la proteína Ras (HB4a-Ras), luego de recibir 1, 2 y 3 tratamientos de TFD empleando ALA, Verte y MC540, con el objetivo de conocer qué efectos provoca la terapia sobre las células remanentes. La sucesión de tratamientos ha generado una ligera resistencia a la TFD siendo significativa en el tercer tratamiento ($P < 0,05$). La dosis lumínica letal 50 de la línea HB4a-Ras con ALA es de 50 mJ/cm² y luego de 3 tratamientos de 120 mJ/cm², con Verte pasó de 44 a 77 mJ/cm² y con MC540 de 17 a 24 mJ/cm². No se modificó la incorporación de los FSs, ni la tasa de crecimiento celular, pero se observaron diferencias morfológicas, de adhesión y de interacción celular. Las capacidades migratoria (ensayo con herida) e invasiva (Matrigel en transwells) disminuyeron con la sucesión de tratamientos. Las metaloproteasas 2 y 9, modificaron su expresión, MC540 mostró una disminución mayor al 50% desde el primer tratamiento. Podemos concluir que el ligero aumento de la resistencia hace que se conserve la efectividad de la TFD y como las características invasivas y migratorias se ven disminuidas, las células remanentes de los tratamientos serían menos metastásicas, especialmente las sometidas a MC540, siendo una excelente opción para aplicación post operatoria o en combinación con otros tratamientos, con el fin de disminuir la diseminación celular.

- 324. (61) GALECTINA-8 Y SU LIGANDO CD166: INTERACCIONES EN LA PROGRESIÓN DEL CARCINOMA MAMARIO**
Ferragut F.¹; Cárdenas Delgado V.¹; Nugnes L.¹; Bravo A.²; Nuez M.³; Troncoso M.¹; Espelt M.¹; Rabinovich G.⁴; Wolfstein-Todel C.¹; Malchiodi E.⁵; Fernández M.⁵; Elola M.¹
Instituto de Química y Fisiología Biológica (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Hospital Interzonal General de Agudos Eva Perón²; Cátedra de Bioestadística, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET⁴; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁵.

Las galectinas son lectinas que unen β-galactósidos capaces de descifrar información codificada en los glicanos de superficie celular y matriz extracelular. Galectina-8 (Gal-8) posee dos dominios de reconocimiento de carbohidratos en "tandem". Recientemente, identificamos a CD166/ALCAM como ligando de Gal-8. Nuestros objetivos fueron: 1) analizar la localización subcelular de Gal-8 y de CD166 en diferentes estadios del carcinoma ductal mamario humano; 2) evaluar la localización de ambas moléculas en líneas celulares mamarias; 3) aislar CD166 endógeno de células tumorales mamarias y evaluar su interacción con Gal-8. En tejidos mamarios -mediante inmunohistoquímica-, Gal-8 presentó un descenso significativo ($p < 0,05$) en la localización nuclear en las células epiteliales concomitante con aumento significativo ($p < 0,05$) de la localización citoplasmática a lo largo de la progresión del carcinoma ductal. Respecto a la expresión de CD166 en células epiteliales de los tejidos, la localización superficial y citoplasmática se mantuvo constante conforme estos tumores progresan. En las líneas celulares, se encontró co-localización de Gal-8 y CD166 en el citoplasma, mediante inmunocitoquímica. Mediante inmunofluorescencia en células MDA-MB-231 no permeabilizadas e incubadas con Gal-8 exógena, dicha lectina se halló asociada a la superficie celular, co-localizando con CD166. CD166 de estas células fue purificado mediante cromatografía de afinidad en proteína A/anti-CD166. La interacción de CD166, tanto recombinante como endógeno, con Gal-8 se evaluó mediante resonancia magnética de superficie. Se detectó una interacción específica glicano-dependiente de Gal-8 tanto con CD166 hiperglicosilado

comercial ($K_D = 1,09 \times 10^{-7}$ M, método cinético) como con CD166 endógeno ($K_D = 4,2 \times 10^{-6}$ M, método cinético). Concluyendo, Gal-8 y CD166 se expresan tanto en tejidos como en líneas celulares mamarias. Además, Gal-8 y CD166 endógeno interactúan en forma directa glicano-dependiente.

- 325. (145) ESTUDIOS IN VITRO DEL PÉPTIDO CIGB-300 INHIBIDOR DE LA ENZIMA CASEIN KINASA CK2**
Benavent F.¹; Perera Y.²; Perea S.²; Alonso D.¹; Gomez D.¹; Farina H.¹
Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina¹; Centro de Ingeniería Genética Biotecnología, La Habana, Cuba².

Previamente hemos demostrado que el péptido cíclico CIGB-300 (P15-Tat) fue capaz de inhibir la fosforilación de la enzima Casein Kinasa CK2 mediante la unión directa al sitio conservado fosfoceptor de sus sustratos. En diferentes estudios el CIGB-300 fue capaz de inhibir la proliferación de células tumorales in vitro y reducir el crecimiento tumoral en diferentes modelos animales. En estos estudios, el CIGB-300 mostró un efecto antiproliferativo diferencial en líneas celulares tumorales, encontrando células con alta- ($IC_{50} \leq 100 \mu M$) y baja-sensibilidad ($IC_{50} \geq 100 \mu M$). En este trabajo, se estudiaron los mecanismos de sensibilidad y resistencia basados en el ingreso, vehiculización y degradación del péptido CIGB-300. Para ello se determinó el mecanismo de internalización del péptido CIGB-300 en células tumorales mediante técnicas de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Se encontró que los proteoglicanos de heparán sulfato presentes en la membrana plasmática actúan como receptores para la captación del CIGB-300. Por otro lado se evidenció una mayor incorporación intracelular del CIGB-300 en las células con alta-sensibilidad (H-125 y HL-60), en comparación con baja-sensibilidad (3LL, A-549, PC-3 y Hela). Se demostró que el CIGB-300 tiene la capacidad de internalizarse por translocación directa de la membrana en un proceso independiente de energía. Sin embargo, una proporción menor del péptido utiliza mecanismos endocíticos dependientes de energía para ingresar en las células. Por esa razón se estudiaron las posibles vías de tráfico intracelular del CIGB-300 utilizando marcadores endosomales (caveolas/clatras). Además, se comprobó que los lisosomas participan en la degradación del CIGB-300. Nuestros datos sugieren un mecanismo por el que el CIGB-300 es internalizado, vehiculizado y degradado en las células tumorales. Estos datos muestran que los mecanismos evaluados podrían determinar la resistencia y sensibilidad hacia el péptido CIGB-300.

- 326. (166) EL TRATAMIENTO COMBINADO CON EL GEN IFN-B Y BORTEZOMIB INDUCE APOPTOSIS EN MONOCAPAS Y REVIERTE LA RESISTENCIA MULTICELULAR EN ESFEROIDES DE LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA**
Rossi U.; Finocchiaro L.; Glikin G.
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

La terapia génica con IFN-B permitiría una administración continua de bajas dosis de esta citoquina, lo que evitaría su toxicidad sistémica sin afectar su eficacia antitumoral. El inhibidor proteosomal bortezomib (BTZ) es un tratamiento aprobado para el mieloma múltiple, pero no resultó efectivo en fases clínicas para melanoma. Nos propusimos evaluar la efectividad del tratamiento combinado con el gen IFN-B y una dosis sub-farmacológica de bortezomib (5nM) en líneas celulares de melanoma. Se utilizaron dos líneas de melanoma humano (A375 y SB2) y una línea de melanoma mucoso canino (OI). El BTZ fue agregado 24h luego de la lipofección con los genes B-gal o IFN-B específico, salvo en los ensayos de viabilidad en los cuales fue agregado a las 48 h. La lipofección con el gen IFN-B produjo una disminución de la concentración inhibitoria 50 del BTZ en las tres líneas evaluadas ($p \leq 0,01$); el tratamiento combinado con el gen IFN-B y BTZ (5 nM) provocó una disminución de la viabilidad celular mayor al efecto de los dos tratamientos individuales tanto en monocapas como esferoides ($p \leq 0,01$); en esferoides de A375 se observó un efecto de resistencia, en comparación a la sensibilidad de las

monocapas, al gen IFN-B pero no al tratamiento combinado. La combinación IFN-B/BTZ produjo un efecto de potenciación en el aumento de ROS intracelular (H2DCF-DA) en SB2 y OI ($p \leq 0.01$); y al agregar el antioxidante L-NAC se inhibió el efecto de potenciación del tratamiento combinado sobre la citotoxicidad ($p \leq 0.05$). Sólo el tratamiento combinado fue capaz de inducir apoptosis ($p \leq 0.05$). Al evaluar la migración celular de monocapas de OI mediante el ensayo de "cicatrización de la herida", el agregado de BTZ potenció el efecto inhibitorio del gen IFN-B ($p \leq 0.05$). El tratamiento combinado del gen IFN-B y el BTZ resultó más efectivo que los tratamientos individuales en todos los parámetros analizados. Una dosis baja de bortezomib aumentaría la sensibilidad del melanoma al IFN-B.

327. (215) LOS COMPUESTOS QUE PROVOCAN DAÑO EN EL ADN Y/O ESTRÉS OXIDATIVO REGULAN LA TRANSCRIPCIÓN DE HO-1 EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Labanca E.¹; De Luca P.^{1,2}; Zalazar F.^{1,2}; Moiola C.^{1,2}; Cognitiona J.¹; Vázquez E.¹; De Siervi A.^{1,2}

Laboratorio de Inflamación y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET².

La enzima antioxidante y anti-inflamatoria Hemo oxigenasa 1 (HO-1) es responsable del mantenimiento de la homeostasis celular y se encuentra involucrada en la tumorigénesis prostática. Actualmente se la considera un blanco atractivo para el tratamiento de distintas patologías, incluyendo el cáncer. El promotor de HO-1 posee sitios ARE (elementos de respuesta a estrés), sin embargo se sabe muy poco acerca de su regulación transcripcional. Previamente demostramos que la sobreexpresión del supresor tumoral BRCA1 induce la expresión de HO-1 en líneas celulares de cáncer de próstata y en un modelo murino de xenotransplantes de próstata. En este trabajo nos propusimos analizar la regulación de HO-1 en respuesta a diferentes agentes genotóxicos y oxidantes en el cáncer de próstata. Para ello utilizamos un panel de compuestos: Grupo 1) inductores de daño en el ADN: etopósido y mitoxantrona; Grupo 2) inductores de estrés oxidativo: H₂O₂; Grupo 3) inductores de efectos combinados: doxorubicina; y Grupo 4) inductores de otros efectos: metotrexato. Los resultados mostraron que los compuestos del grupo 1 reprimieron significativamente la transcripción de HO-1, mientras que los compuestos del grupo 2 y 3 indujeron la transcripción de HO-1. Los compuestos del grupo 4 no afectaron la expresión de HO-1. Finalmente, los tumores crecidos como xenotransplantes derivados de la línea PC3 en ratones nude que fueron tratados o no con doxorubicina, mostraron que este agente indujo la expresión de HO-1 *in vivo*. En conclusión, la expresión de HO-1 es modulada por diversos agentes genotóxicos y oxidantes, así como también por reguladores transcripcionales como BRCA1. Esta regulación impactaría sobre el mecanismo de defensa para mantener la homeostasis celular. Estudios posteriores nos permitirán determinar la relevancia de estos hallazgos para la terapia o pronóstico del cáncer de próstata.

328. (228) EFECTO DE LA ACTIVACIÓN COLINÉRGICA SOBRE LA AGREGACIÓN CELULAR Y LA FORMACIÓN DE ESFEROIDES EN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE CÉLULAS DE MAMA HUMANA

Martinez P.; Pimentel J.; Ariolfo L.; Dmytrenko G.; Lombardi M.; Sales M.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Buenos Aires.

Demostramos que los receptores muscarínicos (RM) se sobreexpresan en células tumorales MCF-7 derivadas de un adenocarcinoma mamario humano estrógeno-dependiente, mientras que están ausentes en células no tumorigénicas mamarias humanas MCF-10A. La activación de los RM promueve la progresión tumoral. Para determinar el rol de los RM en la oncogénesis mamaria, transfectamos establemente células MCF-10A y obtuvimos 3 clones, que expresan diferentes subtipos de RM: M₃,

M₄ o M₃-M₄ (MCF-10A-M). Utilizando como modelo el cultivo tridimensional (esferoides) (volumen en mm³±DS) *in vitro* que simula las primeras etapas del crecimiento de tumores sólidos *in vivo* y comparamos la capacidad de agregación celular y el crecimiento tridimensional de los clones mencionados con el de las células MCF-7 que expresan receptores M₃ y M₄. Se observó que la línea celular MCF-10A (control) formó inicialmente agregados celulares laxos que sobrevivieron menos de 5 días en cultivo, sin formar esferoides. Las células MCF-7 formaron agregados y el tratamiento con el agonista colinérgico carbacol (CARB 10⁻⁹M) incrementó la sobrevivencia celular hasta el día 20 e indujo la formación de estructuras tridimensionales irregulares. Las células MCF-10A-M₃-M₄ formaron agregados que sobrevivieron en cultivo hasta el día 30. El tratamiento con CARB indujo la formación temprana de esferoides con un alto índice de compactación que sobrevivieron hasta el día 30 en cultivo (0.167±0.06). Las células MCF-10A-M₃ formaron agregados compactos y a los 15 días en cultivo formaron esferoides; el tratamiento con CARB incrementó el tamaño de los esferoides (0.18±0.058) con respecto al control (0.11±0.06) (n=5). Las células MCF-10A-M₃ formaron agregados celulares laxos que sobrevivieron hasta el día 16 en cultivo; el CARB se indujo la formación de esferoides después de 15 días en cultivo que sobrevivieron hasta el día 30 en cultivo (0.12±0.06). Concluimos que la presencia del receptor M₃ en las células transfectadas es una condición suficiente para la formación de esferoides, mientras que la estimulación con CARB potencia la formación y el crecimiento de esferoides en las células transfectadas en comparación con el control.

329. (236) EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA CTBP1 POR DIETA ALTA EN GRASA SOBRE LÍNEAS TUMORALES MAMARIAS

De Luca P.^{1,2}; Dalton N.^{1,2}; Moiola C.^{1,2}; Zalazar F.^{1,2}; Flumian C.³; Kordon E.²; Meiss R.³; Todaro L.⁴; Vázquez E.²; De Siervi A.^{1,2}

Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET¹; Laboratorio de Inflamación y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, QUIBICEN-CONICET²; Academia Nacional de Medicina³; Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires⁴.

El sobrepeso y la obesidad están asociados con el alto grado de tumores de mama. C-terminal Binding Protein (CtBP1) es un co-represor de genes supresores tumorales, entre los que se encuentra E-caderina. En base a esto ha sido implicado en la regulación del proceso de transición epitelio mesenquimal. Además, CtBP1 actúa como un sensor molecular del estado metabólico celular debido a que es activado en condiciones de alta energía (alto NADH). En este trabajo estudiamos los efectos de la activación de la vía de CtBP1 por una dieta alta en grasa (DG) sobre el desarrollo tumoral mamario. En primer lugar, generamos un modelo murino (hembras C57black) en el cual indujimos la aparición de un síndrome metabólico luego de alimentarlos con dieta DG durante 16 semanas. La histología mamaria de los ratones reveló mayores niveles de tejido adiposo inmaduro en los animales alimentados con esta dieta respecto a los que recibieron la dieta control (DC). Utilizando la técnica de montaje completo de mamas observamos que la DG aumentó la ramificación lateral de los conductos mamarios. Además, la línea celular murina LM8-LP, que expresa elevados niveles basales de CtBP1, fue incubada con el suero de los animales alimentados con dieta grasa (SDG) o control (SDC) y se evaluó la formación de mamosferas primarias. El SDG aumentó el número de mamosferas de LM8-LP con respecto al control (SDC). Debido a que la línea tumoral humana MDA MB 231 posee altos niveles de CtBP1, generamos líneas celulares estables con expresión disminuida de esta proteína y su respectivo control. Encontramos que el silenciamiento de CtBP1 disminuyó significativamente la expresión de los marcadores mesenquimales Vimentina y Slug con respecto a los controles. Finalmente, incubamos estas líneas estables con SDG o SDC y encontramos

que el SDG restituyó los niveles de expresión de los marcadores mesenquimales. Estos hallazgos sugieren que la activación de la vía de CtBP1 por DG es relevante en la diferenciación mamaria.

330. (259) ROL DEL POTENCIAL DE MEMBRANA Y LA REDUCCIÓN DE LA MASA MITOCONDRIAL EN EL ANTAGONISMO TOA+MG132 EN CÉLULAS DE LINFOMA DE BURKITT

Lombardo T.²; Cavaliere V.¹; Papademetrio D.¹; Costantino S.¹; Álvarez E.¹; Blanco G.²

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; LAITO-IDEHU-CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires².

El trióxido de arsénico (TOA) induce despolarización mitocondrial y un incremento del stress oxidativo. Las mitocondrias con bajo potencial de membrana (PMM) son una fuente de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) dañinas para la célula. La eliminación de las mitocondrias en falla resulta en cambios de la masa mitocondrial (MM) y es reconocida como un mecanismo de resistencia a drogas antitumorales al eliminar la fuente de producción de ROS. Mediante este mecanismo, las células cancerosas pueden escapar a señales de muerte inducidas por drogas cuyo blanco de acción es la mitocondria. Nuestro grupo estudió previamente el efecto citotóxico de TOA+MG132 en la línea celular Raji (linfoma de Burkitt) y U937 (leucemia promonocítica) y demostró antagonismo y sinergismo respectivamente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta diferencial de ambas líneas frente al tratamiento TOA+MG132 en cuanto a cambios en el PMM y la MM. Para evaluar el PMM se utilizó la sonda TMRE en ensayos de citometría de flujo. La determinación de la MM se realizó por microscopía de fluorescencia con la sonda Mitotracker-Red y posterior procesamiento digital de imágenes. Resultados: TOA+MG132 generó pérdida del PMM (20%) y aumento de la MM luego de 24hs en U937 ($p < 0.001$), en cambio, en Raji no alteró el PMM (3%) pero sí generó una reducción de la MM ($p < 0.001$). ATO produjo despolarización mitocondrial en U937 (33%) con aumento de la MM ($p < 0.01$) pero en Raji no alteró el PMM ni la MM ($p > 0.05$). G132 no generó despolarización en Raji ni en U937 (1% y 1,5% respectivamente) y redujo la MM en Raji pero no en U937 ($p < 0.01$ y $p > 0.05$ respectivamente). Conclusiones: El sinergismo TOA+MG132 en U937 está asociado a un aumento de la masa mitocondrial y reducción de PMM. El antagonismo observado en Raji se asocia a una disminución de la masa mitocondrial sin efecto sobre el PMM lo que podría deberse a una eliminación selectiva de las mitocondrias cuyo PMM se ve afectado por el tratamiento.

331. (265) LA INHIBICIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO: UNA BUENA MODALIDAD TERAPÉUTICA PARA TUMORES DE VEJIGA QUE EXPRESAN iNOS

Belgorosky D.; Langle Y.; Prack Mc Cormick B.; Colombo L.; Sandes E.; Eijjan A.

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

Introducción: El cáncer de vejiga (CaV) es la segunda causa de muerte por tumores urológicos en el hombre. Cuando la lesión no invade el músculo, la resección transuretral puede ser curativa, sin embargo el 50% de los pacientes presentará recurrencias y un 30% de ellos progresarán hacia un estadio invasor, poniendo en riesgo la vida del paciente. El óxido nítrico (NO) es un radical libre altamente reactivo producido por un grupo de enzimas denominadas NO sintasas (NOS). Nuestro grupo reportó que 50% de los pacientes con CaV expresan la enzima NOS inducible (iNOS), asociada a un peor pronóstico, como invasión y menor tiempo libre de enfermedad. Planteamos la hipótesis de que la modulación de la producción de NO en tumores que expresan iNOS podría ser un potencial blanco terapéutico. **Objetivo:** Estudiar *in vitro* e *in vivo* la relevancia biológica de la inhibición de la producción de NO en un modelo murino de CaV. **Resultados:** *In vitro*, el tratamiento con L-NAME (2mM), inhibidor de NO, redujo el crecimiento celular ($p < 0.001$) (MTS), asociado con una disminución de la vía de las MAPK, los niveles de NO (Griess) y

expresión de iNOS (Western Blot) en las líneas MB49 y MB49-I, sin afectar a la línea MBT2 que no expresa iNOS. La actividad de enzimas proteolíticas y la capacidad migratoria (zimografía y migración en herida) fueron inhibidas únicamente en la línea invasora, MB49-I ($p < 0,01$; $p < 0,001$). *In vivo*, el L-NAME en el agua (0.1g/kg ratón) inhibió el crecimiento de tumores MB49 y MB49-I ($p < 0,05$; $p < 0,001$), disminuyó la expresión de iNOS, los niveles de nitrato en orina ($p < 0,05$; $p < 0,001$), la capacidad angiogénica ($p < 0,001$). También inhibió la formación de metástasis pulmonares solo en los tumores invasores MB49-I ($p < 0,01$). Ninguno de estos parámetros se vio afectado en tumores MBT2. **Conclusión:** La inhibición de la producción de NO podría ser un potencial blanco terapéutico en pacientes con CaV, cuyos tumores expresen iNOS.

332. (297) EFICACIA DE TRES ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA (QTM) CON CICLOFOSFAMIDA (CY) Y METFORMINA (MET) EN EL TRATAMIENTO DEL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO M-406

Basualdo J.; Capello Gardenal M.; Asad A.; Micheletti L.; Perroud H.; Rico M.; Rozados V.; Scharovsky G.

*Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹. *Contribuyeron igualmente*

La QTM consiste en la administración crónica de fármacos a intervalos regulares y sin periodos de descanso. Anteriormente, estudiamos 3 esquemas de QTM combinando un agente alquilante (Cy) que modularía la respuesta inmune antitumoral y uno hipogluceante (Met) que actuaría a través de inhibición de la angiogénesis, estimulación de la apoptosis y eliminación de las células madre del cáncer. Se administró: I) Cy p.o. (20-30 mg/kg por día en agua de bebida) + Met p.o. (100 mg/kg, 3 veces/semana); II) Cy (idem) + Met p.o. (100 mg/kg, 5 veces/semana); III) Cy (idem) + Met p.o. (150 mg/kg, 3 veces/semana) a ratones endocriados CBI portadores de M-406 cuando el tumor medía 100 mm³. Nuestro objetivo fue comparar la eficacia antitumoral obtenida previamente y la toxicidad de la QTM con los tratamientos I, II y III. Se analizó: efecto antitumoral, tiempo de duplicación (Tdup), supervivencia, glicemia (G) y peso corporal (PC). El% de reducción del volumen tumoral [mediana (rango), I: 92,4 (69,6-98,3), II: 84,3 (64,9-96,8), III: 83,1 (69,9-93,4)], así como el Tdup del tamaño tumoral [días, mediana (rango), I: 5,8 (5-6,6), II: 5,2 (3-6,8), III: 6 (3,8-7,7)] y el% de aumento de la supervivencia [mediana (rango), I: 57,1 (38,2-63,3), II: 52,9 (10,8-68,1), III: 33,8 (10,8-68,1)] respecto del grupo testigo sin tratamiento, no presentaron diferencias entre grupos (ANOVA no paramétrico, n.s.). La toxicidad medida por G y PC al final del experimento respecto del valor inicial de cada animal no difirió dentro de grupos (test *t* de Student, n.s.). Los tres tratamientos carecieron de toxicidad y su efectividad fue similar. Sin embargo, el tratamiento I presentó la mayor reducción del volumen tumoral y el mayor aumento de la supervivencia. Dado que se prefiere administrar dosis menores y con menor frecuencia, al tener en cuenta la calidad de vida del portador del tumor, el tratamiento de Cy + Met (100 mg/kg, 3 veces/semana) es el que se elegiría para una posible traslación a la clínica.

333. (307) ESTUDIO DEL MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR DE GPC3 EN CÉLULAS DEL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM3

Tascón R.; Castillo L.; Bal De Kier Joffe E.; Peters M.

Área Investigación, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

Previamente transfectamos células del adenocarcinoma mamario murino LM3 con el gen de GPC3, demostrando su rol como supresor metastásico. Además, informamos que este glicoproteína induce una inhibición de las vías Akt y Wnt canónica, mientras que estimula las vías p38 y Wnt no canónica (JNK). El objetivo de este trabajo fue investigar las posibles interacciones entre estas vías. Empleando *arrays* de qPCR demostramos que GPC3 modula la señalización Wnt canónica de manera genómica, *downregulando* la expresión de 66 genes (de 84 analizados). Por otro lado, investigamos las posibles interacciones entre las vías moduladas por

GPC3, revirtiendo el efecto del glipicano a través de activadores/inhibidores de cada señalización. En primer lugar, estudiamos el resultado de activar Akt a través de una mutante constitutivamente activa (CA Akt). Establecimos que aunque CA Akt no tuvo efectos sobre la fosforilación de JNK, provocó un aumento de 2-4 veces en los niveles de β -Catenina citoplasmática. En segundo lugar, analizamos la consecuencia de inhibir p38 empleando SB203580. Este tratamiento provocó una disminución en la fosforilación de JNK, pero no fue capaz de modificar los niveles de β -Catenina citoplasmática. Asimismo, indujo un aumento de 2 veces en fosfo-Akt. En lo que respecta a la vía Wnt canónica, analizamos el resultado de activarla empleando LiCl. Determinamos que las células tratadas tienen mayores niveles de fosfo-Akt, aunque no presentan diferencias en fosfo-p38. Por otro lado, el LiCl indujo una disminución en fosfo-JNK. Por último, investigamos el efecto de inhibir la vía Wnt no canónica empleando SP600125. El inhibidor provocó un aumento de 2-5 veces en los niveles de β -Catenina citoplasmática, así como una reducción de 2-6 veces en E-Cadherina, pero no tuvo efectos sobre Akt. En resumen, ratificamos la importancia de la señalización Wnt canónica y cómo se ve alterada por el glipicano. Además, demostramos distintas interacciones entre las vías reguladas por GPC3.

334. (323) EL ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA CONTRIBUYEN CONJUNTAMENTE A LA PROGRESIÓN TUMORAL EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA EN RATAS OVARIETOMIZADAS

Sasso C.¹; Santiana F.¹; Semino S.²; López-Fontana C.¹; Walter Carón R.¹

Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza¹; Anatomía Patológica, Hospital Universitario, Universidad Nacional de Cuyo².

Estudios demuestran que la terapia de reemplazo hormonal con análogos sintéticos de los esteroides ováricos en mujeres menopáusicas incrementa el riesgo de cáncer de mama (CaM). Hay pocos estudios sobre la acción de los esteroides ováricos fisiológicos sobre el CaM, especialmente en referencia a la progesterona (P) cuyos efectos son controversiales. En este trabajo estudiamos las diferencias entre el tratamiento individual o combinado con 17- β estradiol (E) y P sobre la progresión de tumores mamarios inducidos con Dimetilbenzantraceno (DMBA) en ratas ovariectomizadas (OVX). Ratas hembras Sprague Dawley fueron tratadas p.o. con una dosis de DMBA (15 mg/rata) a los 55 días de edad (día 0) y en el día 30 fueron OVX o sometidas a operación simulada (SHAM). A partir del día 37 las ratas OVX fueron inyectadas s.c. dos veces a la semana con E (60 μ g/kg), P (10 mg/kg), E+P (EP, 60 μ g/kg y 10 mg/kg) o vehículo (V, aceite vegetal). Luego del sacrificio se recolectó la sangre troncal para RIA de hormonas y los tumores mamarios para histología. Se determinaron la latencia, incidencia y progresión tumoral. Los niveles séricos de E y P alcanzaron valores fisiológicos y los tumores fueron clasificados como carcinomas ductales. El 100% de las ratas SHAM y el 90% del grupo E desarrollaron tumores ($p < 0.0001$), mientras que la incidencia fue del 75% para el grupo EP; del 11% para ratas tratadas con P y del 0% para ratas con V ($p < 0.01$). El grupo P presentó la mayor latencia de aparición de tumores ($p < 0.01$), mientras que el grupo E desarrolló mayor cantidad de tumores por rata ($p < 0.05$). La velocidad de crecimiento tumoral fue mayor en SHAM y EP ($p < 0.01$). El grupo SHAM presentó una mayor cantidad de figuras mitóticas ($p < 0.05$) que los grupos E y P. Concluimos que la P es necesaria pero no suficiente para el desarrollo tumoral mamario, y que E y P conjuntamente aceleran el crecimiento tumoral. Cambios en la expresión de los receptores hormonales pueden dar cuenta de estos efectos.

335. (343) IMITACIÓN VASCULOGÉNICA EN UNA LÍNEA TUMORAL OVÁRICA DE GRANULOSA HUMANA (KGN)

Pazos Maidana M.¹; Abramovich D.¹; Parborell F.¹; Tesone M.^{1,2}; Irusta G.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET¹; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

La agresividad del cáncer ha sido asociada con una alta plasticidad celular de parte de las células tumorales. En diversos sistemas tumorales se ha demostrado que la vía de señalización Notch se encuentra involucrada en la supervivencia de las células tumorales. Anteriormente hemos observado que la inhibición de esta vía afecta la proliferación, esteroidogénesis y parámetros apoptóticos de una línea ovárica tumoral de granulosa humana (KGN). En el presente trabajo se utilizó esta línea para cumplir con los siguientes objetivos: 1) Analizar la expresión de factores angiogénicos mediante la técnica de western blot, 2) Evaluar la migración celular en presencia de un inhibidor (DAPT) de la gamma secretasa, enzima que activa la vía de NOTCH. Resultados: En extractos proteicos de KGN observamos que estas células expresan factores angiogénicos como PDGF-DD, su receptor de membrana PDGFR Beta, ANGPT-1 (Angiopoyetina-1) y su receptor de membrana TIE2. Sin embargo, no se detectó la presencia de PDGF-BB en esta línea celular. Las células KGN también expresan algunos miembros de la familia Notch como los ligandos JAGGED 1 y DLL4 y los receptores NOTCH 1 y NOTCH 4. La inhibición del sistema NOTCH incrementó la secreción de VEGF por parte de las células KGN. También se analizó la capacidad migratoria de las células KGN en presencia del inhibidor DAPT, la cual disminuyó en relación a la condición control. Basándonos en estos resultados, concluimos que los tumores ováricos de granulosa producen factores angiogénicos que podrían estabilizar la vasculatura del tumor favoreciendo el crecimiento y la diseminación de las células tumorales. Además, el sistema Notch estaría participando en la regulación de la secreción de VEGF y de la capacidad migratoria de las células KGN.

336. (421) LA SOBREENPRESIÓN GENÉTICA DE HEMOXIGENASA-1 SE CORRELACIONA CON UN ESTADO MENOS PROLIFERATIVO EN CÁNCER DE MAMA

Gandini N.¹; Fermento M.¹; Obiol D.¹; López Romero A.²; Facchinetti M.¹; Curino A.¹

Laboratorio de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET¹; Laboratorio de Citometría, IACA Laboratorios².

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que hemoxigenasa-1 (HO-1) se encuentra sobreexpresada en carcinoma mamario (CM) humano y que este aumento de la expresión se asocia con una mayor sobrevida global. Además comprobamos que la modulación farmacológica de HO-1 se correlaciona con una menor proliferación y migración celular de las líneas de CM murino LM3 y LM05. Sin embargo algunos trabajos demuestran una acción directa de los moduladores farmacológicos de HO-1 sobre estos procesos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue corroborar los resultados, realizando la sobreexpresión genética de HO-1, así como también evaluar el rol de HO-1 en líneas de CM humano. Se emplearon las líneas T47D y MDA-MB231, las cuales se transfectaron con pcDNA3-HO-1 o con el vector vacío, obteniéndose líneas estables. Las nuevas líneas obtenidas, T47D-HO-1 y MDA-HO-1 mostraron tasas de crecimiento menores que las líneas controles ($p < 0.0001$ y $p < 0.0004$, respectivamente). El análisis de expresión de algunas proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular mostró aumento de la expresión de p27 y disminución de la expresión de ciclinas D1 y E en las líneas que sobreexpresan HO-1. El estudio del ciclo celular en T47D-HO-1 mostró un aumento de células en G0/G1 ($p = 0.029$) y disminución en las fases S ($p = 0.031$) y G2/M ($p = 0.032$) con respecto a la línea control. El ensayo de la herida mostró iguales tasas de migración en las líneas que sobreexpresan HO-1 que en las líneas control ($p > 0.05$). En conclusión, los resultados obtenidos con la sobreexpresión genética de HO-1 corroboran los resultados previos que muestran que HO-1 disminuye la proliferación celular. Sin embargo, no corroboran los resultados observados en la migración, lo cual sugiere que los moduladores farmacológicos podrían estar regulando directamente este proceso o bien que la participación de HO-1 en este proceso varíe entre las distintas especies estudiadas.

337. (423) EL RECEPTOR H4 DE HISTAMINA REGULA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DE TUMOR MAMARIO HUMANO MDA-MB-231

Cricco G.¹; Mohamad N.¹; Mauro F.¹; Gil A.¹; Martín G.^{1,2}
Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)².

Previamente demostramos que la fosforilación de c-Src media la migración inducida por histamina (HA, $\leq 1\mu\text{M}$) en las células MDA-MB-231, acción que depende de los niveles de peróxido de hidrógeno generados. Objetivo: 1) Identificar el receptor a HA responsable de la fosforilación de c-Src mediante el empleo de agonistas (ago) y antagonistas (antago) de HA y corroborar su participación en la migración celular. 2) Investigar otras quinasas involucradas en la estimulación de la migración mediante el empleo de inhibidores específicos. Se evaluaron los niveles de P-Src en células MDA-MB-231 tratadas con HA $1\mu\text{M}$ o con ago de los receptores H1, H2, H3 y H4. La fosforilación evaluada por inmunoblot aumentó con los ago H4 Clobenpropil y VUF8430 y se bloqueó con el antago H4 JNJ7777120 ($p < 0.05$). Utilizando cámaras de migración se verificó un incremento en las células migradas en presencia de HA $1\mu\text{M}$ o los ago H4, que se revirtió con el antago H4 ($p < 0.05$). El inhibidor de la fosforilación de c-Src (PP2) suprimió tanto el aumento de los niveles de P-Src como de la migración, inducidos por HA y ago H4. La P-Src fosforila sustratos como la β -catenina que trasloca al núcleo y regula la expresión de genes involucrados en la migración. En células tratadas con HA o ago H4 se observó una localización citoplasmática y perinuclear de β -catenina por inmunofluorescencia que se revirtió con el antago H4. La fosforilación de c-Src inducida por ago H4 no se modificó con inhibidores de la fosfolipasa C (U73122), de ERK1/2 (PD98059) y de la NADPH oxidasa que produce ROS (DPI). Sin embargo, la fosforilación de ERK1/2 por ago H4 se redujo en presencia de PP2 ($p < 0.05$), sugiriendo que la c-Src está por arriba de las ERK1/2 en la señalización. Además el PD98059 impidió el aumento de la migración por HA y ago H4 ($p < 0.01$). Nuestros resultados señalan la participación del receptor H4 en la migración de las células MDA-MB-231 a través de una vía de señalización mediada por c-Src y ERK1/2.

338. (443) LA ACCIÓN FOTOTÓXICA DE LA FTALOCIANINA DE ZN(II) CATIONICA PC13 EN CÉLULAS TUMORALES ESTÁ MEDIADA POR LA MAPK P38

Marino J.¹; García Vior M.²; Chiarante N.¹; Furmento V.¹; Awruch J.²; Roguin L.¹
Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Química Orgánica, Facultad De Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

La ftalocianina de Zn(II) catiónica Pc13 es un agente fotosensibilizante, no tóxico en la oscuridad, capaz de desencadenar la muerte celular cuando se irradia con luz de longitud de onda $> 630\text{ nm}$. Estas características hacen que Pc13 sea un compuesto promisorio para ser utilizado en terapia fotodinámica con fines antitumorales. En un trabajo previo demostramos que la acción fototóxica de Pc13 conduce a la activación de una respuesta apoptótica dependiente de caspasas. Con el propósito de investigar la participación de señales intracelulares en el efecto citotóxico de Pc13, utilizamos dos líneas de células tumorales: KB (carcinoma orofaríngeo humano) y CT26 (carcinoma de colon murino). En primer lugar, determinamos que las concentraciones de compuesto que inhiben el crecimiento celular un 50% (IC_{50}) fueron $2,7 \pm 0,6\mu\text{M}$ en células KB y $0,9 \pm 0,3\mu\text{M}$ en células CT26. Luego, por ensayos de Western blot estudiamos los niveles de fosforilación de las MAPK p38 y JNK. Los resultados obtenidos en ambas líneas celulares indicaron que p38 es fosforilada tempranamente (20 min de irradiación), mientras que JNK se activa luego de 40 min de irradiación. Para evaluar la implicancia de estas vías en la respuesta fototóxica de Pc13, se preincubaron las células en presencia de inhibidores específicos de p38 y JNK: SB203580 y

SP600125, respectivamente. Cuando las células se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de SP600125 (hasta $1\mu\text{M}$) no se observó ninguna modificación de la viabilidad celular. Mayores concentraciones de este inhibidor resultaron ser tóxicas. Asimismo, se detectó un incremento significativo en el porcentaje de células viables ($13,7 \pm 3,7\%$ en KB y $26,2 \pm 3,2\%$ en CT26) con $20\mu\text{M}$ de SB203580. Los resultados obtenidos hasta el momento indican la eficacia antitumoral de Pc13 en distintas líneas tumorales, y sugieren que al menos p38 estaría participando en la cascada de eventos intracelulares que llevan a la muerte celular.

339. (462) LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS HER-2/NEU Y BETA-CATENINA: IMPORTANCIA EN EL PRONÓSTICO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y SU CORRELACIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA BAJO UNA SITUACIÓN DE ESTRÉS

Cuello Carrión F.¹; Shortrede J.¹; Álvarez-Olmedo D.¹; Willoud R.²; Cayado-Gutiérrez N.¹; Castro G.¹; Gago F.¹; Ciocca L.¹; Fanelli M.¹; Ciocca D.¹
Laboratorio de Oncología, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza¹; QUANID, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Cuyo².

Las células de cáncer de mama muestran una interacción β -catenina/HER-2, proteínas que cooperan en la inducción de tumores mamarios en ratones transgénicos. Además, β -catenina interactúa con Hsp27. Aquí reportamos una expresión llamativa de β -catenina/HER-2 en la membrana celular de tumores de ratones transgénicos (distinto a lo visto en biopsias de pacientes con cáncer de mama, donde β -catenina aparece frecuentemente en el citoplasma). Este trabajo, realizado mediante inmunohistoquímica en nuestro banco de tumores de mama, da significado clínico a la coexpresión entre β -catenina/HER-2. Las pacientes no recibieron terapia antiHER-2. En las glándulas mamarias "normales" adyacentes a los tumores, β -catenina se expresó sólo en la membrana (donde el HER-2 estaba ausente). En las lesiones hiperplásicas y en los carcinomas in situ, la β -catenina aparece en la membrana, en el citoplasma y en algunas células se pierde su expresión. En cambio, el HER-2 aparece únicamente en los carcinomas *in situ*. En los carcinomas invasivos, la β -catenina se expresa: en la membrana celular (rodeando completamente a las células tumorales), o de modo fragmentado en la membrana celular con o sin gránulos citoplasmáticos. Interesantemente, en las pacientes HER-2 (+), la expresión continua de β -catenina en membrana se asocia fuertemente con buen pronóstico. Para explorar la dinámica de la interacción β -catenina/HER-2 decidimos investigar el comportamiento de éstas proteínas en células MCF-7 expuestas a una situación de estrés (administración de Cadmio). El Cd induce un cambio en la localización de β -catenina desde la membrana al citoplasma, en concentraciones que afectan la sobrevivida a largo plazo. HER-2 también fue afectado por Cd, y aunque se mantuvo en la membrana, su expresión se incrementó significativamente en citoplasma. Estos estudios señalan el vínculo β -catenina/HER-2 y constituyen un aporte más al nuevo concepto de diagnóstico/tratamiento personalizado en cáncer de mama humano.

340. (463) CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMON HUMANO SENSIBLES Y RESISTENTES A ALA-TFD

Fukuda H.^{1,2}; Teijo J.²; Cassinelli J.¹; Batlle A.²
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porfirinas (CIPYP)-CONICET, Hospital De Clínicas José de San Martín, Buenos Aires².

La Terapia fotodinámica (TFD) se aplica en numerosas patologías tumorales; la aparición de células resistentes es un efecto no deseado. Para identificar qué cualidades confieren a las células la capacidad de sobrevivir a la TFD, se trataron células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 con ALA-TFD (ALA, ácido 5-aminolevulínico, precursor biológico de porfirinas, PPIX). Se generó un linaje celular resistente al ALA-TFD luego de 12

ciclos sucesivos (C-12), que acumuló un 50% menos de porfirinas (Control: $19,9 \pm 1,2$ ng porf/ 10^5 cél; C-12: $9,5 \pm 0,7$ ng porf/ 10^5 cél). La fotosensibilización con PpIX exógena (5 mM, t incub: 3h), indujo recuperación parcial de la sensibilidad a TFD en células C-12 (supervivencia irradiada 10 min: control ALA: 39,5%; control PPIX: 27,5%; C-12 ALA: 10,0%; C-12 PPIX: 75,0%). La menor sensibilidad de las C-12 a la PpIX-TFD no se debe a una menor acumulación de PpIX, pues es similar en ambos tipos celulares ($77,1 \pm 2,2$ ng porf/ 10^5 cél control; $80,6 \pm 4,8$ ng porf/ 10^5 cél C-12). No hubo diferencias notables en la morfología (tinciones con azul de toluidina y Hoechst) ni en la capacidad de migración (ensayo de la herida). En cuanto a parámetros asociados a apoptosis: en las C-12 se detectó despolarización mitocondrial sin liberación de citocromo c, activación de caspasa-3 y se observó expresión de la Proteína antiapoptótica Bcl-2. Siendo NF κ B un factor sensible al estado redox, es relevante en la supervivencia a TFD. Se analizó la expresión de I κ B y la subunidad p65 de NF κ B en las fracciones citosólicas y nucleares respectivamente, de células parentales y C-12, luego de la TFD. En células sensibles se detectó I κ B; en las C-12, se detectó NF κ B en todos los tratamientos, y un patrón de bandas de I κ B similar al de células sensibles. Los resultados sugieren que la activación de NF κ B es un evento relacionado con un efecto a largo plazo de la TFD. Las células que reciben un único tratamiento fotodinámico sólo activan esta respuesta con dosis subletales, menores a la DL₅₀.

341. (473) MLH1 Y MSH2 INTERACTÚAN CON HSP27 Y HSP72 EN CÉLULAS TUMORALES DE COLON HUMANO EXPUESTAS A HIPERTERMIA Y CISPLATINO

Sottile M.¹; Lossino A.²; Fanelli M.¹; Cuello Carrin F.¹; Ciocca D.¹; Vargas Roig L.¹; Nadin S.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, CCT-Mendoza¹; Instituto de Histología y Embriología Mendoza. "Dr. Mario H. Burgos" (IHEM)-CONICET, Mendoza².

En los últimos años se ha reportado la vinculación entre proteínas de golpe de calor (HSPs) y componentes de diversos sistemas de reparación del ADN, como por ejemplo BER y NER; habiéndose observado que las HSPs pueden asistir a estos mecanismos en la corrección de daños. Hemos reportado la colocalización entre las proteínas hMLH1 y hMSH2 con HSP27 y HSP72 en linfocitos humanos de sangre periférica. hMLH1 y hMSH2, integrantes del sistema "Mismatch Repair" (MMR), son esenciales en el reconocimiento del daño causado por cisplatino (CpT). El propósito de este trabajo consistió en corroborar la interacción entre hMLH1, hMSH2, HSP27 y HSP72 en células de adenocarcinoma de colon humano, deficientes y no deficientes en el sistema MMR, expuestas a hipotermia (H) y/o CpT. Las líneas celulares HCT116 y HCT116+ch2 (hMLH1 deficientes) y HCT116+ch3 fueron expuestas a: 1- CpT, 10 μ M (1 h). 2- H+CpT, CpT 10 μ M (1 h) 24 hs después de un tratamiento térmico a 42°C (1 h). Las células fueron fijadas a las 0, 2, 4 y 24 hs después del CpT para estudios de inmunofluorescencia confocal. Para inmunoprecipitación cruzada se utilizaron muestras control, tratadas con CpT e H+CpT cosechadas 24 hs post-CpT. El coeficiente de colocalización (Pearson) entre hMLH1 y HSP72 y los coeficientes de Manders, en la línea HCT116+ch3 expuesta a H+CpT, aumentaron significativamente en relación al control a las 24 hs del CpT ($P = 0,0153$ y $P = 0,03$, respectivamente). También se verificó colocalización entre: hMLH1-HSP27, hMSH2-HSP27 y hMSH2-HSP72 (Pearson > 0,5). Mediante inmunoprecipitación observamos interacciones directas entre: hMLH1-HSP27, hMLH1-HSP72, hMSH2-HSP27 y hMSH2-HSP72. Nuestro trabajo demuestra por primera vez la interacción entre componentes del sistema MMR y las proteínas HSP27 y HSP72. Estas HSPs podrían colaborar con el sistema MMR en la reparación de los daños inducidos por cisplatino. Este hallazgo constituye el punto de partida para futuros estudios funcionales.

342. (494) ROL DE LAS INTERACCIONES GALECTINAS-GLICANOS EN EL PROCESO MIGRATORIO EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Gentilini L.¹; Jaworski F.¹; González Pérez I.¹; Conrufo G.¹; Rabinovich G.^{1,2}; Chauchereau A.³; Laderach D.¹; Compagno D.¹

IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²; Inserm U981, Villejuif, Francia³.

El cáncer de próstata (CaP) es un problema mayor de salud a nivel mundial. Estudios epidemiológicos demostraron que es el segundo tipo de cáncer en hombres y su frecuencia es de 40 por 100.000 casos de cáncer (IARC, WHO). Los tratamientos quirúrgicos, radiológicos y la ablación androgénica son eficaces contra los tumores de próstata localizados. Sin embargo, entre un 15 y 20% de los pacientes evolucionan hacia fases avanzadas desarrollando metástasis ósea o a ganglios linfáticos, para las que aún no hay tratamientos eficaces. Es por ello que se requieren métodos alternativos de diagnóstico precoz y de prevención de la metástasis. El objetivo de este trabajo es investigar el rol de las galectinas (Gal) en el proceso migratorio y desarrollo de metástasis en CaP. Para ello generamos líneas celulares de CaP humana (IGRCaP-1) o murina (TRAMP-C1) resistentes a Docetaxel, quimioterapia usada en los estadios refractarios a la castración y metastásicos. Dichas células presentan niveles disminuidos de Gal-3 y -8, acompañados *in vitro* por una capacidad migratoria disminuida del $50 \pm 10\%$ ($p < 0,004$). Estudios *in vivo* mostraron que las IGRCaP-1 resistentes carecían de capacidad tumorigénica, mientras que las TRAMP-C1 eran más agresivas que las células originales dado a la re-expresión de ambas Gals. Mediante un análisis cinético *in vitro* de expresión observamos que la presencia de la droga era requerida para la disminución de dichas Gals en estas células. Debido a esto, para el análisis de su capacidad migratoria *in vivo* y para poder corroborar el papel de las Gals en el proceso metastásico en CaP, desarrollamos líneas celulares expresando shRNA contra Gal-8 o Gal-3, las cuales presentaron expresión disminuida de Gal y menor capacidad migratoria superior al $30 \pm 18\%$ ($p < 0,02$). Los resultados obtenidos en las líneas shRNA+ corroboran lo observado en el modelo de resistencia, siendo muy alentadores respecto al rol de estas proteínas en el proceso tumorigénico y migratorio en CaP.

343. (525) EFECTO ANTITUMORAL DE AGONISTAS DEL RECEPTOR A HISTAMINA H4 EN LA LÍNEA CELULAR WiDR DE CÁNCER COLORRECTAL

Ciraolo P.¹; Martinel Lamas D.¹; Cortina J.¹; Mondillo C.^{2,3}; Rivera E.¹; Medina V.^{1,2}

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET³.

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más frecuente en nuestro país. Se ha demostrado previamente que los niveles de expresión del receptor a histamina H4 (RH4) están disminuidos en CCR avanzado respecto de estadios iniciales, lo que sugiere que la expresión del RH4 se regula durante la progresión de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de agonistas del RH4 sobre el potencial proliferativo de la línea celular de CCR humana WiDr. Se determinaron: la expresión del RH4 por western blot e inmunocitoquímica, la acumulación de AMPc por RIA, la proliferación mediante el ensayo clonogénico e incorporación de BrdU, la apoptosis mediante el ensayo de TUNEL y Anexina-V, las especies reactivas del oxígeno (ROS) se evaluaron por citometría de flujo y los marcadores del daño al ADN (γ H2AX y 8-OHdG) se determinaron por inmunocitoquímica, empleando agonistas del RH4 [Histamina (HA), Clozapina (CLZ), JNJ28610244 (J28)] y el antagonista JNJ7777120. Los agonistas del RH4 reducen la proliferación de las células WiDr en forma dosis dependiente, con una concentración inhibitoria del 50% (Cl₅₀) de 1.1 ± 0.7 μ M para CLZ; 1.9 ± 0.6 μ M para J28. Este efecto se asoció a una reducción en el porcentaje de incorporación de

BrdU [31.3 ± 0.6 (CLZ), 31.6 ± 1.0 (J28) vs. 41.3 ± 2.4 , $P < 0.01$] que se revirtió con el tratamiento combinado con el antagonista y a un aumento de la apoptosis (3-veces, $P < 0.01$). Además, estos ligandos producen un aumento significativo de los niveles de ROS (2.5-veces, $P < 0.01$) y aumentan el número de foci de γ H2AX por núcleo. Estos agonistas del RH4 fueron más efectivos en inhibir la proliferación que la histamina y no se observó actividad mitogénica luego del tratamiento con agonistas del RH1 (2-(3-(trifluorometil)fenil)histamina), RH2 (lantamina) o RH3 (R(-)- α -metilhistamina). Podemos concluir que las células WiDr de CCR presentan una expresión funcional del RH4 y que agonistas de estos receptores exhiben una actividad antitumoral.

344. (546) USO DEL CRX COMO MARCADOR LINAJE-ESPECÍFICO EN LA DETECCIÓN MOLECULAR DE CÉLULAS DE RETINOBLASTOMA EN SITIOS METASTÁSICOS

Torbidoni A.¹; Laurent V.¹; Ottaviani D.¹; Alonso C.¹; De Dávila M.¹; Alonso D.²; Chantada G.¹
Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"; Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires².

Introducción: La identificación de células del retinoblastoma en sitios extraoculares se basa en la expresión de moléculas relacionadas con la estirpe tumoral, comunes a otros tumores neuroectodérmicos. Siendo el origen de este tumor un precursor de los fotorreceptores del tipo conos, moléculas relacionadas con este linaje podrían ser de utilidad en la identificación de la diseminación extraocular. Entre estas proteínas el factor de transcripción de conos y bastones con caja homeo (CRX) ha sido detectado en retinoblastomas y para identificar células tumorales en casos aislados. **Objetivos:** Evaluar la detección de CRX por transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real para evidenciar la presencia de células de retinoblastoma diseminadas en muestras de médula ósea (MO). **Materiales y Métodos:** Se analizaron muestras almacenadas prospectivamente en el banco de tumores de todos los pacientes ($n=6$) con retinoblastoma metastásico desde 2008 a 2012. Se sintetizó ADNc a partir de ARN total aislado de MO usando hexámeros al azar. Se realizó PCR en tiempo real para CRX y GAPDH como gen control, utilizando cebadores diseñados para tal fin. **Resultados:** Se detectó amplificación de CRX en las muestras de MO al diagnóstico de los 6 pacientes con retinoblastoma metastásico. En muestras ($n=4$) analizadas al final de la inducción quimioterápica, no se evidenció expresión de CRX, coincidente con la evolución clínica ya que estos pacientes mantuvieron la remisión completa en MO (2 de ellos se mantienen en remisión luego de trasplante de MO). Descartamos la expresión de CRX en muestras de MO de 10 pacientes sin retinoblastoma. **Conclusiones:** Las células metastásicas del retinoblastoma en la MO expresan CRX como marcador de linaje por lo que, además de ser de utilidad con fines diagnósticos, puede ser un candidato para ser utilizado como marcador molecular de enfermedad mínimamente diseminada.

345. (573) IDENTIFICACIÓN DE UNA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES (MSC) CON UNA CAPACIDAD DE RESPUESTA AUMENTADA HACIA EL ESTROMA TUMORAL

Bolntrade M.¹; Sganga L.¹; Gutiérrez L.¹; Piaggio E.¹; Sorrentino M.²; Robison A.²; García M.³; Mazzolini G.³; Podhajcer O.¹
Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET¹; Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral²; Hospital Naval Pedro Mallo, Buenos Aires³.

Las Células Estromales/Madre Mesenquimales (MSCs) componen una población heterogénea con capacidad multipotente y habilidad para migrar y alojarse preferencialmente en tejidos en remodelación, entre ellos el estroma tumoral. Utilizando capacidad de adhesión diferencial en el momento del aislamiento, seleccionamos una subpoblación específica de MSCs (MO-MSCs) con mayor capacidad multipotente y expresión aumentada de integrinas a2, a3 y a5, las cuales correlacionaron con una adhesividad aumentada hacia sus ligandos específicos. Además,

MO-MSCs mostraron una capacidad migratoria aumentada hacia medios condicionados por líneas tumorales humanas (MO-MSCs frente a medio condicionado por línea tumoral humana A375N, 91 ± 11.53 células/campo; MOSN frente a medio condicionado por A375N 30 ± 3.84 células/campo). Estudios in vivo demostraron que la capacidad de migración hacia el estroma tumoral en xenomodelos establecidos en ratones nude (línea de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 y línea de melanoma humano A375N) era mayor en la subpoblación MO-MSCs ($3.98 \times 10^7 \pm 1.064 \times 10^7$ vs $1.47 \times 10^7 \pm 1.94 \times 10^6$ p2/sec/cm2/sr, $p < 0.05$, MO-MSCs vs MOSN respectivamente, mediante envío sistémico en xenomodelo MDA-MB-231; $2.62 \times 10^7 \pm 4.85 \times 10^6$ vs $6.65 \times 10^6 \pm 478247$ p2/sec/cm2/sr, $p < 0.05$, MO-MSCs vs MOSN respectivamente, en migraciones in vivo adyacentes al estroma tumoral). En conclusión, identificamos una subpoblación de MSC con una capacidad de llegada y alojamiento en tumores aumentada. Estas células podrían convertirse en herramientas celulares útiles para estrategias de terapia celular dirigida al tumor.

346. (581) EL TRATAMIENTO CON 4-METILUMBELIFERONA POTENCIA EL SILVIA MARCELA ESTEIN CICLOFOSFAMIDA E INTERLEUQUINA 12 EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE COLON

Malvicini M.¹; Piccioni F.¹; Rizzo M.¹; Alaniz L.¹; Bayo J.¹; Fiore E.¹; García M.¹; Aquino J.¹; Peixoto E.¹ Atorrasagasti C.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.

Previamente demostramos que la administración secuencial de ciclofosfamida (Cy) y terapia génica con IL-12 (AdIL-12) en ratones con cáncer de colon (células CT26) produce un efecto antitumoral sinérgico mediado por la inducción de una potente respuesta inmunitaria específica. Con el objetivo de evaluar el efecto de la modulación del microambiente tumoral sobre la eficacia terapéutica de la combinación Cy+AdIL-12, utilizamos 4-metilumbeliferona (4Mu), un inhibidor selectivo de la síntesis de ácido hialurónico. Se inocularon ratones Balb/c con células CT26 (5×10^5) s.c. (día 0); cuando los tumores alcanzaron un volumen de 85 mm^3 (día 7) se distribuyeron en grupos que recibieron: I) solución salina; II) Cy (50 mg/Kg, i.p.); III) AdIL-12 (10^9 PFU, intratumoral); IV) 4Mu (200mg/kg/día, vía oral, durante 21 días); V) Cy+AdIL-12; VI) 4Mu+Cy+AdIL-12. Se evaluó la evolución del volumen tumoral, regresiones tumorales completas y sobrevida. Los tratamientos individuales (grupos II, III y IV) produjeron una reducción no significativa del volumen tumoral, sin regresiones completas. Al igual que en experimentos anteriores, la combinación Cy+AdIL-12 redujo significativamente el volumen tumoral e indujo un 50% (4/8) de regresiones completas ($p < 0.01$). En cambio, el grupo tratado con la triple combinación 4Mu+Cy+AdIL-12 mostró un incremento en el porcentaje de regresiones tumorales (70%; 7/10) y en la sobrevida de los animales ($p < 0.01$). Los estudios inmunológicos evidenciaron que el agregado de 4Mu no mejoró la citotoxicidad específica inducida por Cy+AdIL-12. En cambio observamos una disminución significativa de los niveles séricos de VEGF en los animales tratados con 4Mu+Cy+AdIL-12 ($p < 0.05$), sugiriendo que esta combinación podría tener efecto antiangiogénico. Concluimos que el tratamiento con 4Mu potencia el efecto antitumoral de Cy+AdIL-12. La efectividad terapéutica de 4Mu+Cy+AdIL-12 estaría mediada, al menos parcialmente, por una combinación de efectos inmunológicos y antiangiogénicos.

347. (613) EL SILENCIAMIENTO SIMULTÁNEO DE KU-80 Y DE PXRII MEDIANTE EL USO DE COMPLEJOS IARN Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS TIENEN UN EFECTO RADIOSENSIBILIZADOR EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER COLORRECTAL

Cerda Cerda M.^{1,2}; Batalla M.¹; Plank C.³; Mykhaulyk O.³; Policastro L.^{1,2}
Comisión Nacional de Energía Atómica¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²;

Institute of Experimental Oncology And Technical University of Munich, Alemania.³

El ADN es el blanco más sensible sobre el cual actúan las radiaciones ionizantes. Los sistemas de reparación del ADN y los mecanismos antioxidantes están íntimamente relacionados con los mecanismos de radiorresistencia. Previamente hemos evaluado la expresión de componentes del sistema de reparación del ADN y hemos encontrado una correlación entre el aumento de la expresión de ku80 y el aumento de la radiorresistencia en líneas de cáncer colorrectal. Por otro lado, también hemos caracterizado distintos componentes del sistema antioxidante y hemos seleccionado a la peroxirredoxina II como blanco de silenciamiento. A partir de estos resultados, el objetivo de este trabajo fue silenciar simultáneamente la expresión de ku80 y PxrII mediante el uso de pequeños ARN de interferencia (siARN) acoplados a nanopartículas magnéticas (NPM) y analizar su posible efecto radiosensibilizador mediante la obtención de curvas de supervivencia ajustadas al modelo lineal cuadrático ($S = \exp(-\alpha D + \beta D^2)$). Los complejos siARN-NPMs silenciaron en un 100% la expresión de Ku80 y de PxrII con respecto a las células tratadas con complejos siARN-NPMs controles a las 72hs post-tratamiento. La capacidad de radiosensibilización se cuantificó mediante la determinación de la sobrevida a 2Gy (FS2Gy), el parámetro α y SER0,1 (sensitizer enhancement ratio) que evalúa la relación de dosis necesaria para obtener una fracción de sobrevida de 0,1 para las distintas condiciones de silenciamiento. La FS2Gy fue de 0,54+0,01; 0,30+0,02; 0,34+0,03 y 0,24+0,02 para células transfectadas con siARNcontrol, siARNku80, siARNPxrII, y siARNku80+PxrII respectivamente. El parámetro α y la relación SER0.1 también variaron significativamente entre los tratamientos. En futuros experimentos evaluaremos el efecto radiosensibilizador en experimentos *in vivo*

348. (624) IMPLICANCIA DE POBLACIONES ESTROMALES ASOCIADAS AL TUMOR EN LA RESPUESTA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN UN MODELO DE CÁNCER DE COLON

Pansa M.; Lamberti M.; Rumie Vittar N.; Rivarola V.
Laboratorio de Terapia Fotodinámica, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

El estudio específico de interacciones celulares en el microambiente tumoral se ha convertido en una de las principales líneas de investigación contra el cáncer. El desarrollo de modelos de estudio que imiten las características de los tumores permite obtener resultados pre-clínicos relevantes que pueden optimizar o desestimar aplicaciones clínicas. Las interacciones de células tumorales (CT) con los diferentes componentes del estroma tumoral, tales como macrófagos (M Φ), juegan un rol importante en el desarrollo neoplásico y deben considerarse al momento de evaluar una terapia. La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica determinada por la acción de tres componentes: un compuesto fotoactivo, luz y O₂. Se pretende establecer si los M Φ modifican la respuesta tumoral a la TFD utilizando Me-ALA. Para ello, se determinó la viabilidad celular luego de tratar con dosis bajas (TFD-Lb) y altas (TFD-La) de luz, a esferoides de células de cáncer de colon SW480 co-cultivadas con M Φ . El aumento en la resistencia al tratamiento resultó significativa cuando las CT y los M Φ mantuvieron un contacto previo o fueron tratados de forma conjunta con el régimen de TFD-La, indicando que la interacción de ambas poblaciones celulares le permite a la CT adquirir mayor resistencia a un tratamiento que de otra manera resultaría letal. Con la dosis que causa la reducción del 50% de la viabilidad celular solo se observa un aumento en la resistencia en CT que mantuvieron un contacto previo con M Φ que no han sido tratados con TFD. Por el contrario, cuando se aplica TFD-Lb, la cual causa un menor porcentaje de muerte, no varía de forma significativa en presencia o no de la población de M Φ . Estos resultados demuestran la importancia de las poblaciones estromales por su incidencia en la respuesta a terapias. Se pretende dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno para

el desarrollo de terapias adyuvantes que garanticen una mejor eficiencia de la TFD.

349. (626) LOCALIZACIÓN NUCLEAR DEL FACTOR FORKHEAD BOX DE CLASE O FOXO3A (FOXO), SU ASOCIACIÓN CON β CATENINA Y SMADS Y LA PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS, EN LÍNEAS DE HEPATOCARCINOMA CELULAR (HCC) TRATADAS CON INTERFERÓN α (IFN)

Ceballos M.; Parody J.; Quiroga A.; Casella M.; Francés D.; Carnovale C.; Álvarez M.; Carrillo M.
Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)- CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

Previamente demostramos que IFN disminuye la proliferación e incrementa la apoptosis en líneas de HCC disminuyendo la interacción β catenina/TCF4/Smads. En el núcleo, FoxO participa en proliferación y apoptosis e interactúa con β catenina y Smads. FoxO es inhibido por Akt, IKK β (IKK) y Erk, que promueven su sequestro citosólico, mientras que se acumula en el núcleo tras ser fosforilado por JNK y p38MAPK (p38). Evaluamos los efectos de IFN en C3A y Huh7 sobre los niveles proteicos de FoxO total y fosforilado por Akt, las quinasas vinculadas a FoxO (immunoblot) y su unión con β catenina/Smads (co-immunoprecipitación). Analizamos los niveles génicos y proteicos de genes blanco de FoxO (*Real-Time* q-PCR e inmunoblot). Estudiamos los niveles nucleares de FoxO (immunoblot) en células Huh7 pretratadas con inhibidores de IKK, Erk y p38 y luego estimuladas con IFN. IFN redujo los niveles de FoxO fosforilado en extractos citosólicos (C3A -36%* Huh7 -49%*) y aumentó en extractos nucleares (C3A +84%* Huh7 +72%*). IFN disminuyó los niveles de las formas activas de Akt (C3A -67%* Huh7 -61%*), IKK (C3A -22%* Huh7 -27%*) y Erk (C3A p-Erk1 -79%* p-Erk2 -56%* Huh7 p-Erk1 -46%* p-Erk2 -41%*) mientras que incrementó los niveles de las formas activas de JNK (C3A p-JNK2/3 +49%* p-JNK1 +64%* Huh7 p-JNK2/3 +45%* p-JNK1 +41%*) y p38 (C3A +59%* Huh7 +121%*). La inhibición de IKK y Erk estimuló la localización nuclear de FoxO inducida por IFN (+36%* y +45%* respectivamente) mientras que la inhibición de p38 bloqueó este fenómeno (-28%*). IFN aumentó la asociación de FoxO con β catenina y Smads. La expresión de los genes blanco aumentó significativamente con IFN. *p<0,05. Los resultados indican que el tratamiento con IFN modula las actividades de Akt, IKK, Erk y p38, favoreciendo la acumulación nuclear de FoxO y la disrupción del complejo de sobrevida β catenina/TCF4/Smads. La estimulación de ambos eventos podría ser considerada una potencial estrategia farmacológica para tratar el HCC.

350. (652) ACCION EXTRAGONADAL DE LH Y FSH EN LA MIGRACION E INVASION DE CELULAS DE CANCER DE MAMA

Flamini M.; Neira F.; Uzair I; Sánchez A.
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza.

El cáncer de mama es la neoplasia más común en las mujeres. El 98% de las muertes por cánceres no detectados, son debidas a la metastatización de éste. La migración celular, crucial para el desarrollo de la metástasis, es un proceso de varios pasos que involucran la polarización y extensión de protusiones de membrana hacia la dirección de la migración celular. Estas acciones son moduladas por el remodelamiento actínico, complejos de adhesiones focales y consecuente formación de estructuras de membrana fundamentales para la migración e invasión celular, y vienen controlados por diversas proteínas reguladoras del citoesqueleto actínico. Nuestros resultados han identificado la expresión extragonadal de los receptores para las hormonas folículo estimulante (FSH) y leutinizante (LH) en células de cáncer de mama T47-D, y como estas gonadotropinas promueven, a través de su receptor, los procesos de migración e invasión celular. Dichos procesos son controlados por las proteínas reguladoras del citoesqueleto como moesin y FAK, que mediante su rápido

mecanismo de fosforilación/activación y redistribución, promueven el remodelamiento de las fibras actínicas hacia la periferia de la membrana, y consecuente formación de complejos de adhesión focal, respectivamente. La activación de moesin, fue desencadenada tras una rápida vía de señalización dependiente de proteína $G_{\alpha_{13}}$ /Rho-quinasa/ROCK-2. Mientras tanto, la activación de FAK, fue promovida tras el reclutamiento de la proteína $G_{\alpha_{\beta}}$ y c-Src quinasa. Nuestros resultados proporcionan una importante información sobre el efecto extragonadal de LH y FSH en células de cáncer de mama, abriendo las puertas a nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y control del cáncer mamario, así como también para interferir con la aparición y/o progresión de esta enfermedad, mediante el uso de drogas antagonistas y/o agonistas de GnRH, con el fin de disminuir los niveles circulantes de estas hormonas.

351. (665) AMPc EXTRACELULAR: FACTOR AUTOCRINO DE CRECIMIENTO EN MODELOS DE CÁNCER

Diez F.¹; Carozzo A.¹; Gómez N.¹; Fernández N.¹; Shayo C.²; Davio C.¹

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET².

La comprensión de los mecanismos moleculares del cáncer y la descripción de nuevos blancos terapéuticos resultan cruciales para definir nuevas estrategias de tratamiento. Los GPCRs, proteínas G y sus circuitos de señalización representan dianas terapéuticas para la prevención y el tratamiento del cáncer. La complejidad de los mecanismos regulatorios de las señales de los GPCRs se ha incrementado por la existencia de mecanismos de exclusión de segundos mensajeros. Previamente hemos descrito en diferentes modelos de leucemia mieloide aguda (LMA) y adenocarcinomas ductales pancreáticos (PDAC), que los niveles de AMPc intracelular (AMPci) son regulados por la proteína de resistencia a multidrogas, MRP4, quien media su exclusión. Dado que el bloque farmacológico o por shRNA de este transportador determina una inhibición de la proliferación sin modificar los niveles de AMPci, nos propusimos evaluar el papel del AMPc extracelular (AMPce) y sus posibles blancos de acción. Mediante ensayos de unión y estudios de proliferación por incorporación de ³Htimidina, hemos descrito la presencia de sitios de unión específicos y saturables para AMPc y la capacidad del AMPce de inducir proliferación en los modelos de LMA y PDAC. Adenosina y ADP, productos del metabolismo de AMPc no determinaron cambios específicos en la unión de ³H-AMPc ni en la proliferación celular. El estímulo con AMPc induce la activación de la vía proliferativa de ERK y disminuye los niveles de AMPci. Ambos procesos resultaron sensibles al tratamiento con *toxina pertussis*, sugiriendo a un GPCR acoplado a Gai como blanco del AMPce. Por otra parte, observamos un incremento en el número de sitios de unión en los clones shMRP4 de LMA y PDAC. La existencia de este mecanismo compensatorio le da relevancia al circuito MRP4/AMPc/receptor. Estos resultados nos permiten postular al AMPc como un factor autocrino de crecimiento aportando complejidad al sistema de señales mediadas por este segundo mensajero.

352. (698) EVALUACIÓN DEL COMPONENTE CELULAR ESTROMAL EN MODELOS XENO- Y SINGENEICOS IN VIVO DE LINFOMAS T HUMANO Y MURINO

Amoros M.¹; Díaz Flaque M.²; Sterle H.²; Caryol F.²; Gutierrez L.¹; Bayo J.³; Mazzolini G.³; Podhajcer O.¹; Cremaschi G.²; Bolontrade M.¹

Fundación Instituto Leloir¹; Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET, Laboratorio de Neuroinmunomodulación²; Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral³.

La progresión tumoral en enfermedades hematológicas agresivas está modulada por factores microambientales, entre ellos

células estromales que regulan a células neoplásicas. Las Células Madre Mesenquimales (MSC) tienen un rol inmunomodulador en microambientes inflamatorios tales como un tumor. A fin de analizar la participación de MSC como inmunomoduladores en la progresión tumoral de leucemias linfoblásticas tipo T desarrollamos dos modelos in vivo tanto en un microambiente inmunocompetente (singeneico murino), como inmunodeficiente (xenomodelo/ratones inmunosuprimidos). El componente estromal celular no perteneciente a sistema inmune fue aportado en ambos modelos por MSC. Evaluamos la incorporación de MSC en linfomas previamente establecidos y medimos su alojamiento en el tumor. Las MSC fueron marcadas con DiR+/CMDil+ e inyectadas de forma intravenosa en dosis de 1×10^6 - 4×10^6 células durante la tercera semana luego de la formación del tumor. Se evaluó su presencia en el tumor mediante visualización en tiempo real (DiR+) y posterior visualización microscópica (detección de señal CMDil+). Los niveles de MSC en el tumor en el modelo inmunosuprimido alcanzaron $9.47 \times 10^7 \pm 2.03$ p2/sec/cm2/sr (señal infrarroja) indicando una alta capacidad de arribo de las células estromales en el microambiente aportado por células hematológicas neoplásicas. Los niveles de MSC en el tumor primario en el modelo murino alcanzaron $3.58 \times 10^7 \pm 1.74$ p2/sec/cm2/sr con localización también detectada en sitios de metástasis. El análisis histológico corroboró presencia de señal infrarroja con presencia de MSC. El establecimiento de estos modelos tumorales dependiente- e independiente de sistema inmune es de gran utilidad para evaluar la progresión tumoral asociada al rol de las MSC como inmunomoduladores, así como también en un futuro analizar la regulación ejercida por factores neuroendócrinos en la variable asociada de componente estromal celular aportado por las MSC

353. (705) EFECTO DEL EXTRACTO DE MAITAKE PRO4X EN LA PREVENCIÓN DEL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA MURINO

Roldán Deamicis A.; Balogh G.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-CONICET y Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina, Buenos Aires.

Los β -glucanos son inmunopotenciadores y podrían contribuir a inhibir el crecimiento tumoral. En este trabajo investigamos los efectos de la Fracción D del hongo comestible *Grifola frondosa* (Maitake), rica en β -glucanos, sobre la prevención de la carcinogénesis mamaria en ratones BALB/c. Utilizamos un extracto de dicha fracción conocido como Maitake D Fraction Pro4X (Pro4X) (Mushroom Wisdom, N.Y, USA). Empleamos 12 ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas, que fueron divididos en dos grupos: un grupo control y un grupo tratado con Pro4X. Los tratamientos fueron realizados por inyección IP diaria (PBS en el grupo control y 5mg/Kg de Pro4X en el grupo tratado) durante 17 días consecutivos. Luego se indujo el proceso de carcinogénesis mamaria por inyección IP de 2×10^5 células tumorales murinas LM3. Los animales se chequearon diariamente a partir de los 15 días de inducción tumoral, para observar el desarrollo tumoral mamario. A los 40 días luego de la inducción tumoral, observamos que el 80% de los animales del grupo control habían desarrollado tumor (4 de 5), mientras que en el grupo tratado el 57% desarrolló tumor (4 de 7). Por otro lado, también observamos que el tratamiento con Pro4X redujo la mortalidad total desde el 40% (en el grupo control) hasta el 14% (en el grupo tratado). La densidad de vasos sanguíneos fue significativamente menor (Student. $p < 0.005$) en los tejidos tumorales de los animales que recibieron Pro4X (0.028 ± 0.024 vasos sanguíneos/mm²; media \pm SD) con respecto a los controles (0.637 ± 0.175 vasos sanguíneos/mm²; media \pm SD). Nuestros resultados sugieren que la Fracción D de Maitake administrada a ratones previene el desarrollo de tumorigénesis mamaria, aumenta la sobrevida y disminuye el proceso de angiogénesis. Aunque aún falta determinar cuál es la sustancia activa del extracto y el mecanismo molecular por el cual actúa, en el futuro podría ser empleado como potencial agente preventivo de la tumorigénesis mamaria en poblaciones de riesgo.

354. (718) ESTUDIOS DE RESISTENCIA CONCOMITANTE EN CANCER DE PROSTATA

Gueron G.¹; Carabelos M.¹; Paez A.¹; Elguero B.¹; Manchuca D.²; Chiarella P.²; Binaghi M.¹; Meiss R.³; Ruggiero R.²; Vázquez E.¹

IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; División Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina²; Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires³.

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres occidentales. La Resistencia Concomitante (RC) antitumoral es el fenómeno según el cual un individuo portador de un tumor inhibe o retarda el crecimiento de un implante tumoral secundario. Se sugirió que componentes inmunológicos como no-inmunológicos pueden participar de este proceso. En linfoma (LB) se comprobó que la RC correlaciona con la actividad de factores séricos que inhiben la proliferación de las células tumorales y que han sido identificados como una mezcla de meta- y orto-tirosina. El objetivo de este trabajo fue validar en tumores de PCa humano creciendo como xenotransplantes en ratones nude, el efecto de RC reportado en tumores LB. Ratones atímicos desnudos machos de 6-8 semanas (n=10) se separaron en dos grupos: control y experimental. El grupo experimental (n=5) fue inyectado sc con células PC3 (1 x 10⁶). Transcurridos 14 días después de la primera inyección, los animales se inocularon nuevamente con células PC3 (2do desafío). El grupo control (n=5) recibió solo la inoculación secundaria. El crecimiento del implante tumoral secundario se redujo significativamente (92%; P<0,05) en los ratones experimentales a los 27 días de generación de los xenotransplantes primarios, respecto a los controles (volumen: 20 mm³ (grupo experimental) vs 250 mm³ (grupo control)). En el suero de los animales que presentaban RC se detectaron meta y orto tirosina, ausentes en el suero de los controles. Los resultados obtenidos muestran que el fenómeno de RC también se produce en tumores prostáticos y representan el punto de partida para dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales la meta- y orto-tirosina inhiben el crecimiento de metástasis prostáticas.

355. (728) IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON AZT SOBRE LAS ACTIVIDADES EXTRA-TELOMÉRICAS DE LA TELOMERASA EN EL MODELO DE CARCINOMA MAMARIO MURINO F3II

Armando R.; Alonso D.; Mengual Gómez D.; Gómez D.
Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires.

La inmortalidad celular es uno de los hitos biológicos del cáncer. La mayoría de las células tumorales tienen un potencial replicativo ilimitado dado en un 90% de los casos por la holoenzima telomerasa. Esta enzima es capaz de mantener la longitud de los telómeros a partir del agregado de repeticiones TTAGGG al extremo de los cromosomas. Además de su actividad en el mantenimiento telomérico (actividad canónica), existen actividades extra-teloméricas (no canónicas) de la telomerasa que en su conjunto tienen una actividad protumoral. Una de las más estudiadas es la regulación transcripcional en las vías de señalización Wnt-b-catenina y NF-kb, ambas relacionadas con la proliferación celular y la progresión tumoral. Nuestro grupo determinó que el tratamiento prolongado de células tumorales con azidotimidina (AZT) provoca el acortamiento telomérico, lo cual conlleva a la entrada en senescencia y apoptosis de las células tratadas. Este efecto está dado por la incorporación diferencial del AZT al ADN telomérico. Actualmente no existen evidencias de que la inhibición de la actividad telomerasa esté vinculada con sus actividades extra-teloméricas. El presente trabajo analiza el efecto del tratamiento con AZT sobre los genes modulados por las vías de señalización Wnt-b-catenina y NF-kb en células de carcinoma mamario murino (F3II). Se realizó una IC-50 para definir la mejor dosis a utilizar en los tratamientos. Los resultados obtenidos a partir de la exposición durante un periodo mínimo de 5 pasajes con AZT (600 µM) sugieren un vínculo entre la inhibición de la telomerasa y la regulación en la transcripción de genes target de las vías antes mencionadas (cyc-D1, c-Myc, IL6, y TNF-α).

Esto nos permite postular a dicha molécula como un inhibidor no solo de la actividad convencional de la telomerasa, sino también como un efector frente a otras actividades de esta enzima independientes de telómero.

356. (742) ESTUDIO DE LA EXPRESION DE MOLECULAS RELACIONADAS CON LA ANGIOGENESIS EN EL CARCINOMA RENAL DE CELULAS CLARAS

Aguirre M.¹; Stoyanoff T.¹; Todaro J.¹; Espada J.²; Zimmermann M.¹; Brandan N.¹

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad Nacional del Nordeste¹; Servicio de Urología, Hospital "J.R. Vidal" Corrientes².

El carcinoma renal de células claras (CRCC) es una patología de incidencia creciente. Se caracteriza por su comienzo insidioso, manifestaciones clínicas variables, resistencia a la radio y quimioterapia. La expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), regulador predominante de la angiogénesis, ha sido reportada como indicador de la progresión en varios tipos de tumores sólidos. A pesar de los avances en el tratamiento de CRCC con terapias antiangiogénicas, todavía hay controversias con respecto a la expresión de sus targets en las células tumorales y en los componentes de la microvasculatura tumoral. El objetivo de este estudio fue investigar la expresión de moléculas angiogénicas: VEGF, su receptor (VEGF-R2) y PECAM (CD31) en muestras de CRCC para describir su patrón de expresión para su correlación con indicadores clínico-patológicos. Secciones de tejido tumoral (core y periferia) y distal normal de pacientes sometidos a nefrectomía radical (n=10) fueron analizadas por inmunohistoquímica para VEGF, VEGF-R2 y PECAM. Se verificó similar inmunoreactividad para VEGF y VEGF-R2 con patrón granular citoplásmico y membranoso en células tumorales, tubulares renales y células endoteliales en todas las muestras independientemente de su grado y estadificación. La expresión de CD31, indicativa de la densidad microvascular intratumoral, se observó también con igual intensidad en todas las muestras. Los patrones de expresión de fueron similares entre las secciones de core y periferia del tumor, presumiblemente debido a que la vasculatura deriva de las mismas células endoteliales primarias. Estos resultados brindan nuevos aportes acerca de la localización de VEGF, VEGF-R2 y PECAM y de su rol en la angiogénesis y neovascularización del CRCC, por lo que se impone continuar ampliando la casuística para correlacionar los datos con parámetros clínico-patológicos de progresión tumoral y optimizar la terapia antiangiogénica.

357. (752) CÁNCER DE PRÓSTATA Y MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO MESENCIMAL (TEM). ESTUDIOS EN LÍNEAS CELULARES

Mencucci M.; Rosso M.; Besso M.; Abascal M.; Moiola C.; De Siervi A.; Vázquez-Levin M.

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET.

La TEM resulta en un aumento de la migración celular, invasión y metástasis. Durante la TEM se pierde la expresión de Cadherina epitelial (Cade) y se expresan marcadores mesenquimales como vimentina y cadherina neural (CadN). Parte de las alteraciones en la expresión de Cade se atribuyen a la expresión de represores transcripcionales (Snail y Twist). La disminución de Cade se ha vinculado además a la expresión de Disadherina (Dys), proteína asociada a metástasis, recientemente vinculada a TEM. Dentro de los cánceres del tracto masculino, el de próstata es el de mayor incidencia y una de las principales causas de muerte. Si bien hay evidencias de la disminución de Cade y expresión de marcadores de TEM, los estudios son escasos y no hay antecedentes de la expresión de Dys. **Objetivo:** Evaluar la expresión de Cade y marcadores de TEM en 4 líneas celulares de cáncer de próstata humano: LNCaP (andrógeno dependiente), 22Rv1, C4-2 y PC3 (andrógeno independiente), con fenotipos invasivos diferentes. Métodos: Se realizaron cultivos celulares de LNCaP (metástasis en ganglio linfáticos), C4-2 (derivada de tumores generados por

inyección de LNCaP en ratones inmunodeficientes), 22Rv1 (derivada de tumores generados por inyección de la línea CWR22 en ratones) y PC3 (metástasis en hueso). Las evaluaciones incluyeron ensayos de RT-PCR-tiempo real para transcritos y "Western immunoblotting" para proteínas. **Resultados:** Los estudios revelaron a) Niveles variables de Cade (expresión máxima en C4-2 y mínima en PC3) b) Niveles altos de fragmento de proteólisis de Cade, CTF1, en las células C4-2 c) Expresión de Vimentina y CadN en PC3 d) Niveles variables de Snail y Twist, sin asociación con Cade e) Expresión de Dys en PC3. **Conclusión:** Los estudios revelan diferencias en los niveles de expresión de Cade y marcadores de la TEM en las líneas celulares, en concordancia con su origen tisular y carácter invasivo. Asimismo se describe, por 1ra vez, la expresión de Dys en la línea celular PC3.

358. (763) ANÁLISIS BIONFORMÁTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ASOCIACIONES GEN-ENFERMEDAD EN EL CÁNCER DE ENDOMETRIO

Besso M.¹; Furlong L.²; Rosso M.¹; Abascal M.¹; Mencucci M.¹; Vázquez-Levin M.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET¹; Research Programme on Biomedical Informatics (GRIB), Hospital del Mar Medical Research Institute².

Introducción: El CE es la neoplasia del tracto reproductor más común en los países occidentales. En las últimas décadas, las investigaciones en el área han avanzado de modo sostenido, generando abundante información que revela su alta complejidad. Recientemente se han desarrollado herramientas bioinformáticas que permiten obtener información de asociaciones gen-enfermedad, para integrar el conocimiento alcanzado y abrir nuevas alternativas de análisis. **Objetivos:** Emplear herramientas bioinformáticas de análisis global de genes y enfermedades para identificar el estado del arte actual de genes implicados en el CE, integrando la información disponible e identificando nuevas moléculas asociadas a esta enfermedad. Los estudios se orientaron a la búsqueda de genes relacionados al gen *CDH1*, que codifica para Cadherina Epitelial (Cade), molécula de adhesión clave en la progresión tumoral. **Metodología:** Se utilizó la base de datos DisGeNET, empleando diferentes criterios de rastreo de genes asociados al CE y a *CDH1*. DisGeNET es una base de datos de asociación gen-enfermedad que integra diferentes fuentes de datos (UniProt, TD, GAD, MGD, LHGDN) y 3 redes curadas (UNIPROT, GAD, CTD) que cubren varios aspectos biomédicos. **Resultados:** 1) La realización de búsquedas de genes relacionados al CE y al gen *CDH1* arrojó un conjunto de 53 genes involucrados en la patología, asociados a regulación de apoptosis (PTEN), metabolismo (IGF1), angiogénesis (hif1), migración celular (CCL-2), entre otros. El análisis complementario de gen con la herramienta Gene Disease Association Ontology permitió interrelacionar los genes identificados. **Conclusión:** DisGeNET es una herramienta de gran utilidad para el rastreo de asociación gen-enfermedad en el CE y su relación con alteraciones en Cade así como para identificar posibles candidatos para su evaluación bioquímica. Su uso permitirá contribuir a dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes y profundizar en la comprensión de esta patología.

359. (771) RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES Y LA APOPTOSIS EN ADENOCARCINOMAS DE MAMA INDUCIDOS POR EL VIRUS POLIOMA DEL RATÓN

Smula S.; Sabatt J.; Geffner J.; Sanjuan N.

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El virus Polioma murino induce neoplasias múltiples luego de su inoculación en ratones, entre ellas carcinomas intraductales de mama muy similares a los observables en la mujer. No obstante, es poco lo que se conoce acerca de qué factores virales contribuyen al mantenimiento de la proliferación de una neoplasia. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de antígenos tempranos y tardíos de Polioma en neoplasias de mama inducidas por el virus y la presencia concomitante de apoptosis. Se inocularon ratones neonatos C3H BiDa por vía subcutánea con 106 upf de la cepa A2 del virus. A los 3 meses, las neoplasias de mama estaban

plenamente desarrolladas. Los animales fueron sacrificados y los tumores procesados histológicamente en cortes consecutivos seriados. Los antígenos virales tempranos, así como la proteína mayor de la cápside VP-1 y la proteína antiapoptótica Clusterina fueron detectados por inmunoperoxidasa, mientras que la presencia de apoptosis se determinó empleando el ensayo TUNEL (Promega), con los controles positivos, negativos e internos correspondientes. En todas las neoplasias se observó VP-1 y antígenos virales tempranos, distribuidos en forma de lóbulos, con extensas áreas del tumor negativas. La expresión de Clusterina fue intracitoplásmica, en vez de intranuclear (como se observa en la mama normal) y en forma de focos separados. En ningún tumor se observó apoptosis, que sí fue vista en el control positivo (mama normal y bazo). Se concluye que el mantenimiento de la actividad anti-apoptótica en estas neoplasias es un fenómeno independiente de la expresión constitutiva de antígenos de virus Polioma, siendo, probablemente, una propiedad adquirida por la neoplasia a posteriori de haber sido inducida por el virus. También se refuerza la hipótesis de que Polioma podría actuar por un mecanismo de "hit and run".

360. (781) LA SOBREEXPRESIÓN DE RAC3 ES UN FACTOR CLAVE PARA LA TRANSICIÓN EPITELIO MESENCUIMÁTICA INDUCIDA POR TNF

Panelo L.; Rubio M.; Fernández Larrosa P.; Costas M.

Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

RAC3 (coactivador de la familia p160) es un oncogén cuya sola sobreexpresión aumenta la capacidad proliferativa, resistencia a apoptosis e induce transición epitelio mesenquimática (TEM). Se ha reportado que TNF es capaz de inducir TEM a través del aumento en la actividad NF-kB en células tumorales de mama MCF7 que naturalmente sobreexpresan RAC3. Demostramos previamente que RAC3 es coactivador del factor de transcripción NF-kB y por tal motivo decidimos investigar si la sobreexpresión de RAC3 es necesaria para que TNF induzca TEM. Para ello clones de células no tumorales HEK293 obtenidos por transfección estable con el vector de expresión (RAC3) o el vector vacío (VV) fueron estimulados por 24hs en ausencia de SFB: Basal, TNF (10ng/ml), SZ (sulfazalacina 500mM inhibidor de NF-kB) o TNF+SZ. Luego se tomaron fotografías y se observó diferencias morfológicas cuando RAC3 esta sobreexpresado; además se cuantificó el número promedio de proyecciones citoplasmáticas, observándose un aumento del 200% con alto RAC3 con respecto al VV (Basal) e incrementándose a un 400% bajo el estímulo de TNF, efecto inhibido por SZ. Se analizó la actividad MMP por zimografía, a partir de medios condicionados, observándose un aumento del 300% con alto RAC3 respecto del VV (Basal) que se incrementa a un 558% bajo el estímulo de TNF, siendo revertido por Sz. Por Western Blot se observó un aumento del 100% en los niveles de Vimentina y disminución del 30% de E-cadherina con RAC3 sobreexpresado respecto del VV (Basal) y un aumento del 230% y disminución del 40% de las mismas bajo el estímulo de TNF, efectos que fueron bloqueados por SZ. Es de destacar que no se observó efecto de TNF sobre la actividad MMP y niveles de Vimentina y E-cadherina cuando RAC3 no está sobreexpresado. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de RAC3 es un componente clave para la TEM inducida por TNF.

361. (795) MIGRACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS HACIA MÉDULA ÓSEA, EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE VACUNA ANTI-MELANOMA

Campisano S.¹; Mac Keon S.²; Berguer P.²; Mordoh J.²; Wainstok R.^{1,2}

IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Fundación Instituto Leloir².

Hemos logrado desarrollar una vacuna compuesta por células dendríticas (CD) derivadas de médula ósea (MO) de ratón, capaz de inducir protección en el melanoma murino B16F1, la cual forma una estructura pseudolinfoide en el sitio de inyección. La vacuna

contiene CD CD11c+, neutrófilos Ly6-G+ y macrófagos F4/80+. En este trabajo evaluamos si el mecanismo de protección podría deberse en parte, al transporte de antígenos hacia MO por las células fagocíticas que componen la vacuna, y posterior presentación antigénica a linfocitos T (LT) residentes. Las células derivadas del cultivo primario de MO se incubaron *in vitro*, a razón de $0,5 \times 10^6$ células/ml con la proteína OVA (10 µg/ml) y posteriormente se inyectaron en ratones C57/BL6 wt. Luego de 4 hs, se extrajo la MO de cada ratón de forma independiente y se incubó con LT provenientes de un ratón OT-1, en una relación de 2×10^4 : 2×10^5 respectivamente. Se midió la proliferación celular específica mediante la incorporación de timidina tritiada (0.002 µCi/µl). Los controles negativos del experimento fueron: medio RPMI+10% FBS, LT OT-1 y CD sin previo estímulo; el control positivo fueron CD co-incubadas con OVA *in vitro*. Los resultados obtenidos indican que las células presentes en las MOs extraídas de ratones inyectados, estimularon significativamente la proliferación de LT OT-1 respecto a los controles negativos ($p < 0,001$); MO 1: (cpm Promedio ± Desvío Estándar): $860,5 \pm 49,9$, MO 2: $872,3 \pm 56,3$, MO 3: $550 \pm 161,1$, Control positivo: $443,3 \pm 99,4$, RPMI+10% FBS: $160,8 \pm 81,2$, LT: $200,1 \pm 69,4$, CD: $197 \pm 86,8$. Por lo tanto, las células que componen la vacuna fueron capaces de fagocitar OVA *in vitro*, migrar hacia la MO *in vivo* y presentar antígenos *in vitro* a LT respondedores a OVA. Entonces, el transporte de antígenos hacia MO y posterior priming con LT residentes podría ser parte del mecanismo de protección de la vacuna. Frente a estos resultados, nos interesaría evaluar la presencia de clones LT específicos en MO.

362. (796) EFECTOS SOBRE LA COLONIZACIÓN METASTÁSICA PULMONAR DE DISTINTOS ESQUEMAS DE ADMINISTRACIÓN DEL COMPUESTO HEMOSTÁTICO DESMOPRESINA (DDAVP) EN UN MODELO PRECLÍNICO DE CÁNCER MAMARIO

Garona J.¹; Pifano M.¹; Pastrian B.²; Iannucci N.^{2,3}; Gomez D.¹; Alonso D.¹; Ripoll G.¹

Laboratorio Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes¹; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Péptidos Terapéuticos, Chemo Romikin, Buenos Aires³.

La desmopresina (dDAVP) es un análogo sintético de la vasopresina con propiedades hemostáticas, utilizada durante la cirugía en pacientes con riesgo de sangrado. Estudios experimentales y clínicos recientes mostraron que el tratamiento perioperatorio con dDAVP minimiza la diseminación metastásica y la supervivencia de residuos tumorales, promoviendo efectos citostáticos y angiostáticos al actuar selectivamente sobre el receptor V2 presente en células cancerosas y endotelio. En este trabajo, se estudió la eficacia de dDAVP como agente antitumoral, en distintos esquemas de administración en dosis clínicamente relevantes (0,3 - 2 µg/kg), sobre el desarrollo de metástasis experimentales del carcinoma mamario F3II en ratones Balb/c. En primera instancia se estudió el efecto de dDAVP a distintos tiempos desde la inoculación i.v. de 2×10^5 células F3II (0 h, 24 h, 48 h y 7 días). El tratamiento con dDAVP disminuyó la formación de nódulos metastásicos en los tiempos iniciales (reducción del 62% a las 0 h y 50% a las 24 h; $p < 0,05$), pero no mostró efecto significativo en los tiempos posteriores (10% a las 48 h y 0% a los 7 días). La co-administración del anticoagulante enoxaparina s.c. (1 mg/kg/día durante 7 días) no modificó la actividad antimetastásica de dDAVP en las presentes condiciones experimentales. Además, se estudió el ácido tranexámico, un compuesto hemostático con actividad antifibrinolítica. La administración i.v. de tranexámico (10 mg/kg, 0 h y 24 h desde el desafío tumoral) no afectó la colonización metastásica. Se concluye que dDAVP reduce la formación de nódulos metastásicos durante etapas tempranas de la colonización pulmonar experimental. El efecto no dependería de una acción hemostática directa, ya que no es interferida por el anticoagulante enoxaparina ni puede reproducirse con otro hemostático como el ácido tranexámico.

363. (797) EFECTO DE LA PROTEÍNA X DEL VIRUS HEPATITIS B (HBV) EN LA CARCINOGENESIS HEPÁTICA

Cuestas M.; Castillo A.; Castronuovo C.; Delfino C.; Gentile E.; Oubiña J.; Mathet V.

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: El carcinoma hepatocelular (HCC) representa el 70-85% de los tumores malignos hepáticos en el mundo. La infección crónica por el virus hepatitis B (HBV) contribuye con más de un 75% a los casos de HCC. La proteína X del HBV desempeña un rol principal en la oncogénesis hepática. La triple mutante de X I127T/K130M/V131I exhibe una actividad transactivadora mayor que la salvaje, contribuyendo significativamente a la hepatocarcinogénesis. Objetivo: Estudiar los efectos de la proteína X salvaje (Xsal) y de la triple mutante (Xmut) del HBV sobre los niveles expresión de diversos genes involucrados en la apoptosis, proliferación e inmortalización celular. Diseño del Estudio: La línea celular Huh7 fue transfectada con plásmidos que codifican Xsal y Xmut del HBV. Al cabo de 24 y 72 h. de expresión transitoria, los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-Tert* fueron evaluados mediante una RT-PCR-Multiplex semicuantitativa, mientras que la expresión de las proteínas c-Myc, c-IAP1 y 2, caspasas 3 y 9, tanquira y ganquirina se estudiaron mediante *Western Blot*. Todos los resultados fueron comparados con los obtenidos en la línea celular HepG2.2.15, establemente transfectada con el replicón del HBV. Resultados: Altos niveles de expresión de Xsal y Xmut (24 h. post-transfección) aumentan la expresión de los genes anti-apoptóticos *bcl-2*, c-IAP1, c-IAP2 y ganquirina. Bajos niveles de expresión de Xsal y Xmut (72 h. post-transfección) disminuyen la expresión de algunos de estos genes anti-apoptóticos y no poseen efecto significativo sobre los restantes. La relación entre los ARNm de *bcl-2/bax* estuvo incrementada a las 24 h. pero fue igual al control a las 72 h post-transfección. Conclusiones: Niveles elevados de X -independientemente de su naturaleza salvaje o mutada- inhibirían la apoptosis mientras que bajos niveles de esta proteína la promoverían. Los resultados observados con Xsal y Xmut a altas concentraciones se correlacionan con los obtenidos en las células HepG2.2.15.

364. (800) INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO MEDIANTE NANOCOMPLEJOS DE MAGNETITA Y CATALASA

Municoy S.^{1,2,3}; Ibanez I.^{1,2}; Duran H.^{1,2,4}; Bellino M.^{1,2}.

Comisión Nacional de Energía Atómica¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; Universidad Nacional de San Martín-3IA³; Universidad Nacional de San Martín-ECyT⁴.

Niveles moderados de H₂O₂ pueden estimular la proliferación celular mientras que su secuestro puede inhibirla. La catalasa (CAT) degrada el H₂O₂ y ha sido propuesta como un agente antiproliferativo para células tumorales. La asociación de nanomateriales con biomoléculas avanza como una novedosa vía de detección o tratamiento para un gran espectro de enfermedades. El desarrollo de nanocomplejos versátiles de biomoléculas y magnetita continúa siendo un desafío. Aquí evaluamos el efecto de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (MNPs) biofuncionalizadas con CAT sobre la proliferación de células tumorales. Las MNPs fueron sintetizadas por co-precipitación y se mezclaron con CAT formando complejos MNP@CAT. La estabilidad de los complejos fue analizada por Dispersión de Luz Dinámica y la actividad de CAT se determinó espectrofotométricamente. Células de melanoma humano A375 fueron tratadas con CAT, MNPs o MNP@CAT para evaluar el efecto de los MNP@CAT en la proliferación celular, la cual fue evaluada mediante el ensayo de MTT. Los complejos MNP@CAT exhibieron alta estabilidad y actividad catalítica en el tiempo. La proliferación celular disminuyó ($p < 0,01$) en presencia de MNP@CAT en comparación con los controles no tratados y con una menor dispersión entre experimentos con respecto al tratamiento con CAT mientras que no fue afectada por las MNPs. Las células incubadas con MNPs y expuestas a imanes para removerlas alcanzaron niveles similares de proliferación en comparación con células no tratadas. Además, la capacidad de los

complejos de ser removidos del medio celular mediante campos magnéticos fue optimizada con el agregado de glutaraldehído durante el proceso de formación de los MNP@CAT. Concluimos que las MNPs son un vehículo promisorio para el transporte de CAT mejorando su efecto antiproliferativo en células tumorales con la ventaja de que los complejos MNP@CAT podrían ser fácilmente dirigidos o removidos mediante guía magnética.

365. (838) ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO IN VIVO DE CORIOCARCINOMA: UN ESTUDIO PRELIMINAR

Pibuel M.¹; Mascaro M.¹; Diaz M.¹; Lompardía S.¹; Zotta E.²; Hajos S.¹

Cátedra de Inmunología, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

El coriocarcinoma (CC) es un tumor epitelial maligno, único entre las neoplasias humanas ya que deriva de un evento gestacional como mola hidatiforme, aborto o embarazo a término. La hCG constituye el marcador de seguimiento. El ácido hialurónico (AH) es el principal glicosaminoglicano presente en la matriz extracelular (MEC) y sus principales receptores implicados en tumores son CD44 y RHAMM. Previamente demostramos la expresión de estas moléculas en biopsias humanas de CC. El objetivo de este trabajo fue establecer un modelo *in vivo* para estudiar características celulares y moleculares en CC. Se inocularon células de CC (JAR y JEG-3) en ratones nude por vía subcutánea (sc) y se midió el tumor con calibre. La línea JEG-3 se inoculó por vía intravenosa (iv) y ortotópica (ot, intravaginal) y se realizó dosaje seriado de hCG sérica por electroquimioluminiscencia. Como control se inocularon 150ul de PBS. En todos los casos (n=2/modelo), los órganos extraídos fueron fijados y evaluados por tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica. Los tumores mostraron un patrón bifásico en los tres modelos: células vacuoladas, grandes y pleomórficas con núcleos aberrantes (claras) y células de menor tamaño y núcleos definidos (pequeñas). Los tumores sc y ot JEG-3 presentaron una relación células claras/pequeñas mayor que los tumores sc JAR. En los últimos se observó hemorragia, en JEG-3 la sangre se encontró en espacios definidos. En los animales que desarrollaron tumor se encontró aumentada la hCG sérica. En el modelo iv se observó expresión de AH y CD44 asociado al infiltrado leucocitario próximo al tumor, y en el modelo ot sólo tinción de AH. Además, la expresión de AH en bronquios y endometrio fue más intensa en el tejido control que en el invadido por el tumor. Estos resultados concuerdan con los hallados en biopsias humanas. Se concluye que los modelos ot e iv empleando la línea JEG-3 podrían ser útiles para el estudio del rol de la MEC en la fisiopatología de CC.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 2

366. (97) LA VARIANTE POLIMÓRFICA DEL RECEPTOR P2X7 GLN460ARG ASOCIADA A DEPRESIÓN TIENE UN PERFIL DIFERENCIAL DE ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Aprile-García F.^{1,2}; Budziski M.¹; Yankilevich P.¹; Antunica Noguero M.^{1,2}; Liberman A.¹; Arzt E.^{1,2}

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBiBA)- CONICET - Partner Institute Of The Max Planck Society¹; Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

La activación de los receptores P2X7 por ATP modifica la expresión génica. Estudios genéticos describieron una asociación significativa entre depresión y desorden bipolar y la variante polimórfica del gen P2X7 Gln460Arg. Previamente demostramos que esta variante disminuye la función del receptor al ser coexpresada con la variante normal. En este trabajo estudiamos el perfil de expresión génica asociado a la activación de las distintas variantes de P2X7 mediante la técnica de microarray. Se utilizaron clones HEK293 sobreexpresores de cada variante de P2X7 activados

con BzATP (50µM): clones P2X7 wild type (P2X7-WT), clones P2X7 que expresan la mutación (P2X7-Gln460Arg) y clones coexpresores de ambas variantes. Se realizó un análisis global bioinformático (Gene Set Enrichment Analysis), comparando 2 grupos de datos: clones P2X7-WT y clones P2X7-Gln460Arg versus clones coexpresores. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en grupos de genes ligados a inflamación, función neuronal y desórdenes psiquiátricos: genes de la vía de señalización de NFκB y AP-1, blancos de CREB1, señalización de IL-6, genes sobre-expresados en depresión mayor. Luego se buscaron genes de interés, tomando con un criterio de corte de cambio en su expresión mayor a 1,5 (sobre o subregulado) y un valor estadístico $p < 0,05$. Se obtuvieron 23 genes candidatos, de los cuales 2 están fuertemente relacionados con inflamación y trastornos psiquiátricos: CHUK (conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase) ($FC = -1,72$ y $p < 0,00023$) y RCAN1 (regulator of calcineurin 1) ($FC = 1,91$ y $p < 0,00034$). Estos genes fueron validados por qPCR, replicándose los datos obtenidos en el microarray. Así, la activación de las distintas variantes de P2X7 altera la expresión génica, incluyendo genes asociados con inflamación y función neuronal, sugiriendo una explicación para la asociación entre la variante polimórfica de P2X7 y trastornos psiquiátricos. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11).

367. (152) EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN USF1 Y SU GEN BLANCO CDK1 MEDIAN LA PROLIFERACIÓN DEPENDIENTE DE PROGESTINA EN CÉLULAS ESTROMALES DE ENDOMETRIO

Vallejo G.¹; Mestre-Citrinovit A.¹; La Greca A.¹; Winterhager E.³; Beato M.²; Saragüeta P.¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Centre de Regulaci Genmica, España²; Institut Fr Molekulare Biologie, Universitaetsklinikum Duisburg-Essen, Alemania³.

Mostramos previamente que la activación de Erk y Akt dependiente de progesterona (R5020 10-10M) modula la expresión temprana de factores de transcripción y reguladores del ciclo celular (microarreglo de ADNc) asociados a la proliferación de las células estromales de endometrio de la línea celular UIII. Nos proponemos estudiar la participación del factor de transcripción USF1 -identificado en el microarreglo- vía la regulación transcripcional de su gen blanco Cdk1 en la proliferación progesterona-dependiente de las células estromales *in vitro* y del estroma decidual *in vivo*. La cinética de expresión proteica de USF1 y CDK1 en células UIII tratadas con R5020 10-10M (R) o etanol (OH) mostró que USF1 y CDK1 se inducen a las 6 (USF1: $3 \pm 0,7$; CDK1: $3,2 \pm 0,7$ R/OH) y 24hs (USF1: $1,2 \pm 0,1$; CDK1: $1,9 \pm 0,5$ R/OH), separados por un nivel basal a las 12hs (USF1: $0,46 \pm 0,05$; CDK1: $0,91 \pm 0,16$ R/OH). La progesterona promovió el reclutamiento de USF1 a dos sitios de unión en la región promotora proximal de Cdk1 (ChIP). Además, el silenciamiento de CDK1 bloqueó la respuesta proliferativa a R5020 en células UIII (R: $1,5 \pm 0,1$; R-siRNAcontrol: $1,7 \pm 0,1$; R-siRNACdk1: $0,62 \pm 0,05$ veces de nro. de células respecto a OH). Los experimentos de preñez mostraron que la expresión de USF1 es máxima a los 2 días post coito (dpc) (2dpc: $0,36 \pm 0,05$; 6dpc: $0,09 \pm 0,01$; 8dpc: $0,09$ unidades arbitrarias (UA)), mientras que CDK1 aumenta a los 6 y 8 dpc (2dpc: $0,24 \pm 0,01$; 6dpc: $0,32 \pm 0,07$; 8dpc: $0,48$ UA). USF1 se localiza uniformemente dentro del sitio de implantación 8dpc (IHQ). CDK1 difiere en el antimesometrio, donde se localiza en el borde de la decidua. El tratamiento con la antiprogesterona onapristona a los 6 y 7 dpc redujo la expresión de CDK1 (65%). En conjunto estos resultados muestran que el factor de transcripción USF1 a través de la inducción de Cdk1 media la proliferación inducida por progesterona en las células estromales de endometrio *in vitro* y sugieren la participación de CDK1 en la proliferación de la decidua *in vivo*.

368. (170) REGULACIÓN CRUZADA ENTRE LAS VÍAS RAS/MEK/ERK Y PI3K/AKT/MTOR INDUCIDA POR EL RECEPTOR H2 A HISTAMINA

Alonso M.¹; García C.²; Baldi A.¹; Davio C.²; Fernández N.²; Shayo C.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

El receptor H2 a histamina (H2R) pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) y conduce a la producción de AMPc en muchos tipos celulares. Reportes recientes indican que numerosos GPCRs son capaces de modular las vías ERK y AKT, implicadas en la supervivencia celular. En base a estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo es estudiar la modulación de estas vías por el H2R en células HEK293T transfectadas. Observamos por western blot que la activación del H2R estimulada con antamina, agonista específico del H2R, conduce al aumento en los niveles de pERK y a la disminución de pAKT ($p < 0,001$, $n=3$). Con el fin de determinar el papel de la internalización del H2R en la modulación de dichas vías, utilizamos construcciones dominantes negativas (DN) de arrestina y de GRK2 y observamos que si bien dichas construcciones inhiben la internalización del H2R evaluada mediante ensayos de unión, no afectan la modulación de pERK ni de pAKT promovida por antamina. Más aun, demostramos que la inhibición de PKA por el péptido inhibidor PKI o la inhibición del EGFR por el inhibidor farmacológico AG1478 no afectan la modulación de las vías estudiadas. Finalmente, al cotransfectar las células con las construcciones DN de Ras y de dinamina, determinamos que estas proteínas son necesarias para la modulación de pERK por antamina la cual también involucra a la activación de PI3K y mTOR ya que se bloquea al utilizar los inhibidores farmacológicos de PI3K (LY294002) y de mTOR (rapamicina) ($p < 0,01$, $n=3$). A su vez, el tratamiento con el inhibidor de MEK (PD98059) inhibió la modulación de pAKT por antamina ($p < 0,01$, $n=3$). Los resultados obtenidos describen la modulación de la vía de RAS/MEK/ERK por el receptor H2R y demuestran por primera vez, la existencia de un mecanismo de regulación cruzada entre las vías RAS/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR, sugiriendo que la respuesta final del H2R resultará del balance de las dos vías principales de supervivencia celular.

369. (196) EFECTOS DE IL-1 β SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN FIBROSIS QUÍSTICA

Clauzure M.; Valdivieso A.; Massip Copiz M.; Santa Coloma T.

Instituto de Investigaciones Biomédicas-UCA-CONICET.

Los pacientes con fibrosis quística (FQ) presentan una elevada concentración de citoquinas en el esputo y un estado inflamatorio general. Además, las células FQ en cultivo producen diversas citoquinas en exceso, incluyendo interleuquina 1 β (IL-1 β). Hemos demostrado anteriormente que la IL-1 β , a dosis bajas ($\sim 0,5$ - $1,0$ ng/ml, ~ 30 pM), puede estimular la expresión de CFTR en las células T84 de carcinoma de colon, a través de la señalización de NF- κ B. Sin embargo, a dosis más altas ($> 2,5$ ng/ml, ~ 150 pM), IL-1 β inhibe la expresión de ARNm de CFTR. Por otro lado, mediante el uso de la técnica de "differential display", encontramos dos genes con expresión reducida en las células FQ, correspondiente a las proteínas mitocondriales CISD1 y MTND4. La última es una subunidad clave para la actividad de Complejo I mitocondrial (Cm-I); consecuentemente, más tarde encontramos una actividad reducida de Cm-I en células de FQ. En este trabajo demostramos que la IL-1 β reduce la actividad de Cm-I y aumenta los niveles de ROS mitocondrial de S9 (células IB3-1 (FQ) "rescatadas") o de células Caco-2/pRSctrl (shRNA de control) a valores comparables a los de IB3-1 o Caco-2/pRS26 células (shRNA específico para CFTR). Asimismo, los resultados sugieren que en estos efectos de IL-1 β estarían involucradas las vías de señalización de NF- κ B y p38, pero no la de ERK1/2 o la de JNK. Agradecimientos: Subsidios CONICET (PIP 2009-2011, PIP 2012-2014), ANPCYT (PICT-2007,0628) y UCA. Becas CONICET (MC, MMMC) y UCA (AGV).

370. (287) PARTICIPACIÓN DE SOCS3 EN LOS EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE IL10 EN MIOCARDIÓCITOS INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI

Penas F.; Hovsepian E.; Siffo S.; Mirkin G.; Goren N.

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

La infección por *Trypanosoma cruzi* (*Tc*) produce una intensa respuesta inflamatoria, que es crítica para el control de la enfermedad de Chagas. IL10 es una citoquina que ha sido identificada como moduladora de la reacción inflamatoria vía activación de STAT3. Resultados previos de nuestro grupo en miocardiocitos infectados con *Tc* muestran que IL10 aumenta la expresión de SOCS3, inhibe la activación de NF κ B, la expresión de NOS2, MMP9 y 2 y citoquinas pro-inflamatorias. En este trabajo quisimos demostrar la participación de SOCS3 en los efectos de IL10 en miocardiocitos infectados con *Tc*. Mediante Western blot (Wb) determinamos que la infección con *Tc* y el tratamiento con IL-10 (20ng/ml) inducen fosforilación de STAT3 a los 30 min. Luego, demostramos por QRT-PCR que IL6 no se expresa en ese intervalo de tiempo. Además, observamos que IL10 induce un aumento mayor de la expresión del ARNm de SOCS3 que el inducido por *Tc* ($p < 0,05$). A partir de estos resultados, decidimos silenciar SOCS3 por medio de ARN de interferencia (siARN) para constatar su participación en los efectos ejercidos por IL10. Observamos que en condiciones de silenciamiento, el tratamiento con IL10 no logra inhibir los distintos mediadores inflamatorios en las células infectadas, reestableciéndose los valores de expresión de NOS2 (Wb) y la producción de nitritos (μ M) *Tc* 40 ± 4 ; *Tc*+IL-10 $23 \pm 3,6$; *Tc*+IL-10+siARN $39 \pm 4,2$ $p < 0,05$. Luego, determinamos por QRT-PCR que tras el silenciamiento de SOCS3, IL10 no logra inhibir TNFa e IL6 a las 4h post infección (pi), como tampoco la expresión de MMP9 y 2 a las 48h pi. Asimismo observamos, por inmunofluorescencia, que IL10 aumenta el parasitismo celular ($p < 0,05$). En cambio, en las células *Tc*+IL10+siARN no observamos diferencias significativas respecto de las infectadas y no tratadas. Los resultados demuestran la participación de SOCS3 en los efectos moduladores de IL10 en miocardiocitos infectados con *Tc*.

371. (416) TRANSCRIPTOS DE INTEGRINA BETA 1 SON PROCESADOS ALTERNATIVAMENTE PARA PRODUCIR ARN MENSAJEROS DE DIFERENTE LONGITUD DURANTE EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

García Solá M.^{1,2}; Naipauer J.^{1,2}; Kordon E.^{1,3}; Coso O.^{1,2}
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET¹; Departamento de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³

Las integrinas son receptores de membrana heterodiméricos que constituyen la principal conexión entre la célula y el ambiente, jugando un rol crítico en el desarrollo normal y neoplásico de diferentes tejidos. La caracterización del ARNm de integrina $\beta 1$ de ratón (*Itgb1*) reveló en el 3'UTR, una señal proximal de poliadenilación alternativa (PAS1) que produce un ARNm 578pb más corto (*Itgb1-C*) que el conocido (*Itgb1-L*) generado por utilización de la señal distal (PAS2). Aunque presentan una localización diferente, PAS1 y PAS2 son idénticas entre sí. Los niveles de expresión para cada isoforma están determinados, al menos en parte, por el uso alternativo de estas señales durante los diferentes estadios del desarrollo de la glándula mamaria, siendo generalmente *Itgb1-L* más abundante que *Itgb1-C*. Para estudiar los mecanismos regulatorios que determinan la selección de dichas señales, utilizamos un plásmido reportero derivado de pRiG. Este vector provee un sitio múltiple de clonado (MCS) precedido por la secuencia codificante de la proteína roja fluorescente y seguido por un sitio interno de entrada del ribosoma y la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente. En el MCS se insertaron las secuencias PAS1 y PAS2, rodeadas cada una de su entorno nucleotídico (200bp). Células mamarias HC11 fueron transfectadas con estos constructos y analizadas por citometría de flujo. Los resultados muestran que la señal PAS2 funciona como una señal fuerte, de elección más frecuente que la PAS1, lo cual es coherente con los niveles de expresión de las dos isoformas en mama. Asimismo, estos datos indican que el entorno nucleotídico que rodea las señales de corte y poliadenilación ejercen una importante influencia en la selección y uso de las mismas. Creemos que las herramientas moleculares presentadas aquí brindan una excelente oportunidad

de investigar los mecanismos que regulan la elección de diferentes sitios de poliadenilación alternativa según el contexto celular.

372. (535) LA FUSIÓN MITOCONDRIAL PARTICIPA EN LA ESTEROIDOGÉNESIS REGULANDO LA LOCALIZACIÓN DE STAR EN LA MITOCONDRIA A TRAVÉS DE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE ERK1/2 Y PKA

Bergé P.; Duarte A.; Podestá E.; Poderoso C.
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El paso limitante en la esteroidogénesis es la transferencia de colesterol de la membrana mitocondrial externa (MME) a la interna, facilitado por la proteína STAR (Steroidogenic Acute Regulatory). Existen evidencias importantes que sostienen que STAR de 30kDa actúa en la MME. En nuestro laboratorio, hemos descrito que la actividad de STAR depende de su fosforilación por ERK1/2 mitocondrial en células de Leydig MA-10. Demostramos que la fusión mitocondrial es esencial en la esteroidogénesis, a través de la regulación hormonal de la Mitofusina 2 (Mfn2), proteína central en la fusión. El objetivo del presente trabajo es analizar si la fusión mitocondrial y la fosforilación de STAR por ERK son mecanismos involucrados en la regulación de la localización de STAR en la mitocondria, incrementando el transporte de colesterol y la esteroidogénesis. En células de Leydig MA-10 observamos por RT-PCR semicuantitativa e inmunoblot, que la disminución de Mfn2 lleva a una inhibición significativa de la expresión génica de STAR y de su localización mitocondrial, estimuladas por hCG y 8Br-AMPC. Si la fusión mitocondrial se restablece, se recuperan los niveles del ARNm de STAR y de la proteína en la mitocondria. Demostramos que la sobreexpresión de una variante de STAR que no se fosforila por ERK evita la localización de STAR en la mitocondria. La participación de ERK fue corroborada mediante un ensayo de mitocondrias aisladas (MA). La inhibición de la fusión mitocondrial disminuye la producción de esteroides (progesterona; P4) en MA (fusión: 16 ± 2 vs sin fusión: $6 \pm 0,8$ ng/ml P4, $p < 0,01$). En presencia de STAR, ERK activa junto con PKA aumentó significativamente la esteroidogénesis en MA (sin quinasas: $4,8 \pm 0,5$ vs con quinasas: 9 ± 1 ng/ml P4, $p < 0,01$). Estos resultados sugieren que la transcripción génica de STAR requiere la fusión mitocondrial y su retención en la MME, la fosforilación de STAR por ERK, como mecanismos claves involucrados en la regulación del transporte de colesterol.

373. (605) EL ROL DE P66SHC EN LA HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Pérez H.; Alippe Y.; Elguero M.; Carreras M.; Poderoso J.
Laboratorio del Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas José de San Martín, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Buenos Aires.

De acuerdo a la teoría del envejecimiento por radicales libres, éste proceso se debe al daño oxidativo acumulado causado por las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas durante la respiración mitocondrial. P66^{shc} es un determinante genético de longevidad que regula la apoptosis y el metabolismo a través de la generación de ROS. Bajo este paradigma, el objetivo del trabajo es evaluar como p66^{shc} actúa sobre el metabolismo y fisiología mitocondrial durante el proceso de envejecimiento. Para esto, exploramos el metabolismo oxidativo en mitocondrias de cerebros e hígados en ratones Wild Type (WT) y KO para p66^{shc} (p66^{shc-/-}) desde los 3 hasta los 18 meses de edad. Observamos que el ratón p66^{shc-/-}, con una mayor longevidad, exhibe cambios en la función mitocondrial a lo largo del envejecimiento, tales como una reducción de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria con respecto a los individuos WT, y una reducción de la velocidad de producción de H₂O₂. A su vez, observamos que los ratones p66^{shc-/-} presentan dificultades para fijar grasas que se evidencia en una reducción del 25% en el peso corporal comparados a los WT. Todas estas condiciones favorecen la proliferación y retardan la apoptosis mediante mecanismos esenciales para la homeostasis mitocondrial como la biogénesis y la dinámica mito-

condrial. Teniendo en cuenta que la restricción calórica induce la expresión de proteínas involucradas en estos procesos, mediante WB y qPCR observamos una regulación de la expresión de proteínas relacionadas al mantenimiento de la fusión/fisión mitocondrial como son Drp1, Mfn2 y Opa1, así como también un aumento en la expresión del gen promotor de la biogénesis mitocondrial PGC1a. Estos resultados permiten concluir que la disminución de la tasa metabólica de los ratones p66^{shc-/-} mejora la homeostasis mitocondrial coordinando la biogénesis mitocondrial y el balance entre fusión/fisión de dichas organelas, conidiendo a un retraso del proceso de envejecimiento.

374. (650) REGULACIÓN DEL SISTEMA GLUCOCORTICOIDE POR LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR H1 A HISTAMINA. ROL DE JNK

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, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam. Sciencepark 903, 1098 XH, Amsterdam, Holanda².

La interacción entre la señalización de receptores acoplados a Proteína G (GPCRs) y los receptores a glucocorticoides (GR) ha sido previamente reportada. En particular, nosotros describimos la regulación dual de la actividad del GR por parte del receptor H1 a histamina, un GPCR acoplado a Gq/11. Dicha regulación consiste en una inhibición mediada por PLC y Rac, y una potenciación mediada por las subunidades Gβγ. Dado que la Jun Kinasa (JNK) y el GR regulan procesos comunes incluyendo inflamación, proliferación y apoptosis, hemos decidido estudiar el posible papel de JNK en la modulación histaminérgica. Para ello se cotransfectaron células HEK293T con el receptor H1, el GR y un sistema reportero de la actividad transcripcional del GR (TAT3-LUC). En este sistema, el inhibidor de JNK, SP600125, si bien aumenta la respuesta a Dexametasona (Dex) en un 30%, suprime completamente el efecto potenciador de la histamina. Consistentemente, utilizando una mutante del GR (S246A) insensible a la fosforilación por JNK, la respuesta a Dex se ve incrementada en 10 veces, mientras que la histamina no sólo pierde el efecto potenciador, sino que reduce la respuesta a Dex en un 30%. Por otra parte, la sobreexpresión de un activador de JNK (dominio REM), resulta en una disminución de un 50% de la respuesta a Dex junto con un aumento del efecto potenciador por parte de histamina en casi 4 veces. Nuestros resultados indican que si bien JNK disminuye la actividad del GR, participa en el efecto potenciador de la histamina. Si bien la histamina es clásicamente una molécula proinflamatoria, la respuesta cruzada con el GR podría proveer un mecanismo de control de la inflamación, al modular la actividad de JNK y permitir que los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides se desencadenen. Los resultados resultan relevantes dado que existen numerosas situaciones en las que ligandos de ambos sistemas son co-administrados, ya sea por separado o en una misma formulación.

375. (672) LA SOBREEXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE MEMBRANA OXER1, CON ALTA AFINIDAD PARA PRODUCTOS DE LA 5-LIPOXIGENASA, INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES ESTIMULADA POR AMPc

Cornejo Maciel F.; Neuman I.; Maloberti P.; Leone M.
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La regulación hormonal de la esteroidogénesis involucra al ácido araquidónico, precursor de los productos lipoxigenados necesarios para la inducción de la proteína STAR y activación de la esteroidogénesis, independientemente del estímulo que desencadena la respuesta. En otros sistemas, está postulado que los productos lipoxigenados son secretados y que funcionarían en for-

ma autócrina estimulando un receptor de membrana denominado OxeR1 perteneciente a los receptores acoplados a proteína G y con alta afinidad por 5-oxo-ETE, 5-HpETE y 5-HETE, productos de la 5-lipoxigenasa. En estudios previos demostramos la presencia del receptor OxeR1 en células esteroideogénicas humanas de la línea H295R productoras de mineralocorticoides. Farmacológicamente demostramos que el OxeR1 estaría involucrado, al menos en parte, en la acción del 8Br-AMPC, análogo permeable del segundo mensajero. El objetivo de este estudio fue identificar al OxeR1 como mediador de la respuesta hormonal. Para ello, el ADNc del OxeR1 obtenido de células adrenocorticales humanas H295R fue clonado en un vector de expresión. Esta construcción se utilizó para transfectar células esteroideogénicas murinas de Leydig en cultivo de la línea MA-10. Por western blot con anticuerpos que reconocen a la forma humana del receptor, se verificó que la transfección de esta construcción produce un aumento de los niveles del OxeR1. Concomitantemente, registramos un incremento significativo de la producción de progesterona estimulada por 8Br-AMPC (transfección control 245 ± 2 vs transfección ADNc OxeR1 299 ± 13 ng progesterona/ml, $P < 0.05$). En conclusión, este trabajo demuestra que los productos lipoxigenados actúan a través de receptores de membrana en la regulación de la síntesis de esteroides mediada por AMPc.

376. (751) EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE P-REX1 SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS EN CONDICIONES BASALES DE PROLIFERACIÓN

Wertheimer E.¹; Abba M.²; Pérez L.³; Kordon E.³; Kazanietz M.⁴

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET¹; Universidad Nacional de La Plata²; Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Departamento de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³; University of Pennsylvania School of Medicine, USA⁴

P-Rex1 es un Rac-GEF esencial para la activación de Rac1 y la migración inducida por ligandos de receptores ErbB en células de cáncer de mama. Esta proteína está sobreexpresada en cáncer de mama humano y en líneas celulares derivadas, de tipo luminal, como MCF-7, BT-474 y T-47D. Utilizando microarreglos de cDNA, en este trabajo se procedió a comparar el perfil de expresión de células T-47D crecidas en condiciones normales con medio completo en las cuales se había silenciado, o no, la expresión endógena de P-Rex por transfección transitoria de siRNAs específicos. El análisis de los datos reveló que P-Rex1 está involucrado en la regulación de la expresión de un número importante de genes en células T-47D mantenidas en condiciones basales de proliferación. En particular, entre los genes que se ven regulados diferencialmente por la presencia de P-Rex1 se encuentra el Zfp36 que codifica la proteína tristetraprolina (TTP), la cual es capaz de inducir la degradación de RNAs mensajeros de proteínas involucradas en procesos inflamatorios y en la invasividad de células tumorales. Los resultados del microarreglo indican que la expresión de TTP aumenta cuando P-Rex1 es silenciado. Estudios futuros determinarán la posible co-regulación de estos dos factores así como su participación, probablemente antagonica, en las redes de señalización implicadas en la tumorigénesis y la diseminación metastásica del cáncer de mama.

377. (843) RNA TRANSCRIPTOS DE HETEROCROMATINA SATELITAL: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN SU EXPRESIÓN Y MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN

Susperreguy S.; Toneatto J., Charó N., Pivien-Pilipuk G. *Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET, Buenos Aires.*

Las regiones centromérica y pericentromérica de los cromosomas eucariotas se caracterizan por presentar secuencias de ADN repetitiva, designadas satélite menor y mayor. En nuestro laboratorio estudiamos los eventos moleculares que se des-

encadenan durante el proceso de diferenciación adipocítica y resultados recientes demostraron un aumento en la expresión de los transcritos del satélite menor y mayor entre los días dos y cuatro de iniciado la adipogénesis. Además, empleando RIP (*RNA Immunoprecipitation*), encontramos que transcritos del satélite menor se unen a la proteína PML, sugiriendo que estos transcritos podrían formar parte de los gránulos PML y/o regular la función de la proteína PML. Si bien se han demostrado diferentes funciones para estos transcritos, tales como el ensamblado de la heterocromatina y la regulación de proteínas asociadas al ciclo celular, escasa información existe sobre cómo se regulan su transcripción y cómo llevan a cabo sus funciones biológicas. Por tal motivo los objetivos del trabajo son analizar durante el proceso de adipogénesis: 1) qué vías de transducción de señales están involucradas en la regulación de estos transcritos y 2) la formación de los gránulos PML como mecanismos efectores de la acción de los transcritos. Para el objetivo uno discutiremos los resultados obtenidos por RT-PCR de los niveles de estos transcritos en ensayos de diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 en presencia de diferentes inhibidores de kinasas (UO126 para MEK/ERK, LiCl para GSK3, H89 para la PKA, SB202190 para p38, y LY 249002 para PI3K). Para el objetivo dos, discutiremos nuestros ensayos de RIP evaluando los cambios en la interacción de la proteína PML con los transcritos satelitales durante el proceso de diferenciación de 3T3-L1. Para confirmar el rol de los gránulos PML como efectores de estos transcritos, evaluaremos por microscopía confocal si la sobreexpresión de estos transcritos afecta la formación y/o número de los gránulos PML.

CARDIOVASCULAR 2

378. (84) DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC SOBRE EL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO CARDÍACO EN RATAS ADULTAS

Juriol L.; Gobetto M.; Mendes Garrido F.; Cardelli Alcalde D.; Veiras L.; Elesgaray R.; Costa M.; Arranz C.; Tomat A. *Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Hemos mostrado que la deficiencia moderada de zinc durante el crecimiento intrauterino y postnatal programa hipertensión y alteraciones en la función cardíaca. Objetivo: evaluar mecanismos involucrados en estos cambios mediante el estudio del sistema del óxido nítrico (NO) y las enzimas antioxidantes cardíacas de ratas machos (m) y hembras (h) adultas expuestas a dicha deficiencia durante la vida fetal y el crecimiento. Ratas Wistar preñadas recibieron durante la preñez y la lactancia, una dieta baja en zinc (B:8 ppm) o una dieta control (C:30 ppm). Luego del destete, las crías nacidas de madres B se dividieron en 2 grupos: BC recibieron dieta control y BB continuaron con dieta deficiente. Las crías nacidas de madres C continuaron con dieta control (CC). A los 81 días, determinamos en corazón: actividad de NO sintasa (NOS) basal y de sus isoformas endotelial (e), neuronal e inducible, expresión proteica y del ARNm de eNOS mediante Western Blot y RT-qPCR, respectivamente, y actividad de glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Anova de 2 factores y test de Bonferroni. n=6 ratas c/ grupo. Crías BB y BC m y h presentaron menor actividad basal de NOS cardíaca respecto a CC m y h (* $p < 0,01$ vs CC). El NO sería principalmente sintetizado por la isoforma eNOS ya que la actividad basal se mostró disminuida con el bloqueante de Ca^{2+} -calmodulina en todos los grupos (# $p < 0,01$ vs basal NOS), pero no con los inhibidores específicos de las otras isoformas. No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica y del ARNm de la eNOS en BB y BC m y h respecto a sus controles. BB y BC m y h presentan una disminución de GPx respecto a CC m y h (* $p < 0,01$). No observándose diferencias en CAT y SOD entre los grupos estudiados. La deficiencia de zinc durante la vida fetal y postnatal programa, en m y h adultos una menor producción y biodisponibilidad de NO cardíaco debido a la menor actividad de la eNOS y a un incremento del estrés oxidativo.

379. (96) LA TIOREDOXINA-1 ATENUA LA DISFUNCIÓN VENTRICULAR Y MITOCONDRIAL POSTISQUÉMICA DEL MIOCARDIO ATONTADO EN RATONES TRANSGÉNICOS

Pérez V.1; Dannunzio V.1; Zaobornyj T.2; Valdez L.2; Boveris A.2; Gelpi R.1
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Fisiocoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

La tioredoxina-1 (Trx-1) es una enzima citosólica que mantiene el estado redox y confiere protección frente a la injuria por isquemia/reperusión disminuyendo el infarto de miocardio, sin embargo no hay estudios que evalúen los efectos de este sistema sobre el miocardio atontado. Objetivo: evaluar el comportamiento de la función ventricular y mitocondrial del miocardio atontado en ratones con sobreexpresión cardíaca de Trx-1 y dominantes negativo para Trx-1 (DN), comparados con ratones no transgénicos (NTG). Se utilizaron ratones NTG (n=10), Trx-1 (n=10) y DN (n=10). Los corazones fueron aislados y perfundidos según la técnica de Langendorff. Se realizaron 15min de isquemia global y 30min de reperusión (R). Se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, estado contráctil) y la presión diastólica final del VI (PDFVI, rigidez miocárdica). También se midió el consumo de oxígeno mitocondrial utilizando malato y glutamato como sustratos en estado 3 (E3). *p<0.05 vs NTG R; #p<0.05 vs. TRX-1 R; \$p<0.05 vs DN B (basal); \$p<0.05 vs NTG B. X±ESM. La sobreexpresión de Trx-1 mejora la recuperación del estado contráctil del miocardio atontado y la recuperación del consumo de oxígeno en E3 mitocondrial, comparado con los NTG y los DN. Por otro lado, exacerbó la rigidez miocárdica y redujo el consumo de oxígeno en E3 en el grupo DN con respecto al NTG y Trx-1. Nuestros datos sugieren que la protección de Trx-1 frente al miocardio atontado está relacionada con una mejoría en la función mitocondrial.

	PDVI B	PDVI R	PDFVI B	PDFVI R	E3 B	E3 R
NTG	87,1±7,1	26,1±7,2	9,1±1,0	18,7±2,7	140±4,6	127±13
Trx-1	91,4±4,6	57,4±4,9*	8,2±0,6	11,5±3,6	138±9,4	154±5,9
DN	99,2±5,4	29,2±7,0 [#]	7,7±1,0	37,6±6,7 [#]	162±6,5*	107±6,3 ^{#&\$}

380. (114) TRATAMIENTO CON PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC) DE RATAS WISTAR CON DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO, LA FLUIDEZ SANGUÍNEA, EL FUNCIONALISMO HEPÁTICO Y RENAL

Dominighini A.1; Gonzalez J.1; Crosetti D.1; Ronco M.2; Urli L.1; Francs D.2; Monti J.2; Wagner M.3; Carnovale C.2; Luquita A.1
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹; Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario²; Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

Infusiones de Lc o "muérdago criollo" en medicina popular se utiliza para dar mayor fluidez a la sangre disminuyendo el exceso de colesterol plasmático (Co). En ratas tratadas por vía i.p. con extracto crudo de Lc, observamos descenso del Co y aumento de viscosidad sanguínea (VS). Una fracción enriquecida en Proantocianidinas fue obtenida de Lc (PLc). Se analizó el efecto del tratamiento con PLc sobre la concentración de Co, la VS y el funcionalismo hepático (FH) y renal (FR). Ratas Wistar macho de 70 días de edad, fueron alimentadas durante 28 días con dieta estándar adicionada con Co (97% de pureza) 0,8 g/100g y aceite de maíz 28% (p/p); las cuales se separaron: Controles (C) (n=12) y Tratadas (T) (n=12) inyectadas i.p. durante 10 días cada 24 horas, con solución fisiológica (C) y con PLc 3 mg /100g peso corporal (T). El día 11, se anestesiaron, y se obtuvo sangre por punción

cardíaca. Se determinaron Co (método enzimático), CoHDL y CoLDL en plasma. Con viscosímetro rotacional a 37°C se determinaron VS y VP (plasma) y por cálculo VS relativa estandarizada a hematocrito del 45%(VSrs). FH se evaluó con: Fosfatasa Alcalina (ALP), Alanino aminotransferasa (GPT) y Apartato aminotransferasa (GOT), por métodos cinéticos (UI/ml). FR se evaluó determinando uremia (U) y creatinemia (Creat), por métodos enzimáticos (mg/dl). Resultados:(media±ES) Co (mg%):C:19,74±1,26, T:68,50±1,86*, Co HDL:C:28,80±0,62, T:23,17±0,86*; CoLDL:C:25,30±0,84,T:18,16±0,59* ; VSrs:C:5,65±0,29,T: 5,90±0,39(NS), ALP:C:672,85±16,01,T:640,25±9,29(NS); GOT:C:97,30±1,19, T: 88,33±1,57(NS); GPT:C:33,15±0,84,T:28,92±0,87(NS); U:C:11,45±0,29,T:11,00±0,37(NS); Creat: C:0,18±0,01,T:0,15±0,02(NS); Índice de Castelli (IC = Co/ Co HDL):C:4,18±0,10; T:2,75±0,15* (*p<0,05 vs. C). Conclusión: El tratamiento con PLc durante 10 días de ratas hipercolesterolémicas produce descenso de Co, Co HDL y CoLDL sin producir alteraciones en VS, ni en FH ni FR. La disminución del IC indica menor riesgo de enfermedad coronaria.

381. (318) EL CO-TRANSPORTADOR NA⁺/HCO₃⁻ ELECTROGÉNICO (NBCe1) CONTRIBUYE A LA INJURIA POR REPERFUSIÓN

Fantinelli J.; Orłowski A.; Aiello A.; Mosca S.
Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

En un trabajo reciente realizado en nuestro laboratorio demostramos que anticuerpos diseñados selectivamente contra los dominios extracelulares 3 (a-L3) y 4 (a-L4) de la isoforma electrogénica del co-transportador Na⁺/HCO₃⁻ (NBCe1) tienen efectos opuestos sobre la función del mismo: el a-L3 inhibe mientras que el a-L4 estimula al NBCe1. El objetivo del presente estudio fue evaluar el papel de estos anticuerpos sobre el tamaño del infarto (TI) y la disminución de la función miocárdica producidos por la isquemia y la reperusión. Corazones de rata Wistar aislados y perfundidos isovolumicamente fueron sometidos a 40 minutos de oclusión de la arteria coronaria descendente anterior seguidos de 1 hora de reperusión. a-L3 (dilución 1/500), a-L4 (dilución 1/500) o S0859 (10 mM), inhibidor selectivo del NBC, se administraron durante los primeros 10 min de la reperusión. Suero no-inmune (1/500) se administró como control de los anticuerpos. En 4 corazones no isquémicos se evaluó el efecto de S0859 sobre la contractilidad. TI se midió mediante la técnica de tinción con sales de trifeniltetrazolio. La presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI) y la presión diastólica final (PDFVI) se utilizaron para determinar la función sistólica y diastólica, respectivamente. El tratamiento con a-L3 y S0859 redujo significativamente el TI (16 ± 3% para a-L3, n=6, vs 32 ± 5%, n=4, en los corazones tratados con suero y 19 ± 3%, n=5, para S0859 vs 39 ± 2%, n=10, en corazones isquémicos no tratados). PDVI aumentó y PDFVI disminuyó después de a-L3 pero no después del tratamiento con S0859. La infusión de a-L4 no modificó el TI ni la disfunción miocárdica detectada en los corazones tratados con suero. El agregado de S0859 a corazones no isquémicos produjo un efecto inotrópico negativo, explicando posiblemente la ausencia de protección de la función sistólica con esta droga. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica mediante microscopía confocal e inmunoblotting se confirmó en cardiomiocitos la presencia del NBCe1 en el sarcolema y a lo largo del sistema tubular transverso. En resumen, estos datos muestran que el NBCe1 está involucrado en la lesión irreversible y en la disfunción miocárdica producidas por la isquemia-reperusión y que el bloqueo de dicho transportador sólo durante la reperusión ejerce un efecto cardioprotector.

382. (325) EL HIPOTIROIDISMO AFECTA AL ÓXIDO NÍTRICO CARDIACO ANTE UNA HEMORRAGIA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Rodríguez M.; Detomaso F.; Braga P.; Sarati L.; Balaszczuk A.; Fellet A.
Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Se pretende evaluar la participación del óxido nítrico (NO) en las alteraciones hemodinámicas ante la hemorragia en ratas

hipotiroides adultas. **Métodos:** ratas macho Sprague-Dawley eutiroides (E) e hipotiroides (h) de 18 meses de edad divididas en GrupoC (controles); GrupoH (hemorragia del 20% de la volemia); GrupoL+C (controles+L-NAME (0,5 mg/kg/h IV = 100 µl/h) y GrupoL+H (L-NAME +hemorragia). El hipotiroidismo se indujo con metimazol 0.02% en el agua de bebida durante 28 días. Se monitoreó de la presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca (FC) durante 120 min posteriores al sangrado. Se extrajo la aurícula derecha (A) y el ventrículo izquierdo (V) para determinar la actividad de la NO sintasa (NOS) (método de [14]-L-citrulina) y niveles proteicos de la enzima (western blot). Los resultados se expresan como la X±SEM, n=6/grupo. Análisis de la varianza seguido de test de Tukey. *p<0.05 vs. C; # p<0.05 vs EC. **Resultados:** La PAM disminuyó en el grupo H un 34% estabilizándose a los 90 minutos. En hipotiroides, el descenso fue del 48% y no se observó estabilización. El L-NAME indujo una recuperación de la PAM en los eutiroides sólo en los eutiroides. La hemorragia indujo bradicardia seguida de una taquicardia estabilizándose a los 90 minutos sólo en los eutiroides (FC=392±5 lpm). El L-NAME anuló estos efectos en los eutiroides mientras que los atenuó en los hipotiroides seguido de una taquicardia. El sangrado aumentó la actividad NOS y los niveles proteicos de la eNOS e iNOS en todos los animales siendo este incremento menor en los hipotiroides. En V, la hemorragia no modificó la actividad enzimática pero aumentó la expresión de eNOS e iNOS en todos los grupos. **Conclusión:** El hipotiroidismo modifica el sistema del NO atenuando las alteraciones hemodinámicas inducidas por la pérdida aguda de sangre. Las hormonas tiroideas ejercerían una modulación diferencial de la producción de NO dependiendo de la cámara cardíaca estudiada.

Grupo	EC	EH	hC	hH
NOS A (pmol.10 ⁻³ g.h)	5,10±0.50	56,14±2.57*	1,47±0.21#	23,7±1.14*
NOS V (pmol.10 ³ g.h)	1,63±0.014	1,88±0.015	4,4±0.018#	4,47±0,05
eNOS A (UA)	0,39±0.012	3,89±0.11*	0,88±0.02#	2,42±0,20*
eNOS V (UA)	0,51±0.004	0,9±0.3*	0,564±0.003	1,281±0,11*
iNOS A (UA)	0,33±0.01	0,848±0.002*	0,573±0.005#	0,923±0.003*
iNOS V (UA)	0,61±0.001	0,85±0.17*	0,56±0.002	0,99±0.19*

383. (338) EFECTO DIFERENCIAL DE ERITROPOYETINA Y SU DERIVADO CARBAMILADO SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES

Maltaner R.; Chamorro M.; Nesse A.; Vittori D.
 IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Diversos estudios han demostrado efectos de la eritropoyetina (Epo) y su derivado carbamilado (cEpo) en células no hematopoyéticas. Se ha descrito que, en células endoteliales, Epo induce proliferación, mantiene la integridad vascular y promueve angiogénesis, si bien los mecanismos no han sido dilucidados por completo. El objetivo de este trabajo fue comparar los efectos de Epo y cEpo sobre la actividad de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) e identificar las vías de señalización involucradas. La cEpo fue caracterizada por electroforesis capilar de zona, electroforesis nativa en gel de poliacrilamida y Western blotting, así como por su acción antiapoptótica y no eritropoyética en líneas celulares de neuroblastoma (SH-SY5Y) y eritroleucemia (UT-7). En células HUVEC, ambas eritropoyetinas estimularon la producción de nitritos (Griess) y mostraron efecto antioxidante (ROS, citometría de flujo). Un posible efecto protector frente a un daño tisular fue evaluado por la migración endotelial mediante el ensayo de *scratching* (medida de la magnitud de la herida a las 24 h como porcentaje del valor inicial). El tratamiento con Epo (200 ng/ml) provocó disminución significativa del tamaño de la herida, no observada con 200 ng/ml de cEpo (Control: 86±4,8%; *Epo: 66±4,9%; cEpo: 84±4,7%; *p<0,05; n=6). El efecto promigratorio de Epo fue bloqueado en ensayos de inhibición con anticuerpo anti EpoR pero no por bloqueo de la subunidad β-common. Los resultados sugieren un efecto promigratorio de Epo sobre el endotelio a través de la vía de señalización del receptor homodimérico

EpoR/EpoR, como lo indicarían los ensayos de bloqueo, mediante mecanismos similares a los observados en células eritroides. La migración no sería estimulada a través del heteroreceptor EpoR/β-common. Se demostró un efecto diferencial de Epo y cEpo sobre la migración celular frente a un daño del endotelio, al igual que el observado previamente sobre la proliferación de células hematopoyéticas.

384. (360) INTOLERANCIA A LA GLUCOSA Y DISFUNCIÓN VASCULAR EN CONEJOS JÓVENES ALIMENTADOS CON UNA DIETA RICA EN GRASAS DURANTE UN CORTO PERIODO DE TIEMPO

Pérez Abraham A.²; Roco J.²; Alarcon G.²; Scacchi F.¹; Sierra L.²; Peral De Bruno M.¹; Jerez S.¹.

Laboratorio de Fisiología Vascular, Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO)-CONICET, Universidad Nacional de Tucumán¹; Facultad de Ciencias Naturales e IML.².

Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de una dieta rica en grasas (DG), administrada a conejos jóvenes durante un corto periodo de tiempo, sobre parámetros que definen el síndrome metabólico y sobre la reactividad vascular (RV). Métodos: conejos machos de 800-1000 g fueron alimentados con una DG al 18% (DG) o control (DC) durante 6 semanas y pesados diariamente. Se les realizó test de tolerancia a la glucosa pre y post alimentación, medición de presión arterial, determinación de colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos y se pesó grasa retroperitoneal y visceral. Se midió contractilidad isométrica en aortas con (CE) y sin endotelio (SE). La función endotelial se evaluó a través de la relajación a acetilcolina (ACh 10⁻⁸-10⁻⁶M) y la RV a través de la estimulación con KCl 100mM, fenilefrina (Phe) 5.10⁻⁶ M, angiotensina II (Ang II 10⁻⁸-10⁻⁶ M) o noradrenalina (10⁻⁸-10⁻⁵ M). Resultados: La DG no modificó el peso ni la presión arterial, pero generó: A) intolerancia a la glucosa (mg/dl), **Basal:** pre 109±5 vs post 140±14; **60'**: pre 156±18 vs post 228±6; **120'**: pre 133±4 vs post 167±12 (p<0,05, ANOVA). B) Aumento de la grasa visceral (%), DC: 0,2±0,1 vs DG: 0,7±0,1 (p<0,01) y disminución de HDL (mg/dl), DC: 59±4 vs DG: 28±10 (p<0,02). C) Diminución de la relajación a ACh (%), DC: 70±5 vs DG: 38±7 (p<0,05). D) Incremento de la respuesta al KCl (mg), CE- DC: 3475±815 vs DG: 5973±500; SE-DC: 3368±692 vs DG: 5608±595 (p<0,05, ANOVA), y a Phe (mg), CE-DC: 3263±214 vs DG: 5973±500; SE-DC: 2850±350 vs DG: 5745±1046 (p<0,05, ANOVA). E) Disminución de la respuesta máxima a la Ang II en arterias SE (mg), DC: 4293±431 vs DG: 2368±574 (p<0,05). Discusión: Los cambios inducidos por el consumo de una DG en conejos jóvenes se relacionarían con el desarrollo de disfunción endotelial temprana caracterizada por disminución de la vasorelajación e incremento de la respuesta a agonistas contráctiles y de la liberación endotelial de vasoconstrictores por Ang II.

385. (364) PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE DE TIORREDOXINA-1 (TRX1) EN LA DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA POR SEPSIS

Sánchez J.¹; Pérez H.¹; Dannunzio V.²; Gelpi R.²; Poderoso J.¹; Carreras M.¹

Laboratorio Metabolismo Oxígeno, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad De Medicina, Universidad de Buenos Aires².

Introducción. El estrés oxidativo es una de las causas subyacentes de la disfunción miocárdica en sepsis. Reciente evidencia demuestra el papel importante de *trx1* como regulador antioxidante. Por tanto el objetivo fue estudiar si la *trx1* ejerce un rol protector en la reserva contractil miocárdica y en el estrés oxidativo durante la sepsis. **Métodos.** Se utilizaron ratones machos transgénicos con sobreexpresión específica de *trx1* en corazón (*trx1k-in*) y sus wildtype (wt). Se les realizó ligadura y doble punción cecal o laparotomía. Se realizó análisis de sobrevivencia. Después de 6, 18 o 24 h, en tejido cardíaco fue determinada la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, detección de grupos carbonilos, acti-

vidad de complejos mitocondriales y producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mitocondrial. Se evaluó el inotropismo, a través de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), y la reserva contráctil frente a estímulo β -adrenérgico (isoproterenol $1\mu M$) en corazones aislados e isovolúmicos (Langendorff). **Resultados.** Trx1 incrementó la esperanza de vida media (trx1k-in: 36, wt: 28 h; $p=0.0204$). Los valores de PDVI antes del estímulo β -adrenérgico fueron similares entre los grupos estudiados. Sin embargo a las 6 hs después de la sepsis, la respuesta a isoproterenol fue mayor en trx1k-in comparado con los wt (wt: $5,6 \pm 1,39$; trx1k-in: $14,9 \pm 1,39$ mmHg $p=0.0012$). En trx1k-in, la actividad de trx1 fue significativamente incrementada, la expresión de trx2 y actividad y expresión de MnSOD se prolongó hasta las 24 h, y sólo la actividad del complejo II-III fue inhibida tardíamente. Se observó menor oxidación proteica en trx1k-in en relación a menor producción mitocondrial de H_2O_2 . **Conclusion.** Trx1 atenuó la caída de la reserva contráctil a las 6 hs de producida la sepsis y retrasó el daño oxidativo mitocondrial durante la disfunción miocárdica inducida por sepsis.

386. (412) ENERGETICA DE LA HOMEOSTASIS DE CALCIO EN CORAZONES DE RATA TRATADOS CON GENISTEINA Y EXPUESTOS A ATONTAMIENTO POR ISQUEMIA/ REPERFUSION

Colareda G.; Ragone M.; Consolini A.

Cátedra de Farmacología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

En corazones de cobayo y de rata sometidos a isquemia/reperfusión (I/R) genisteína (GST) redujo la recuperación contráctil post isquémica (RCPI) en machos (M) sin afectarla en hembras (H). En rata M, la reducción fue revertida por el inhibidor de fosfatasa orto-vanadato sódico (OVN) al estimular la vía de tirosinquinasa (TK). Aquí se evaluó si las diferencias en género se debían a modificación del Ca^{2+} sarcoplásmico. Los corazones perfundidos en un calorímetro de flujo se expusieron a 45 min I y a 45 min de R con Krebs+cafeína $10\text{ mM-Na}^+ 36\text{ mM}$ (R-caf-36Na). Se midió la contractura resultante (ΔLVP) y el flujo de calor liberado (Ht en mW/g) y se calcularon las áreas bajo las respectivas curvas (ABC). Se estudiaron grupos (con $n=5$ o 6) de: sin Pretratamiento (C), M pretratados con $20\mu M$ GST, H con GST, y M con OVN $10\mu M+GST 20\mu M$. En H, GST aumentó el ABC-LVP vs. C (3568 ± 669 vs 2408 ± 476 mmHg-min) lentificando la relajación, pero no alteró el ABC-Ht (235 ± 45 vs 212 ± 28 mW-min/g). Para evaluar si GST bloquea al uniporter (UCam) se lo activó con piruvato sódico 10 mM (PIR). PIR+GST previno el aumento en ABC-LVP (2452 ± 577 mmHg-min) y aumentó el ABC-Ht (352 ± 44 mW-min/g). En M, GST no alteró el ABC-LVP vs. C (2203 ± 598 mmHg-min), pero aumentó el AUC-Ht (464 ± 105 mW-min/g). OVN+GST no modificó el ABC-LVP (2774 ± 514 mmHg-min) ni revertió el alto ABC-Ht (469 ± 114 mW-min/g). En cardiomiocitos de rata aislados, cargados con Rhod-2 o Fluo-4 para estimar $[Ca^{2+}]_m$ y $[Ca^{2+}]_i$ respectivamente por microscopía confocal, caf-36Na⁺ elevó la F/Fo de Fluo4 y de Rhod-2, mientras GST no afectó F/Fo de Fluo4 ($+0.165\pm 0.023$) pero redujo la de Rhod2 desde $+0.38\pm 0.09$ a $+0.12\pm 0.07$. Conclusiones: a) GST redujo la captación de Ca^{2+} mitocondrial en H, lo cual contribuye a cargar el RS para la RCPI con gasto energético; b) en M, la menor RCPI por GST no resulta de menor carga del RS; c) la carga del RS no depende de la inhibición de TK. *ubsidios: UNLP 09/16 y CONICET 11/13.*

387. (464) PARTICIPACIÓN DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO SEXUAL (XX/XY) EN EL DIMORFISMO SEXUAL CARDIOVASCULAR: EFECTO MODULATORIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LOS RECEPTORES ANGIOTENSINÉRGICOS AT1, AT2 Y MAS

Dadam F.; Cambiasso M.; Vivas L.; Caeiro X.

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba.

Teniendo en cuenta a) estudios propios que sugieren que el complemento cromosómico sexual (CCS) modula la respuesta

bradicárdica dimórfica sexual, b) que la activación del eje Ang II-AT1R atenúa la respuesta barorefleja mientras que el eje Ang II-AT2R/Ang-(1-7)-MasR la facilita y c) que el órgano subfornical (SFO) y área postrema (AP) participan de la respuesta barorefleja; nos propusimos como hipótesis de trabajo que la respuesta bradicárdica barorefleja diferencial inducida por Ang II en animales con diferentes CCS (XY y XX) sería consecuencia de una expresión diferencial de los genes de los receptores angiotensinérgicos a nivel del SFO y AP. Para poner a prueba nuestra hipótesis empleamos una cepa de ratón transgénico que permite deslindar los efectos de los factores: a) hormonal (machos vs. hembras), b) del CCS (XY-hembras vs. XX-hembras y XY-machos vs. XX-machos), c) así como de la interacción de ambos factores. El análisis estadístico del SFO demostró que, independientemente del estatus gonadal, el CCS modula los niveles del ARNm del receptor AT1 ($F(1,20)=4,38$; $p<0,05$), siendo su expresión mayor en ratones con CCS-XY vs. aquellos con CCS-XX. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de los receptores AT2 y Mas, como así tampoco en la relación AT1/AT2. Por su parte, a nivel del AP, si bien no se obtuvo un efecto significativo de los factores fenotipo y CCS para ninguno de los receptores angiotensinérgicos analizados, si se demostró un efecto del CCS en la relación AT1/AT2 ($F(1,12)=6,0$; $p<0,05$); siendo esta mayor en los ratones con CCS-XY vs. aquellos con CCS-XX. Estos resultados sugieren una acción moduladora por parte del CCS sobre la expresión de los genes de los receptores angiotensinérgicos (AT1 a nivel del SFO y en la relación AT1/AT2 a nivel del AP), viéndose favorecida la acción vasodilatadora en aquellos con CCS-XX y/o la acción vasoconstrictora en los ratones con CCS-XY. Subsidiado por: ANPCyT, CONICET, Mincyt y SECyT

388. (514) LA 3-METILADENINA (MA), INHIBIDOR DE LA AUTOFAGIA, DISMINUYE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL DE AURICULAS AISLADAS DE RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA SIMULADA-REPERFUSION (IS-RS)

Hermann R.; Rusiecki T.; Velez D.; Prendes M.; Savino E.; Varela A.

Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Trabajos anteriores mostraron que en la aurícula izquierda aislada de rata sometida a 75 min Is-75 min Rs, la MA genera mayor desarrollo de contractura durante la Is, aparición de arritmias severas en la Rs, menor respuesta contráctil ante la estimulación β -adrenérgica y frente a dosis crecientes de Ca^{2+} al finalizar la Is-Rs. A su vez, micrografías electrónicas mostraron un mayor deterioro mitocondrial en la Rs en aurículas sometidas a Is-Rs en presencia de MA. El objetivo de este trabajo fue estudiar la funcionalidad mitocondrial midiendo la velocidad de producción de ATP en mitocondrias aisladas luego del periodo de Is-Rs en ausencia y en presencia de MA (5mM). A su vez, se evaluó la relación LC3II/LC3I, como indicador de la formación de vacuolas autofágicas, y la proteína p62, que se degrada específicamente por la vía autofagosoma/lisosoma. Se emplearon aurículas izquierdas aisladas de ratas (Sprague-Dawley) estimuladas a 60/min e incubadas isométricamente en Krebs-Ringer- CO_3H (glucosa 10 mM , O_2 95%- CO_2 5%, pH 7,4). La Is se inició reemplazando el O_2 por N_2 y la glucosa por 2-desoxiglucosa 10 mM , pH 6,8-7,0. Se empleó ANOVA ($n=8$). La determinación de la velocidad de producción de ATP se realizó por luminometría en mitocondrias aisladas al final de la Rs. Por Western Blot se evaluó la relación LC3II/LC3I y p62 a distintos tiempos durante la Is-Rs en presencia y ausencia de MA. Cuando la Is-Rs se realizó en presencia de MA se observó una reducción en la velocidad de producción de ATP (0.61 ± 0.10 vs 0.94 ± 0.09 nmol/min.mg proteína; $p<0,05$). La relación LC3II/LC3I fue menor en presencia de MA ($p<0,05$ vs ausencia de MA) y la desaparición de p62 fue menor en presencia de MA ($p<0,05$ vs ausencia de MA). Los resultados indican que la MA, inhibidor de la autofagia, ejerce efectos nocivos en la aurícula aislada de rata sometida Is-Rs sobre la función mitocondrial, efecto que se acompaña con una menor expresión de los marcadores de autofagia.

389. (549) ¿LA ACTIVIDAD DE CAMKII SE MODIFICA POR OXIDACIÓN EN LA ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIO-CÁRDICA?

Roman B.; Herrero A.; Becerra R.; Vittone L.; Said M.; Mundia-Weilenmann C.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata.

La proteína quinasa dependiente de calcio (Ca²⁺) y calmodulina (CaMKII) ha sido involucrada en distintos procesos patológicos cardíacos. Su activación iniciada por unión al complejo Ca²⁺-calmodulina, puede sostenerse por autofosforilación del residuo Thr286 (pCaMKII) y/o por la recientemente descrita oxidación de sus residuos Met281/282 (CaMKIIox). En la reperfusión luego de un período breve de isquemia, CaMKII se activa, se autofosforila y fosforila Thr17 de fosfolamban (PLN) -proteína reguladora de la retoma de Ca²⁺ por el retículo sarcoplasmático (RS)- y Ser2815 del canal liberador de Ca²⁺ del RS (RyR2). Estas fosforilaciones favorecen la recuperación del ciclo de Ca²⁺ y la contractilidad del miocardio post-isquémico. Dado que la reperfusión cursa con aumentos de Ca²⁺ y del estrés oxidativo, nuestro objetivo fue estudiar si CaMKII se oxida y si esta modificación mantiene la actividad de la enzima y sus consecuencias funcionales en IR. Corazones perfundidos de rata (Langendorff) se sometieron a un protocolo de 20 min de isquemia global seguidos de reperfusión (IR) durante el cual se midió la recuperación mecánica en presencia y ausencia de un secuestrador de anión superóxido, Tiron (Ti, 1mM). Las fosforilaciones dependientes de CaMKII y la CaMKIIox en RS se evaluaron por Westernblot y se expresan como % control. CaMKIIox aumentó significativamente al inicio de la reperfusión (163±37%, n=5, p<0,05) y Ti suprimió este aumento (104±6%, n=3). El tratamiento con Ti no modificó el aumento de pCaMKII (IR-Ti: 213±13 vs. IR: 183±27%, n=3-6), ni la fosforilación de Thr17-PLN y Ser2815-RyR2. Finalizado el protocolo de IR, la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo fue similar en corazones con y sin Ti (44,5±4,6 y 53,7±8,1% de preisquemia, n=3-6, respectivamente). Los resultados demuestran que si bien CaMKII se oxida en IR, la modificación de su estado redox no incide en la actividad de la enzima y sus consecuencias funcionales durante la IR.

390. (553) ANALISIS DESCRIPTIVO DEL POLIMORFISMO DE MNSOD(AL9VAL), ENOS(G894T) Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN CHAGAS

Darrigo M.¹; Gerrard G.¹; Lioi S.¹; Diviani R.¹; Ceruti M.¹; Beloscar J.²

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario¹; Carrera de Cardiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe².

Enzimas involucradas en el estrés oxidativo controlarían el balance de especies reactivas del oxígeno, mecanismo que podría estar vinculado con el desarrollo de la Miocardiopatía Chagásica (MCC). Variantes como MnSOD(Al⁹Val) y eNOS(G⁸⁹⁴T) modificarían las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa (SOD) y reducción de óxido nítrico endotelial respectivamente. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio descriptivo de las frecuencias alélicas (FA) de MnSOD(Al⁹Val,T>C) y eNOS(G⁸⁹⁴T) y de las actividades de SOD, CAT, GPX y tBARS. Se analizaron 4 grupos de individuos: controles (CN=55), chagásicos sin MCC (ECsinMCC=28), (MCC=35), y con cardiopatía no chagásica (CnoC=45) de similares características, a los cuales se les realizó examen cardiovascular, electrocardiograma, radiografía de tórax y exámenes complementarios según indicaciones en cada caso. Todos dieron su consentimiento. El tamaño muestral fue calculado estadísticamente para lograr una estimación representativa de la población total, con una confianza del 95%. Se analizaron las actividades enzimáticas de SOD y GPX y CAT por métodos espectrofotométricos (Kits Ransel Labs), la extracción de DNA fue realizada con DNA Purification Kit Wizard Genomic (Promega, USA), y la caracterización molecular y genotipificación de los polimorfismos por PCR-RFLP. Para el estudio estadístico

se realizó análisis de variancia a un criterio de clasificación, para cada enzima, se aplicó Kruskal Wallis. El nivel de significancia se estableció en p < 0,05, observándose diferencias significativas en las actividades de las enzimas estudiadas. El análisis de las FA para MnSOD(Al⁹Val, T>C) fue: MCC: (C 0.60, T 0.40); ECsinMCC (C 0.59, T 0.41) y CN (C 0.71 T 0.29), CnoC (C 0.92, T 0.15). Para eNOS(G⁸⁹⁴T) fue: MCC: (G 0.388, T 0.611); ECsinMCC (G 0.312, T 0.687) y CN (G 0.742, T 0.261). Para comparar las FA se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal, del cual se evidencia que existen diferencias significativas entre ECsinMCC, MCC y CnoC (p<0.001). Los datos obtenidos reflejarían que polimorfismos involucrados en el stress oxidativo podrían tener implicancias en la patogenia y desarrollo de la miocardiopatía chagásica.

391. (674) BIOMARCADORES INFLAMATORIOS EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO

Tarán M.¹; Báez M.²; Scribano M.¹; Balceda A.¹; Binci M.³; Moya M.¹

Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; IICSHUM, Universidad Nacional de La Rioja²; Laboratorio Labac³.

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por la convergencia de varios factores de riesgo cuya asociación contribuye en forma exponencial y no solamente aditiva al riesgo cardiovascular. Su fisiopatología imbrica alteraciones en el metabolismo glucolípido, estados proinflamatorios y protrombóticos. Se propone analizar el comportamiento de los biomarcadores inflamatorios: fibrinógeno, óxido nítrico (NO) y superóxido dismutasa (SOD) en pacientes con SM para determinar su participación en este síndrome. Se realizó un estudio descriptivo transversal. Se incluyeron pacientes que cumplieron con los siguientes criterios establecidos para el diagnóstico del SM (grupo B): parámetros bioquímicos: Glucemia en ayunas >100 mg/dL o DM2 previamente diagnosticada, Triglicéridos >150 mg/dL, HDL < 40 mg/dL en varones y <50 mg/dL en mujeres y los siguientes parámetros clínicos: Presión arterial >130/85 mmHg o tratamiento antihipertensivo, circunferencia abdominal > 94 cm en el hombre y > 80 cm en la mujer. Para el grupo control (A) se seleccionaron aleatoriamente los números 5 y 15 del listado de la planilla de atención que fueran sanos. Además, se midió fibrinógeno, NO y SOD, todas se cuantificaron por espectrofotometría. Los resultados se analizaron con MANOVA y como test poshoc se utilizó Hotelling. Nivel de significación de p < 0.05 para todos los casos. En aquellos pacientes que cumplieron los criterios de SM se analizaron los biomarcadores inflamatorios (fibrinógeno, NO y SOD). Observamos un incremento significativo de fibrinógeno al comparar el grupo (A) (223±2) con (B) (263±1.77) (p<0.001). La biodisponibilidad de NO disminuyó significativamente en (B) (11.83±0.8) respecto (A) (23.88±5.6) (p<0.02). Además, SOD incremento significativamente su actividad en (B) (309±9.73) comparado con (A) (218±8.9) (p<0.001). El aumento de fibrinógeno y SOD conjuntamente con la disminución del NO, aumentaría la carga aterogénica en pacientes con SM y el riesgo de enfermedad vascular isquémica. La identificación precoz de los biomarcadores inflamatorios en los pacientes con SM posibilitaría la actuación en fases preclínicas y reversibles, previniendo o retardando el desarrollo de DM2 y la prevención y la progresión de la aterosclerosis.

392. (707) EFECTOS DEL COMPUESTO C (CC), INHIBIDOR DE LA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK), SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DE AURICULAS IZQUIERDAS AISLADAS DE RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA-REPERFUSION SIMULADAS

Hermann R.; Rusiecki T.; Mestre Cordero V.; Fernández Pazos M.; Prendes M.; Varela A.

Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La AMPK, enzima clave en la regulación del metabolismo energético celular, es activada en situaciones de estrés metabólico, como ocurre en la isquemia. Existen controversias acerca del

papel desempeñado por esta enzima en la injuria por isquemia reperfusion. El objetivo fue estudiar los efectos del CC 10 μM sobre la función contráctil y la viabilidad celular de la aurícula aislada de rata sometida a 75 min isquemia (Is)–75 min reperfusion (Rs) simuladas. Se emplearon aurículas izquierdas de ratas hembras (Sprague-Dawley) estimuladas a 60/min e incubadas isométricamente en Krebs-Ringer- CO_3H^- (glucosa 10mM, O_2 95%- CO_2 5%, pH 7,4), mantenidas a 31°C. La Is se inició reemplazando el O_2 por N_2 y la glucosa por 2-desoxiglucosa 10mM, 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 ($\pm\text{dF}/\text{dt}$). Al finalizar la Rs se evaluó la respuesta contráctil: a) al isoproterenol 2 μM (ISO), concentración que genera la máxima respuesta contráctil en aurículas incubadas en aerobiosis y b) al Ca^{2+} , empleando concentraciones crecientes de Ca^{2+} (0-10,2 mM). Los valores fueron expresados como% con respecto al control pre-isquémico. La viabilidad celular se midió con la técnica del MTT ($\lambda=520$ nm). Se empleó ANOVA ($n=8$). El CC no modificó la viabilidad celular, el desarrollo de contractura evaluada mediante la FD ni la contractilidad durante la Is-Rs. Sin embargo, en presencia del inhibidor se observó una menor respuesta al ISO luego de la Is-Rs (FS: $67,0\pm 6,6$ vs $101,3\pm 9,5$; IFT: $69,1\pm 8,5$ vs $91,1\pm 9,6$; $+\text{dP}/\text{dt}$: $56,8\pm 13,1$ vs $90,4\pm 10,3$; $-\text{dP}/\text{dt}$: $63,6\pm 7,6$ vs $103,0\pm 13,9$; $p<0,05$). La respuesta contráctil al Ca^{2+} fue similar en presencia y ausencia de CC. Los resultados indican que el inhibidor de la AMPK, bajo estas condiciones experimentales, disminuye la reserva contráctil de la aurícula sometida a Is-Rs, pero no modifica la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} .

393. (749) EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON CARVEDILOL O ATENOLOL EN RATAS HIPERTENSAS POR L-NAME

Santander Plantamura Y.1; Del Mauro J.1; Gorzalczy S.1; Bertera F.1; Carranza A.1; Moretón M.2; Chiappetta D.2; Taira C.1; Hocht C.1

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica; Universidad de Buenos Aires1; Cátedra de Farmacotecnia I, Facultad de Farmacia y Bioquímica; Universidad de Buenos Aires2.

El carvedilol es un beta bloqueante de tercera generación con mayor eficacia antihipertensiva y capacidad de atenuar el incremento de la variabilidad de la presión arterial en comparación con el antagonista selectivo atenolol. El objetivo del presente trabajo fue comparar el efecto del tratamiento a largo plazo con carvedilol o atenolol sobre la presión arterial, la variabilidad a corto plazo de la presión arterial y el daño de órgano blanco en ventrículo izquierdo y aorta torácica en ratas hipertensas por L-NAME. Se incluyeron 12 ratas Wistar macho que recibieron L-NAME en el agua de bebida durante 8 semanas y el tratamiento oral con una única administración diaria de carvedilol 30 mg/kg o atenolol 90 mg/kg. Al final del tratamiento se realizó la medición de la presión arterial y de su variabilidad a corto plazo, se determinó el peso del ventrículo y de la aorta torácica y se realizaron preparados histológicos sobre ambos tejidos. La presión arterial media de las ratas LNAME tratadas con carvedilol no fue diferente al grupo atenolol (148 ± 7 vs. 146 ± 5 mmHg). En cambio, la frecuencia cardíaca y la variabilidad de la presión arterial fueron significativamente inferiores luego del tratamiento crónico con carvedilol (Desvío estándar: 4.1 ± 0.7 , $p<0.05$ vs atenolol) en comparación a atenolol (Desvío estándar: 6.3 ± 0.3). No se documentaron diferencias significativas en el peso del ventrículo izquierdo y de la aorta torácica entre las ratas L-NAME tratadas crónicamente con carvedilol o atenolol. Los estudios histológicos no evidenciaron la presencia de fibrosis en tejido miocárdico y en aorta torácica tanto en animales tratados con carvedilol o atenolol. En conclusión, el tratamiento crónico con carvedilol redujo en mayor medida la variabilidad de la presión arterial a corto plazo en comparación a atenolol sin cambios significativos en el nivel de presión arterial media. Tanto carvedilol como atenolol previnieron la hipertrofia y la fibrosis ventricular inducida por la administración de L-NAME.

GASTROENTEROLOGÍA 2

394. (133) TAUROURSODESOXICOLATO (TUDC) INHIBE LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PROCOLESTÁSICAS PKCC Y PI3K/AKT EN LA COLESTASIS POR ESTRADIOL 17 β D-GLUCURÓNIDO (E)

Boaglio A.; Miszczuk G.; Barroso I.; Toledo F.; Crocenzi F.; Roma M.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe.

E altera función y localización de Mrp2 y Bsep, transportadores claves para la formación de bilis, activando las vías dependientes de proteínas quinasas C clásica (PKCc) y de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K/Akt). La colestasis gravídica, patología asociada a niveles altos de E, es tratada con ursodesoxicolato, cuyo principal metabolito activo es TUDC. Dado que los mecanismos moleculares de acción de TUDC en la colestasis por E no han sido indagados, evaluamos si TUDC puede prevenir esta patología inhibiendo la activación de PKCc y PI3K/Akt. Determinamos por *Western Blot*, en hepatocitos de rata, la activación de PKCc (% de translocación a membrana) y de Akt (% de forma fosforilada). E activó PKCc y Akt. El pretratamiento con TUDC (50 y 100 μM) seguido de exposición a E (200 μM) previno la activación de PKCc (-35 \pm 5% y -34 \pm 4%) y de Akt (-39 \pm 3% y -37 \pm 2%), $p<0.05$ vs. E. Evaluamos función canalicular en duplas de hepatocitos de rata cuantificando acumulación canalicular (AC) de sustratos fluorescentes de Bsep y Mrp2 por análisis de imágenes. E (200 μM) disminuyó un 59 \pm 2% la AC de cGAMF, sustrato de Bsep ($p<0.05$ vs. control), mientras que TUDC (50 y 100 μM) previno parcialmente estas alteraciones: +61 \pm 7% y +72 \pm 6%, $p<0.05$ vs. E. Las variaciones en la AC de GS-MF, sustrato de Mrp2, fueron similares a las de cGAMF. Las alteraciones por E fueron prevenidas por TUDC en el modelo de hígado aislado y perfundido de rata. E (2 $\mu\text{mol}/\text{hig}$) redujo el flujo biliar (-59 \pm 14%, $p<0.001$). TUDC (50 μM) previno parcialmente la caída del flujo por E (+127 \pm 12%, $p<0.001$), mientras que TUDC 100 μM la previno completamente. Datos similares se obtuvieron al medir velocidad de excreción de TC y DNP-GS, sustratos respectivos de Bsep y Mrp2. La inmunohistoquímica reveló que E indujo endocitosis de Bsep y Mrp2, y que el pretratamiento con TUDC previno este fenómeno. Concluimos que TUDC restablece función y localización de Bsep y Mrp2 alteradas por E, impidiendo la activación de PKCc y PI3K/Akt.

395. (221) LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) DESREGULA LA EXPRESIÓN DE LA AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL (MTAQP8) HEPÁTICA Y LA UREAGÉNESIS A PARTIR DEL AMONIACO

Soria L.; Marrone J.; Molinas S.; Taborda D.; Marinelli R. Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe.

Recientemente demostramos que en el hepatocito, la mtAQP8 facilita el transporte difusivo del amoníaco al interior mitocondrial para su metabolización a urea, un proceso clave de detoxificación hepática del amoníaco y prevención de hiperamonemia. En sepsis, LPS altera el metabolismo hepático del amoníaco y causa hiperamonemia por mecanismos parcialmente conocidos. En un estudio previo en animal entero observamos que el LPS disminuye la expresión proteica y funcional de la mtAQP8; en el presente, evaluamos la ureagénesis a partir del amoníaco, en hepatocitos provenientes de ratas tratadas con LPS (4 mg/kg peso) y correspondientes controles. Dieciséis horas después del tratamiento con LPS, los hepatocitos fueron aislados y cultivados, y se testeó su capacidad de sintetizar urea en condiciones basales y de estímulo, exponiéndolos a glucagon durante 4 horas. Por inmunoblotting confirmamos la expresión defectiva de la mtAQP8 inducida por LPS (-50%, $P < 0,05$). Los hepatocitos provenientes de animales tratados con LPS incubados en presencia de amoníaco, mostraron una disminución de alrededor de 30% ($P < 0,05$) en la ureagénesis basal y estimulada por glucagon. En contraste, el LPS no afectó

la ureagénesis cuando se utilizó glutamina como fuente intramitocondrial de nitrógeno. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear utilizando ^{15}N -amoniaco, confirmaron la reducción en la síntesis de urea inducida por LPS. En conclusión, nuestros datos sugieren que el LPS disminuye la ureagénesis hepática dependiente del transporte mitocondrial del amoniaco facilitado por mtAQP8. La expresión defectiva de la mtAQP8 hepática podría contribuir como mecanismo molecular en la disfunción destoxicadora del amoniaco en sepsis.

396. (269) EFECTO PROTECTOR DEL FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL EN LOS EVENTOS TEMPRANOS DE LA PANCREATITIS AGUDA EN LA RATA

Najenson A.¹; Ventimiglia M.¹; Rubio F.⁴; Costas M.⁴; Davio C.³; Vatta M.³; Bianciotti L.^{1,2}

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Cátedra de Fisiología, Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM)-CONICET⁴; Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁵.

En estudios previos demostramos que el factor natriurético atrial (ANF) al estimular la salida de AMPc a través de proteínas de resistencia a multidroga (MRPs) atenúa el desarrollo de la pancreatitis aguda (PA) en la rata. Asimismo e independiente de este mecanismo observamos que el ANF estimula la apoptosis evidenciado por la activación de caspasas y estudios de microscopía, lo que se relaciona con un mejor pronóstico de la patología ya que la apoptosis se correlaciona inversamente con la necrosis. En el presente estudio se evaluaron distintos parámetros del proceso inflamatorio en la PA con el propósito de establecer si el ANF modificaba este proceso. Se utilizó un modelo animal de PA generado por administración repetida de ceruleína (Ce). A ratas SD de 200 g se administró 4 inyecciones de Ce (50mg/kg cada hora) o 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. Finalizados los experimentos se tomaron muestras de sangre y de tejido pancreático para la realización de distintos estudios. Se determinó la activación de tripsina y catepsina B en fracciones enriquecidas en lisosomas y gránulos de zimógeno. Los grupos tratados con Ce así como los tratados con Ce + S mostraron un marcado incremento de la actividad de tripsina que fue atenuada por ANF en ambas fracciones. No obstante ANF no modificó la actividad de catepsina B incrementada en los mismos grupos. Los animales con PA mostraron un aumento en la expresión de COX2 (WB) y en los niveles intrapancreáticos de prostaglandina E2 (RIA), agravado en presencia de S pero atenuado por ANF. Asimismo la expresión de ERK1/2 (WB) y la activación de NFkB (WB), aumentadas en PA con y sin S, fueron disminuidas por ANF. Estos resultados muestran que el ANF atenúa la respuesta inflamatoria en la PA, ejerciendo un efecto protector en los eventos tempranos de su desarrollo.

397. (300) EFECTO DE LA FRUCTOSA DIETARIA SOBRE LAS NEURONAS NADPH+ DEL COLON PROXIMAL DE RATAS DIABÉTICAS

Barranco M.¹; Labourdette V.²; Posadas M.²; Olguin M.³; Hisano N.⁴

Cátedra de Fisiología, Facultad De Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹ Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario²; Cátedra de Química de Alimentos, Facultad de Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de Rosario³; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe⁴.

Los estudios respecto a los efectos de fructosa como componente dietético recomendable para pacientes diabéticos en

reemplazo de la glucosa son controversiales. Si bien la fructosa no provoca aumento en la glucemia ni estimula la secreción de insulina, diversos estudios describen una relación directa entre el aumento del consumo global de ésta en las últimas décadas y el incremento en la prevalencia de diabetes. El plexo de Auerbach está integrado por cadenas de neuronas ubicadas entre las capas musculares circular y longitudinal del intestino. Es el encargado de los movimientos intrínsecos gastrointestinales, controla la actividad motora en toda la longitud del intestino. El objetivo fue evaluar el efecto de dos dietas con diferentes hidratos de carbono: almidón/fructosa, sobre las neuronas del plexo de Auerbach del colon proximal en ratas espontáneamente obesas y diabéticas (IIMb/l). Ratas de 70 días se alimentaron por 90 días con: a) dieta control (C; n:5), formulada según el American Institute of Nutrition (AIN 93) con almidón de maíz como fuente hidrocarbonada y b) dieta rica en fructosa (F; n:5), AIN 93 reemplazando el 50% del almidón por fructosa (29% del valor calórico total). Al final se dosó glucemia plasmática, luego los animales fueron eutanasiados y segmentos del colon proximal se fijaron en paraformaldehído 4% y se procesaron con la técnica histoquímica del NADPH. El material fue fotografiado con cámara digital y se contaron las neuronas con un analizador de imágenes. Resultados (media±SD): glucemia (mg/dl) C 272.4±62.8 vs F 321.3±58.2 p> 0,05. Contaje neuronal C 87.06±13.86 vs F 40.11±9.99; p<0,05. El recuento neuronal significativamente menor en el grupo F desaconsejaría el reemplazo de fructosa por glucosa en la dieta, ya que aún cuando no se modificaron los valores de glucemia, la fructosa potenció el efecto negativo de la hiperglicemia a nivel intestinal, lo que podría exacerbar la dismotilidad observada de por sí en los pacientes diabéticos.

398. (367) EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EN LAS ALTERACIONES COLESTÁSICAS INDUCIDAS POR ESTRADIOL-17B-D-GLUCURÓNIDO (E17G) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR)

Barosso I.; Zucchetti A.; Miszczuk G.; Taborda D.; Crocenzi F.; Sánchez Pozzi E.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe.

Previamente, demostramos que el Receptor de Estrógenos α (RE α) participa junto con PKC α de una vía de señalización activa por E17G que lleva a la internalización de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2. En vista que EGFR es activado por estradiol no conjugado cascada debajo de RE α , el objetivo de este trabajo fue evaluar la participación y el potencial papel del EGFR en la alteración colestásica inducida por E17G. La participación de EGFR en las alteraciones colestásicas inducidas por E17G se evaluó en DAHR utilizando dos inhibidores específicos diferentes: Tirfostina AG1478 (Tyr) y CI7387785 (CL). Las duplas fueron pre-tratadas con ICI182,780 (ICI, 1 μ M), Tyr (150nM) o CL (1 μ M) durante 15 min y luego fueron tratadas con E17G (100 μ M) por 20 min. Además, algunos preparados de DAHR fueron coincubados con Tyr o CL junto con ICI durante 15 min previo a la exposición a E17G. Finalmente, se expusieron a colilglisilamido fluoresceína (CGamF, sustrato de Bsep) o clorometilfluoresceína diacetato (GS-MF, sustrato de Mrp2) para estudiar la actividad de Bsep y Mrp2. Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon CGamF (AVc CGamF) o GS-MF (AVc GS-MF) en sus vacuolas canaliculares. Resultados (% del Control) se expresan como media±ES: Ambos inhibidores previnieron parcialmente la disminución de AVc CGamF (E17G+Tyr: 80±8%*, E17G+CL: 74±6%*) y GS-MF (E17G+Tyr: 73±4%*, E17G+CL: 74±10%*) inducida por E17G (AVc CGamF: 54±2% \hat{c} ; AVc GS-MF: 56±2%). No se observó un efecto aditivo de la prevención cuando las DAHR se coincubaron con ICI (AVc CGamF: E17G+ICI: 74±5%*, E17G+ICI+Tyr: 82±9%*, E17G+ICI+CL: 68±7%*; AVc GS-MF: E17G+ICI: 70±4%*, E17G+ICI+Tyr: 73±3%*, E17G+ICI+CL: 73±11%*). *Significativamente diferente de Control (p<0.05), *Significativamente diferente del Control y E17G (p<0.05). Conclusión: El EGFR participaría en las alteraciones

colestásicas producidas por E17G por un mecanismo dependiente de la vía PKC α /RE α .

399. (457) ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DE CUATRO ESPECIES MEDICINALES EN RATONES

Mara A.; Garro M.; Teves M.; Paredes J.; Sosa A.; Fusco M.; Abud M.; Wendel G.; Saad R.; Pelzer L.

Farmacología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, San Luis.

La enfermedad diarreica es considerada a nivel mundial una de las causas de mayor morbimortalidad en niños. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de plantas empleadas en medicina popular, *Aristolochia argentina*, *Jodina rombifolia*, *Plantago major* y *Lithraea molleoides*, sobre la motilidad del tracto gastrointestinal y la diarrea. Se utilizaron ratones albinos de ambos sexos suministrados por el Bioterio Central de la UNSL. Los protocolos de actividades de investigación fueron realizados de acuerdo a la reglamentación vigente y fueron aprobados por el CICUA-UNSL, Resolución CD 342/10: F-20/08. Tránsito intestinal: se empleó el método descrito por Di Carlo y col. (1994), que utiliza como marcador carbón al 5% suspendido en goma arábiga al 10%. Diarrea inducida por aceite de ricino: Se empleó la técnica propuesta por Izzo y col. (1992), utilizando aceite de ricino como agente catártico. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Análisis estadístico: prueba de t para casos no apareados o prueba de χ^2 según corresponda en cada caso. Tanto las infusiones como decocciones (10 y 20%) de raíz de *A. argentina* redujeron el tránsito intestinal y la diarrea ($p < 0.01$). La infusión de hojas de *J. rombifolia* disminuyó la motilidad intestinal con respecto al control y también redujo el efecto catártico del aceite de ricino ($p < 0.001$). El extracto metanólico de *P. major* (125 y 250 mg/kg) produjo una acción inhibitoria sobre la motilidad intestinal y en la diarrea inducida por aceite de ricino ($p < 0.05$). La infusión de *L. molleoides* (500 mg/kg) retrasó el tránsito intestinal y previno la diarrea ($p < 0.05$). El mecanismo del efecto antidiarreico puede estar vinculado a un retardo del tránsito intestinal, ya que el aceite de ricino induce aceleración del mismo, a causa de su actividad motora. Los resultados obtenidos en la evaluación antidiarreica proveen una validación científica para el uso popular de estas plantas medicinales de nuestra región.

GENÉTICA 2

400. (128) NUEVO MECANISMO MUTACIONAL EN EL GEN DE TIROGLOBULINA: INVERSIÓN DE ADN IMPERFECTA CAUSANTE DE HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO

Citterio C.¹; Rossetti L.²; Morales C.¹; González-Sarmiento R.³; Rivolta C.¹; De Brasi C.²; Targovnik H.¹

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina²; Unidad de Medicina Molecular, Departamento de Medicina Universidad De Salamanca³.

La biosíntesis de las hormonas tiroideas requiere la integridad de un sistema complejo de proteínas dependientes de la estructura tridimensional de la tiroglobulina (TG). La TG humana es un gen de copia única de 270 Kb localizado en el cromosoma 8q24 y organizado en 48 exones. Mutaciones en dicho gen producen hipotiroidismo congénito (HC) por deficiencia de TG con herencia autosómica recesiva. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis genético de tres hermanos de origen turco nacidos de padres consanguíneos y afectados con HC y niveles bajos de TG sérica. La combinación de secuenciación de ADN, mapeo por PCR directa, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR inversa (I-PCR), PCR multiplex y análisis bioinformático se utilizaron con el fin de detectar mutaciones en TG. Se demostró que los tres hermanos afectados eran homocigotas y los padres eran portadores heterocigotas de una inversión de ADN de 16.962 pb en el gen de TG asociada con dos regiones deletionadas en ambos extremos de los límites dicha inversión. La región de la inversión incluyó

los primeros 9 pb del exón 48, 1015 pb del intrón 47, 191 pb del exón 47, 1523 pb del intrón 46, 135 pb del exón 46 y los últimos 14 089 pb del intrón 45. La deleción proximal corresponde a 27 pb del intrón 45 de TG, mientras que la deleción distal se extendió por los últimos 230 pb del exón 48 de TG y los primeros 588 pb de la región intergénica 3' de TG. En conclusión, una nueva e imperfecta gran inversión de ADN dentro del gen TG fue identificada por la estrategia de la I-PCR. Esta aberración no se detectó por PCR-secuenciación convencional de TG. Sorprendentemente, el hallazgo representa la primera descripción de una enfermedad de deficiencia TG causada por una inversión de ADN.

401. (205) MUTACIONES EN EL GEN RB1 EN PACIENTES CON DISTINTAS PRESENTACIONES CLÍNICAS DE RETINOBLASTOMA

Ottaviani D.¹; Parma D.²; Luce L.²; Ferrer M.³; Giliberto F.²; Chantada G.⁴; Szijjan I.²

Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Hemato-Oncología, Hospital de Pediatría "Prof. Juan P. Garrahan"¹; Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; División Neurocirugía - Hospital de Clínicas José De San Martín³; Servicio De Hemato-Oncología, Hospital de Pediatría "Prof. Juan P. Garrahan", Buenos Aires⁴.

El retinoblastoma (RB) es el cáncer intraocular más frecuente de la niñez, causado por la inactivación del gen supresor tumoral *RB1* en la retina en desarrollo. Aunque la incidencia de RB es baja, es un cáncer hereditario en el 50% de los casos por lo cual resulta importante identificar la mutación para predecir el riesgo en los familiares. La detección temprana del tumor es crítica para la sobrevida y la preservación de la visión. El RB puede ser unilateral, bilateral y raramente trilateral, incluyendo tumores pineales. El objetivo del trabajo es el análisis de pacientes con diferente presentación de RB. Se estudiaron 3 casos unilaterales, uno bilateral, uno trilateral y uno unilateral con síndrome de Down. Se realizó la secuenciación del gen *RB1* para detectar mutaciones puntuales y MLPA para la detección de grandes rearrreglos. Se identificaron las siguientes mutaciones: 1) Mutación puntual germinal en un paciente unilateral (#600) revelando una forma hereditaria de RB; 2) Duplicación somática de dos exones en un paciente unilateral (#554) ausente en sangre periférica; 3) Duplicación somática del gen *RB1* en un paciente unilateral (#621) ausente en sangre periférica; 4) Deleción germinal del gen *RB1* completo en una paciente bilateral (#583) diagnosticada a los 15 días de edad; 5) Deleción germinal de 2pb en una paciente trilateral (#582-RB bilateral y tumor pineal). El análisis de mutaciones en el paciente unilateral con síndrome de Down (#636) se encuentra en estudio. La identificación de mutaciones permite rastrearlas en los familiares del paciente y determinar la forma hereditaria o no en pacientes unilaterales. El empleo de diferentes metodologías y el estudio de tumores en pacientes unilaterales permiten obtener resultados informativos en aproximadamente 90% de los casos. El rastreo de la mutación identificada en los familiares del paciente afectado, permite predecir el riesgo de transmisión/desarrollo de RB y realizar el asesoramiento genético familiar.

402. (319) ESTUDIO DE UNA MUTACIÓN NÓVEL EN EL INTRÓN 5 DEL GEN CYP21A2 COMO CAUSANTE DE HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

Taboas M.¹; Gómez Acua L.²; Bruque D.¹; Stivel M.³; Dain L.¹

Centro Nacional de Genética Médica¹ Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires² División Endocrinología, Hospital Durand, Buenos Aires³.

En trabajos previos hemos detectado en nuestra población la presencia de mutaciones nóveles en la región codificante del gen *CYP21A2* en pacientes afectados por Hiperplasia Suprarrenal Congénita por deficiencia en la enzima 21 hidroxilasa (21OHasa).

El objetivo del presente trabajo fue analizar la implicancia biológica de una mutación novel hallada en un sitio aceptor de splicing en el intrón 5, en una paciente con la forma virilizante simple de la enfermedad en heterocigosis compuesta con la mutación p.R483Q. Se realizó un análisis preliminar bioinformático mediante el programa *Human Splicing Finder*. La eficiencia de splicing se analizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento entre el exón 4 y el 7 del gen a partir del ADN de la paciente, posterior clonado en un vector de expresión, transfección transitoria del plásmido quimérico en células Hela, Hek293 y Y1 y la valoración del ARNm obtenido por RT-PCR radioactiva seguida de electroforesis en geles de poliacrilamida nativos. Los resultados bioinformáticos obtenidos indicaban la posible utilización de 2 sitios crípticos de splicing, uno en el intrón 5 y otro en el exón 6. Los ensayos funcionales revelaron que la construcción con el ADN mutado presentaba una isoforma de ARNm más corta que la de la construcción salvaje. Mediante secuenciación se determinó que esta isoforma presenta una delección de 16 nucleótidos debido al uso del sitio aceptor críptico de splicing dentro del exón 6. Esta delección predice la aparición de un codón stop prematuro y la ausencia de actividad enzimática. Nuestros resultados confirman la aparición de un alelo severo a partir de la mutación novel encontrada.

403. (377) PERFIL MUTACIONAL Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN PTCH1 EN PACIENTES CON SÍNDROME DE CARCINOMA BASOCELULAR NEVOIDE (SCBCN)

Martinez M.¹; Mazzuocolo L.²; Panelo L.³; González A.⁴; Rubio M.³; Muchnik C.¹; Stengel F.²; Azurmendi P.¹
Laboratorio de Riñón Experimental, IIM Alfredo Lanari, UBA-CONICET¹; Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas, C.E.M.I.C.²; Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM)-CONICET³; Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires⁴.

El Síndrome de carcinoma basocelular nevoide (SCBCN) es una enfermedad autosómica dominante cuyo principal gen causal es PTCH1, el receptor clave en la vía de señalización Hedgehog (Hh). Previamente, mostramos el primer informe nacional sobre las mutaciones en PTCH1 en pacientes SCBCN y su participación en la tumorigénesis de los carcinomas basocelulares (CBCs) que desarrollan. El presente trabajo tiene por objeto ampliar dicho estudio y analizar la expresión del mRNA de PTCH1 considerando el estatus genético. Para ello, se completó la búsqueda de mutaciones por PCR-secuenciación bidireccional y *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA) de PTCH1 en CBCs y sangre periférica de 16 pacientes. Para la cuantificación por PCR en tiempo real del mRNA de PTCH1 se extrajo RNA total para la obtención de cDNA de CBCs y tejido normal (TN) de 15 pacientes, utilizando mRNA de GAPDH como gen de referencia; el resultado se expresó como la tasa de cambio $[2^{-(C_{PTCH1} - C_{GAPDH})}]$. El MLPA mostró una delección de un alelo completo en un CBC con mutación germinal conocida que, sumado a 3 delecciones, 2 inserciones, 1 duplicación y 4 sustituciones definieron el espectro completo de mutaciones en PTCH1, identificando 8 mutaciones germinales y 5 somáticas (sólo en CBC). Los resultados muestran que PTCH1 es el responsable del SCBCN en 8/16 de los pacientes y que el 50% de los mismos evidencia el mecanismo de *two-hit* en CBC. El mRNA de PTCH1 en CBCs aumentó $30,2 \pm 8,2$ veces respecto del TN ($p < 0.001$), consistente con la activación de la vía Hh al ser un gen blanco de la misma. En TN de pacientes con mutaciones germinales en PTCH1, la expresión fue más alta que en los que no las portaban ($6,7 \times 10^{-4} \pm 1,2 \times 10^{-4}$, $n=8$ vs $3,1 \times 10^{-4} \pm 0,9 \times 10^{-4}$, $n=7$; $p < 0,05$). El análisis mutacional sugiere que otros genes causales estarían involucrados en el SCBCN. En este sentido, el perfil de expresión génica encontrado apuntaría a genes relacionados a la regulación de la vía Hh como posibles candidatos.

404. (616) REVERSIÓN DE LA CIRROSIS EN UN PACIENTE CON COLESTASIS INTRAHEPÁTICA FAMILIAR PROGRESIVA TIPO 3 (PFIC3) CON EXPRESIÓN RESIDUAL DE MDR3 LUEGO DE UNA TERAPIA DE LARGO PLAZO CON ÁCIDO URSODEOXICÓLICO (UDCA)

Castillo A.¹; Frider B.²; Gordo-Gilart R.³; Bruno A.²; Amante M.⁴; Alvarez L.³; Mathet V.¹

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Medicina-Hepatología, Hospital General de Agudos Cosme Argerich.²; Unidad de Investigación, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.³; División Patología, Hospital Argerich, Buenos Aires⁴.

La PFIC conforma un grupo de enfermedades debidas a mutaciones en los sistemas de transporte canalicular de bilis. La PFIC3 es causada por mutaciones en el gen *ABCB4* que resulta en una disfunción del translocador de fosfatidilcolina MDR3. Se estudiaron los parámetros clínicos, bioquímicos e histológicos, así como las mutaciones en el gen *ABCB4* en dos pacientes emparentados con PFIC3 (P1 y P2). P1: varón de 23 años con valores de g-glutamyltranspeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FAL), bilirrubina directa, ALT y AST alterados. Biopsia hepática inicial: fibrosis severa, cirrosis y colestasis con ausencia de expresión de MDR3. Se detectaron 2 mutaciones en MDR3 (R47Q, T82N). Luego de 9 años de tratamiento con UDCA se documentó la desaparición progresiva de la colestasis clínica y bioquímica. Biopsias posteriores mostraron ausencia de cirrosis. Una elastografía hepática reciente arrojó resultados normales. P2: mujer de 35 años (tía de P1) con colestasis y valores de GGT y FAL alterados. Se detectó una de las mutaciones encontradas en P1 (T82N). P2 respondió favorablemente al tratamiento con UDCA. Se estudió *in vitro* el efecto de dichas mutaciones mediante la expresión de las proteínas mutadas en células polarizadas. El análisis de inmunocitoquímica permitió determinar una localización subcelular normal de las proteínas mutadas, mientras que el análisis de la expresión por *Western blot* permitió detectar una disminución notable en la expresión de las mismas con respecto al control *wild type*. P1 sería un caso atípico de mejoría radical en un paciente adulto joven con un cambio en el pronóstico de esta enfermedad. En ambos casos se observó una mejoría clínica, humoral e histológica, con reversión de cirrosis en el primer caso, luego de un tratamiento prolongado con altas dosis de UDCA, modificando el concepto de enfermedad progresiva. Los estudios *in vitro* permitieron establecer una correlación entre las mutaciones encontradas y la patología observada en estos pacientes.

405. (647) ESTUDIO DE DESBALANCES GENÓMICOS EN PACIENTES CON RETARDO MENTAL IDIOPÁTICO POR LA TÉCNICA DE ARRAY-CGH

Espeche L.¹; Solari A.¹; Andersen M.¹; Furforo L.¹; Pérez M.¹; Arenas R.²; Palomares M.²; Nevado Blanco J.²; Rozental S.¹

Centro Nacional de Genética Médica, ANLIS¹; Instituto Nacional de Genética Médica y Molecular, Hospital La Paz, Madrid, España².

En los últimos años se han demostrado microdelecciones y microduplicaciones genómicas asociadas con una gran variedad de fenotipos. El array-CGH ha permitido evidenciar desbalances recurrentes del genoma o variaciones en el número de copias (CNVs), responsables de cuadros clínicos asociados a retardo mental (RM). Esta discapacidad afecta al 1-3% de la población y la etiología es incierta en el 50% de los pacientes. En estos casos no se puede establecer de manera concluyente el pronóstico y riesgo de recurrencia familiar. El objetivo de este trabajo fue identificar desbalances genómicos en una muestra de pacientes con RM idiopático y establecer la correlación genotipo/fenotipo. Se seleccionaron 30 pacientes con RM y dismorfias que no presentaban cuadros sindrómicos, antecedentes perinatales adversos o exposición prenatal a teratógenos, derivados al CNMG para diagnóstico y asesoramiento genético. Se descartaron anomalías cromosómicas, Fragilidad del X y delecciones subteloméricas por técnicas citogenéticas y/o moleculares. Se evaluó la presencia de desbalances genómicos por array-CGH utilizando un array específico de 60K de cobertura genómica completa y alta densidad de sondas en los genes/loci implicados en RM. Se identificaron

duplicaciones y/o deleciones en 18/30 pacientes. En 7 de ellos se identificaron sólo CNVs benignas y en 9 se detectaron una o más CNVs de significado incierto. En 2 casos se detectaron deleciones consideradas patogénicas, una de 525 Kb en 16p11.2 y otra de 9,2 Mb en 10q26.12-q26.3. El fenotipo clínico y conductual mostró concordancias y divergencias con desbalances similares comunicados en la literatura. Estos hallazgos aportan nuevas evidencias para delinear el fenotipo de estas dos entidades clínicas. La incorporación del array-CGH en forma sistemática y la correlación genotipo/fenotipo permitiría avanzar en el conocimiento de la etiología del RM y optimizar el asesoramiento genético y la prevención de estos casos.

406. (758) DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: RELEVANCIA DE LA TÉCNICA MLPA EN LA DETECCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES EN EL GEN DE LA DISTROFINA

Samara M.; Cantarella F.; Alanis R.; Espeche L.; Moya G.; Ferreiro V.
Genos S.A.

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 polimorfos (STRs), MLPA (amplificación múltiple de sondas ligadas) y secuenciación directa del gen de la distrofina. Presentamos dos casos que corresponden a pacientes masculinos de 8 y 5 años de edad respectivamente, con signos clínicos de DMD. Mediante la técnica MLPA, en ambos pacientes se observó una disminución en el cociente de dosis (Paciente 1: DQ = 0,110 para el exón 58 y Paciente 2: DQ = 0,266 para el exón 6). El estudio por PCR simplex mostró la amplificación de dichos exones. Para resolver ambos casos se realizó la secuenciación directa del exón correspondiente. El análisis de la secuencia evidenció para el exón 58 un cambio de base C por T en la posición 8609 del ADNc (c.8609C>T) lo que generaría un cambio de Arginina por Stop, y para el exón 6 se halló una deleción de una base en la posición 418 del ADNc (c.418delC) que produce un corrimiento en el marco de lectura con la consiguiente aparición de un codón Stop de traducción a 3 bases de la deleción. Ambas mutaciones mapean sobre la región de hibridación de la sonda de MLPA correspondiente, lo que explicaría la disminución del cociente de dosis en estos pacientes. Finalmente, el fenotipo de ambos pacientes fue consistente con la alteración molecular hallada en los mismos. Se quiere demostrar la relevancia de la técnica de MLPA para el hallazgo de mutaciones puntuales en el gen de la distrofina y la importancia del análisis minucioso de cada caso particular con el objetivo de informar un resultado correcto.

407. (818) ANÁLISIS IN SILICO DE MUTACIONES NOVELES EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA, BASADO EN UNA NUEVA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA PROTEÍNA CYP21A2

Delea M.¹; Bruque D.¹; Taboas M.¹; Fernández C.¹; Buzzalino N.¹; Nadra A.²; Dain L.

Centro Nacional de Genética Médica¹; Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

La deficiencia de 21-hidroxiilasa, representa el 90-95% de los casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC). Este trastorno autosómico recesivo, presenta diferentes manifestaciones clínicas, que van desde una forma grave o clásica que incluye la forma perdedora de sal (PS) y la virilizante simple (VS), hasta una leve de aparición tardía o forma no clásica (NC). La proteína CYP21A2 humana no se ha cristalizado aún, pero recientemente se obtuvo la cristalografía de la 21-hidroxiilasa bovina (OID: 3QZ1) que posee un 81% de identidad de secuencia con la

humana. A partir de esta cristalografía, generamos un nuevo modelado *in silico* de la 21-hidroxiilasa humana utilizando el programa ModellerV9.1. El objetivo de este trabajo fue utilizar este nuevo modelo para evaluar la posible acción deletérea de mutaciones noveles halladas en pacientes con deficiencia de 21-hidroxiilasa de nuestra cohorte. Se incluyeron 8 pacientes (1 VS, 2 PS y 5 NC) en los que se hallaron mutaciones noveles: p.L122R, p.R132C, p.R149C, p.M283V, p.E431K, p.Q481X, p.H466fs y g.2511_2512delGG. Para aquellas mutaciones que no estuviesen asociadas con la unión a cofactores (p.R132C) o que no correspondieran a codones de terminación prematuros (p.Q481X) o corrimientos del marco de lectura (p.H466fs y g.2511_2512delGG), se evaluó la estabilidad proteica ($\Delta\Delta G$) mediante el algoritmo FoldX3.0. Los valores de $\Delta\Delta G$ hallados fueron: p.L122R: 1,01±0,53; p.R149C: 0,73±0,26; p.M283V: 1,3±0,01 y p.E431K: 0,35±0,08. Estos resultados demuestran una diferencia en la estabilidad proteica para 3 de las 4 mutantes. Para la mutación p.E431K, es posible que el efecto patogénico se deba a una diferencia en la carga neta de la región proteica involucrada. Este análisis permite estimar la influencia de estas mutaciones en el efecto patogénico de la proteína.

HEMATOLOGÍA 2

408. (120) DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ADN LIBRE EN PLASMA DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

Nilva G.¹; Bosquiazzo V.^{1,2}; Paduan B.¹; Cuestas V.¹; Varayoud J.²; Ramos J.^{1,2}

Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral².

En respuesta al tratamiento, los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) deberían alcanzar remisión hematológica (hemograma normal), citogenética (ausencia de cromosoma Filadelfia) y molecular (porcentaje de BCR-ABL/ABL \leq 0,01% en escala internacional). En los últimos años se ha asociado la presencia de ADN libre en plasma a procesos oncológicos. Nuestro objetivo fue establecer el rango de normalidad de la concentración de ADN libre en plasma y evaluar si dicho parámetro puede utilizarse como un factor pronóstico de respuesta al tratamiento en pacientes con LMC. Se utilizaron muestras de plasma de 20 individuos clínicamente sanos y de 6 pacientes con LMC al diagnóstico y al cabo de diferentes meses después de iniciado el tratamiento. Se aisló el ADN libre de cada muestra usando el kit *QiAamp DNA Blood Mini* (Qiagen) y su concentración total se evaluó por PCR en tiempo real para la determinación del gen de β -globina. A los pacientes con LMC también se les extrajo una muestra de sangre para la cuantificación de la expresión del gen de fusión BCR-ABL por PCR en tiempo real. El rango de concentración normal de ADN libre en plasma fue de 0.052-0.244 ng/ μ l. La concentración de ADN libre en plasma de pacientes con LMC al momento del diagnóstico de la enfermedad fue significativamente mayor que los valores obtenidos en una etapa avanzada de tratamiento ($p < 0,05$). La concentración de ADN libre en plasma de los pacientes con LMC se correlacionó positivamente con la respuesta hematológica ($p < 0,05$), pero no existió correlación con la respuesta molecular, evaluada por la determinación de la expresión de BCR-ABL. Estos resultados sugieren que la cuantificación del ADN libre en plasma podría constituir un factor pronóstico sensible que indicaría éxito terapéutico en la fase crónica de la LMC.

409. (354) EL DIACILGICEROL Y EL ACIDO FOSFATIDICO AUMENTAN LA DEFORMABILIDAD DE LOS ERITROCITOS HUMANOS POR UN MECANISMO QUE REGULA LA ACTIVIDAD PMCA CUANDO LA ENZIMA ESTÁ UNIDA A TUBULINA

Monesterolo N.; Santander V.; Nigra A.; Amaiden M.; Rivelli J.; Casale C.

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional De Río Cuarto, Córdoba.

En trabajos previos demostramos que la deformabilidad eritrocitaria depende del contenido de tubulina de membrana. Por otro lado, la tubulina afecta la actividad PMCA dependiendo de la composición lipídica en donde está inmersa la enzima, los lípidos neutros pueden aumentar o disminuir la actividad PMCA dependiendo de la cantidad de tubulina presente, mientras que los lípidos ácidos provocan mayor activación en presencia de tubulina. En este trabajo investigamos el efecto de los lípidos diacilglicerol (DAG) y ácido fosfatídico (PA) sobre la deformabilidad eritrocitaria y su relación con la actividad PMCA. Hemos encontrado que: i) los activadores de la PMCA, calmodulina, DAG y PA aumentan la deformabilidad eritrocitaria, ii) en glóbulos rojos humanos la tubulina se asocia a la PMCA y regula la actividad de esta enzima, iii) hay una correlación directa entre la actividad de la PMCA y la deformabilidad eritrocitaria, iv) la tubulina unida a la PMCA potencia los cambios en la deformabilidad eritrocitaria debido a que aumenta el efecto activador del DAG o PA sobre la actividad enzimática, v) el DAG y PA el aumenta la deformabilidad eritrocitaria si la tubulina está presente en la membrana de los eritrocitos y vi) el DAG y el PA provocan una redistribución de la tubulina en eritrocitos humanos aumentando el contenido del isotipo acetilado en la membrana. Nuestros resultados indican que el complejo tubulina/PMCA está involucrado en la deformabilidad de los eritrocitos humanos tanto normotensos como hipertensos, un aumento en la tubulina acetilada de membrana provocado por DAG o PA causa un aumento tanto en la actividad PMCA como en la deformabilidad eritrocitaria.

410. (398) ROL DEL INTERFERÓN BETA EN LA PRODUCCIÓN Y FUNCIÓN DE PLAQUETAS

Rivadeneira L.¹; Pozner R.¹; Fondevila C.²; Meiss R.³; Centurin M.⁴; Gómez R.⁵; Schattner M.¹

Laboratorio de Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)- CONICET, Academia Nacional de Medicina¹; Servicio de Hematóloga, Clínica Bazterrica. C.A.B.A., Argentina.²; División Patología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina³; Sección Ginecología Endocrina y Reproducción, Hospital Bernardino Rivadavia. C.A.B.A., Argentina⁴; Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina⁵.

En estudios previos demostramos que la infección de células CD34⁺ con Virus Junin o el tratamiento con un mimético de la replicación viral, Poly (I:C) (PIC), altera la producción de plaquetas (Pt) *in vitro* sin afectar la generación de megacariocitos (Mc). Estos hallazgos fueron asociados a la producción de interferones de tipo I (IFN I, α y β) identificando a estas moléculas como reguladores selectivos de la trombopoyesis. En este trabajo profundizamos el impacto del IFN β en este proceso. Los resultados *in vitro* mostraron una significativa inhibición en la unión del fibrinógeno inducida por trombina en Pt generadas en cultivo de megacariocitos (Mc) tratados con PIC o IFN β (IC₅₀: 6,5 μ g/ml y 7,6 U/ml, respectivamente, n=3) no asociada a una alteración en la expresión de CD61. La inoculación diaria de PIC (100 μ g) en ratones C57BL/6 (n=6) provocó una disminución significativa del recuento plaquetario (28, 54, 67% a las 24-48-72 hs) y un aumento en el volumen plaquetario medio (VPM, 8 y 13% a las 48-72 hs). Análisis histológicos de la médula ósea mostraron que no hubo variación en el número de Mc, pero sí un aumento significativo del tamaño debido al tratamiento con PIC. La unión al fibrinógeno y la exposición de P-selectina en plaquetas estimuladas con trombina disminuyeron significativamente a las 72 hs (51 y 33% de inhibición, citofluorimetría). Los niveles de IFN β en plasma de ratones tratados con PIC fueron significativamente mayores que los de los controles (C: 30 \pm 19, 30 \pm 19, 57 \pm 20, PIC: 89 \pm 19, 101 \pm 26, 126 \pm 21 pg/ml a las 24-48-72 hs, ELISA, media \pm EEM, n=6). El recuento plaquetario correlacionó con los niveles de IFN β (R=0,977), mientras que el VPM y las respuestas funcionales no.

En conclusión, los datos sugieren que el PIC inhibe la biogénesis y funcionalidad plaquetaria. Este efecto se asoció con alteraciones cualitativas de los Mc de la médula ósea y con un incremento en los niveles plasmáticos de IFN β .

411. (532) NUEVOS ASPECTOS DE LA FUNCIONALIDAD PLAQUETARIA EN EL DESORDEN PLAQUETARIO FAMILIAR CON PREDISPOSICIÓN A LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (DPF/LMA)

Glembotsky A.; Marin C.; Espasandin Y.; Goette N.; Marta R.; Molinas F.; Heller P.

Hematología Investigación, Instituto Alfredo Lanari, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El DPF/LMA es un desorden hereditario caracterizado por mutación del factor de transcripción RUNX1, trombocitopenia, disfunción plaquetaria y predisposición leucémica. Previamente demostramos que la alteración en la agregación plaquetaria se debe a coexistencia de defecto de pool de depósito y alteración de la activación del receptor del fibrinógeno α IIb β 3. El objetivo fue estudiar otros aspectos de la función plaquetaria, focalizando en la adhesión, fundamental en la hemostasia primaria, y en el mecanismo *outside-in*, desencadenado por unión de fibrinógeno, que induce reorganización de citoesqueleto, consolidando el trombo. La expresión plaquetaria de la integrina α 2, receptor de adhesión al colágeno, se halló disminuida en pacientes (n=4), por citometría de flujo, Gm: 3.9 \pm 0.9 vs 8.5 \pm 2.6, p=0.01 y por PCR en tiempo real (ratio: 0.4 \pm 0.1 vs 1 \pm 0.4), siendo la adhesión de plaquetas a colágeno tipo I fibrilar, 74.8 \pm 11% del control. La adhesión de plaquetas a fibrinógeno (*outside-in*) mostró tendencia a aumento de plaquetas redondas o con filopodia y disminución de lamelipodia, 0.9 \pm 0.5 vs. 17.5 \pm 11.5, 12.4 \pm 3 vs. 29.4 \pm 10.2 y 86.6 \pm 1.9 vs. 53 \pm 16.3%, p>0.05, respectivamente (fluorescencia con faloidina) e indujo menor fosforilación de la integrina β 3 (Western blot). Se halló menor expresión de la cadena reguladora de miosina (MLC) (PCR, 0.08 \pm 0.01 vs 1 \pm 0.2, p=0.001), lo que podría explicar el defecto del *outside-in*. En conclusión, la alteración en las primeras etapas de la función plaquetaria, caracterizada por disminución de un receptor de adhesión, y de las etapas finales, representadas por el *outside-in* indican, junto con el defecto de agregación ya descrito, que la trombocitopatía del DPF/LMA es multifactorial e involucra distintos aspectos de la hemostasia. La posible relación de estos defectos con moléculas blanco del RUNX1, candidato en el caso de la integrina α 2, o demostrado, como la MLC, contribuyen al conocimiento de la regulación molecular de la función plaquetaria.

412. (536) FISIOLÓGIA DEL HIERRO EN PÁNCREAS EN UN MODELO DE RATÓN DE SOBRECARGA DE HIERRO: TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1 Y HEPICIDINA

Giorgi G.; Roque M.

Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

La presencia de Hepsidina y del Transportador de Metales Divalentes1 (DMT1) en células de los islotes de Langerhans, abrió nuevas perspectivas en el estudio de la fisiología del hierro (Fe) en patologías pancreáticas, sugiriendo una nueva función de este órgano, sumada a su conocida regulación de la glucemia. Se propone estudiar en un modelo de ratón con sobrecarga de Fe, la expresión de DMT1 y Hepsidina pancreáticas, comparándolas con la expresión de ambas proteínas en duodeno e hígado, como tejidos representativos de captación y depósito de Fe, respectivamente. Ratones hembras CF1 (n=9/grupo, diseño pareado) se dividieron en 2 grupos: 1) *Sobrecarga de hierro*: ip Fe-Sacarato cada 48hs/18días (3g/Kg); 2) *Adecuado hierro (control)*: ip Solución Fisiológica. Día 20: *Imunohistoquímica (IHQ)*: anti-DMT1, páncreas y duodeno/ anti-Prohepsidina, páncreas e hígado (para evaluar Hepsidina); anti-rabbit (HRP). *Western Blot* (páncreas, duodeno): anti-DMT1/ anti-rabbit (HRP); anti-actina. Estudio cualitativo de Fe: Tinción de Perl's. La presencia de hemosiderina en el tejido conectivo interaccinar pancreático podría

sugerir que el páncreas, en exceso de Fe, cumpliría una función de depósito de Fe análoga al hígado. Estudios de IHQ mostraron expresión de DMT1 en células de Langerhans en adecuado Fe y en sobrecarga; en enterocitos se identificó DMT1 en la zona perinuclear en exceso de Fe y su distribución fue citoplasmática en el control. Western Blot de páncreas y duodeno mostró una clara disminución de DMT1 en exceso de Fe. Abundantes células de islotes de Langerhans y hepatocitos fueron inmunopositivas para Prohepcidina en exceso de Fe. Podemos concluir que la vía de importación de Fe mediada por DMT1 pancreática compartiría mecanismos regulatorios con DMT1 duodenal en exceso de Fe. Finalmente, la correlación inversa observada entre Hepcidina y DMT1 por efecto del Fe en páncreas y duodeno, apoyaría la existencia de una coordinación regulatoria en la red de proteínas del ciclo del hierro.

413. (760) EL AUMENTO DE TEMPERATURA INDUCE ERIP-TOSIS EN ESFEROCITOSIS HEREDITARIA

Crisp R.¹; Vota D.²; García E.³; Vittori D.²; Rapetti M.⁴; Donato H.⁴; Nesse A.²

División Hematología Clínica, Departamento de Medicina, Hospital Nacional Alejandro Posadas¹; Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; División Hematología y Oncología Pediátrica, Hospital Alejandro Posadas³; Hospital Del Niño de San Justo, Buenos Aires⁴.

En pacientes con esferocitosis hereditaria (ESH) es común que se desencadenen crisis hemolíticas durante episodios infecciosos. El objetivo de este estudio fue evaluar la posibilidad de que el agravamiento de la anemia por los procesos febriles sea debido en parte al incremento de temperatura. Se expusieron hematíes de pacientes (ESH) y de controles normales (CN) durante 24 h a 36,5 y 38,5°C, simulando la temperatura corporal normal y el estado febril, con el fin de explorar el desarrollo de eriptosis y los posibles mecanismos involucrados. El nivel de eriptosis (encogimiento celular y exposición de fosfatidilserina, PS), el estrés oxidativo (ROS y GSH) y el calcio intracelular fueron evaluados por citometría de flujo. En los CN el% de células eriptóticas y la exposición de PS a 36,5 y 38,5°C no mostraron diferencias significativas, mientras que los eritrocitos de ESH mostraron un aumento significativo de células eriptóticas (36,5 vs 38,5°C: 23,3±4,4% vs 40,4±7,0%; n=9; P<0,01) y de exposición de PS (6,0±1,0% vs 13,5±2,2%; n=9; P<0,01). La eriptosis puede ser desencadenada por el incremento de calcio intracelular o por un elevado estrés oxidativo. El incremento de la temperatura no desencadenó variaciones significativas, ni para los EHS ni para los CN, en las ROS y en el contenido de glutatión. Sin embargo, el incremento de temperatura en los esferocitos produjo un aumento significativo del calcio intracelular, sin que se modificara sustancialmente en los hematíes normales: la intensidad de fluorescencia media fue 56,1±6,5 vs 60,4±1,1 en CN (n=3) y 77,3±7,4 vs 143,7±44,4 en ESH (n=6; P<0,05). El secuestro de calcio en el medio de incubación permitió disminuir significativamente la eriptosis generada por el incremento de temperatura. Los resultados muestran que la hipertermia genera un aumento de signos de eriptosis, mediada por el incremento de calcio intracelular, en los eritrocitos de pacientes con EHS con respecto a los de los CN.

414. (842) INHIBICIÓN DE LA TROMBOPOYESIS COMO UN NUEVO MECANISMO CONTRIBUYENTE A LA DISMINUCIÓN DEL RECUENTO DE PLAQUETAS (PL) EN LA TROMBOCITOPENIA INMUNE PRIMARIA (PTI)

Grodziński M.¹; Lev P.¹; Goette N.¹; Glembotsky A.¹; Espasandín Y.¹; Pierdominici M.²; Montero V.³; Molinas F.¹; Heller P.¹; Marta R.¹

Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari¹; Departamento de Hematología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina²; Departamento de Análisis Clínicos, Centro de Educación Médica e Investigación Clínica "Norberto Quiró".

Además del clásico mecanismo de destrucción periférica de PL, se ha demostrado que existe una inhibición de la megacariopoyesis que contribuye a la trombocitopenia en la PTI, provocada por la unión de auto-anticuerpos a glicoproteínas del megacariocito (MK). Sin embargo, dado que los MK no están disminuidos en médula ósea y que dichas glicoproteínas tienen un rol en la producción de PL, postulamos la existencia de una alteración en la formación de PL (trombopoyesis) en la PTI. Para comprobarla, estudiamos el efecto del plasma de pacientes adultos con PTI (recuento de PL, 35±17x10⁹/L) sobre la formación de proplaquetas (PP) de MK normales obtenidos a partir de progenitores CD34+ de sangre de cordón umbilical. Los progenitores hematopoyéticos se cultivaron hasta obtener MK maduros (día 13 de cultivo), momento en el cual se adicionó 10% de plasma de pacientes (n=21) o controles (n=18). Luego de 48 horas de cultivo, se evaluó el% de MK produciendo PP mediante recuento en microscopio invertido y su morfología por inmunofluorescencia. Los plasmas de PTI indujeron inhibición de la formación de PP (2.57±1.53% [media±SD]) vs controles (4.93±1.03%, p<0.0001). La fracción de IgG purificada de plasma de PTI reprodujo el efecto observado por el plasma, mientras que el plasma depletado de auto-anticuerpos por incubación con plaquetas normales, revirtió parcialmente el efecto inhibitorio. La alteración en la formación de PP inducida por un grupo de plasmas de PTI conteniendo auto-anticuerpos anti-GPIIb-IIIa estuvo relacionada con una alteración de la funcionalidad de la integrina, evidenciada por la disminución de la unión de PAC-1 (anticuerpo específico contra el sitio activo) (3 de 4 pacientes). La presencia de auto-anticuerpos anti-GPIIb-IIIa (receptor de colágeno), se asoció con la pérdida de la capacidad normal de inhibir la formación de PP sobre una matriz de colágeno de tipo I (3 de 3 pacientes). El análisis de la arquitectura de las PP reveló que los MK incubados con plasma de pacientes produjeron MK con menos PP, más cortas y engrosadas, con menor cantidad de swellings y de tips. Estos resultados demuestran que existe una alteración cuali y cuantitativa de la trombopoyesis inducida, al menos en parte, por los auto-anticuerpos producidos en la PTI y que el mecanismo de inhibición depende de las características de los auto-anticuerpos.

NEFROLOGÍA 2

415. (71) DIFERENCIA LIGADA AL SEXO EN LA EXCRECIÓN URINARIA DEL TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS 5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CLORURO MERCURICO

Hazelhoff M.; Bulacio R.; Chevalier A.; Torres A.

Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, CONICET.

El transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) es un intercambiador anión orgánico/dicarboxilato presente en membrana apical del túbulo proximal renal. Nuestro grupo fue pionero en detectar Oat5 en orina y en proponer a su excreción urinaria como marcador temprano de insuficiencia renal aguda (IRA). En este trabajo se determinó si existe diferencia ligada al sexo en la excreción urinaria de Oat5 en ratas controles (C) y tratadas (T) con cloruro mercurico (HgCl₂, 4 mg/kg p.c., i.p.; 18 h antes). Se usaron ratas Wistar adultas, machos (M) y hembras (H). Se evaluó la excreción urinaria de Oat5 (Oat5u) y su expresión renal en homogenados (Oat5h) y en membranas plasmáticas (Oat5mp) mediante inmunoblotting. También se analizó el clearance de creatinina (ClCr) con técnicas convencionales y los niveles de mercurio en plasma (Hgp) y en orina (Hgo) mediante espectrometría de absorción atómica con vapor frío. Resultados (n=4 para cada grupo experimental):

-Las hembras mostraron mayor excreción urinaria y expresión renal de Oat5 que los machos (*) p< 0.05.

	Oat5u (%)	Oat5h (%)	Oat5mp (%)
MC	100±6	100±3	100±2
HC	209±19*	167±12*	121±3*

-El tratamiento con HgCl₂ ocasionó aumento en la excreción urinaria de Oat5 y disminución en su expresión renal en ambos sexos. (*) p< 0.05 vs MC; (#) p< 0.05 vs HC.

	Oat5o (%)	Oat5h (%)	Oat5mp (%)	ClCr (%)
MC	100±6	100±3	10 0±2	100±19
MT	794±146*	54±2*	67±4*	8±1*
HC	100±4	100±6	100±1	100±17
HT	541±120 #	56±5 #	68 ±5 #	24±7 #

Hgo (ug/mL): MT = 3.91±0.57; HT = 3.80±0.97. Hgp (ug/mL): MT = 1.93±0.49; HT = 2.59±0.44. Los resultados muestran que existe diferencia ligada al sexo en la expresión renal y en la excreción urinaria de Oat5. En IRA inducida por HgCl₂ la expresión renal de Oat5 disminuye y Oat5o aumenta en ambos sexos. El menor porcentaje de aumento de Oat5o en HT (HT 441% vs MT 694%) podría deberse a la menor nefrotoxicidad inducida por HgCl₂ en HT según lo previamente descripto.

416. (250) LA OUABAINA PROTEGE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS ENDOTELIALES GLOMERULARES RENALES HUMANAS DEL EFECTO DE LAS TOXINAS SHIGA TIPO 2 (STX2) Y SUBTILASA (SUBAB)

Girard M.; Ibarra C.; Amaral M.

Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La apoptosis de células endoteliales y epiteliales renales observada en biopsias de pacientes que desarrollan Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) pone en evidencia la citotoxicidad de Stx2. Además, se postula que SubAB presente en cepas de *E. coli* productor de Stx2 también contribuiría al desarrollo del SUH. Previamente demostramos que Stx2 y SubAB disminuyen la viabilidad celular e inducen apoptosis de cultivos primarios de células endoteliales glomerulares humanas (HGEC). Recientemente, se propuso que la Ouabaina (OUA) protegería a células epiteliales renales de rata de la apoptosis causada por la Stx2. El objetivo de este trabajo fue estudiar si el pretratamiento con OUA disminuye la citotoxicidad de Stx2 y de SubAB en células endoteliales y epiteliales humanas. Para ello se utilizaron cultivos primarios de HGEC y las líneas celulares modelo de epitelio renal humano (HK-2) y de mono (VERO). Las HGEC se aislaron de fragmentos de riñones pediátricos provenientes de nefrectomías realizadas en el Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas". La viabilidad se determinó por incorporación de rojo neutro. Las células VERO se incubaron con OUA (2,5 nM-100 nM) por 72 hs para determinar la mínima concentración no citotóxica *per se* en ensayos de viabilidad celular. Luego, monocapas de VERO, HGEC y HK-2 se pretrataron con OUA (5-30 nM) por 24 hs y a continuación se incubaron con esas concentraciones de OUA en presencia de Stx2 (10-20 ng/ml) o SubAB (100 ng/ml) por 48 hs. La protección máxima en la viabilidad celular se obtuvo con 10 nM OUA para las células VERO (86%, n= 5, p<0,05) y 20 nM OUA para las HK-2 (72,5%, n= 5, p<0,05) y HGEC (50,5%, n= 4, p<0,05). Por otra parte, 20 nM OUA protegió a las HGEC (89%, n= 4, p<0,05) de la acción citotóxica de la SubAB. Estos resultados indican que la Ouabaina es capaz de proteger a las células renales del daño causado por Stx2 y SubAB y su uso podría implementarse para prevenir la insuficiencia renal aguda observada en pacientes con SUH.

417. (641) EXPRESIÓN RENAL DE ARNM DE LA SUBUNIDAD ALFA1 DE LA BOMBA NA⁺, K⁺-ATPASA LUEGO DE LA OVARIECTOMÍA Y SOBRECARGA DE SODIO

Di Ciano L.; Azurmendi P.; Guevara D.; Oddo E.; Arrizurieta E.; Ibarra F.

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La adaptación a la dieta hipersódica (HS) en ratas hembras intactas (HI) resulta en un aumento en la fosforilación de la subu-

nidad $\alpha 1$ de la bomba de Na⁺, K⁺-ATPasa (NKA) pero en ratas ovariectomizadas (oVx) la fosforilación de la NKA está disminuida, con retención de sodio e incremento de la presión arterial media (PAM) (*Clin Exp Hypertens* 2013). Nuestro objetivo es analizar si la oVx y la dieta HS inducen cambios en la expresión renal del ARNm NKA. Se estudiaron ratas Wistar HI y oVx. La oVx se realizó el día 60 de vida y los estudios comenzaron a los 150 días. Los animales consumieron dieta normosódica (NS, NaCl 0.24%) y dieta HS (NaCl 1%) en agua de bebida durante 5 días. Se determinó diuresis (V), natriuresis (ENa⁺), PAM, filtrado glomerular (FG, inulina) y expresión de ARNm NKA, al 5to día de cada dieta. La cuantificación de ARNm NKA se realizó por PCR en tiempo real, extrayendo previamente el ARN total de corteza (C) y médula (M) renal y posterior obtención de cADN para cada uno de los grupos; los resultados se expresaron como la tasa de cambio de ARNm NKA con respecto al ARNm de β actina. El V (ml/día/100gPC) fue mayor en ratas HS HI y oVx comparadas con dieta NS (p<0.01 vs HS). La ENa⁺ (mEq/día/100gPC) fue mayor en ratas HS vs NS, pero menor en oVxHS comparado con HIHS (p<0.05). La PAM (mmHg) fue mayor en oVxHS comparado con el resto de los grupos (HIHS 106±4 vs oVxNS 96±7 y HIHS 112±4 vs oVxHS 134±4; p<0.01). No hubo cambios en el FG. El ARNm NKA (2⁻¹ α 1NKA/ β actina) fue igual en HI y oVx NS (HIHS C 0.0068±0.002, M 0.0075±0.002 vs oVxNS C 0.0071±0.002, M 0.0058±0.002), pero disminuyó significativamente en HIHS en C y M y no cambió en oVxHS (HIHS C 0.004±0.001*, M 0.0038±0.0002* vs oVxHS C 0.007±0.0006, M 0.0079±0.005; *p<0.05 vs HIHS). La disminución de la expresión de ARNm $\alpha 1$ NKA durante una sobrecarga salina en ratas hembras intactas es un mecanismo regulador del balance de sodio insuficiente en las ratas ovariectomizadas.

418. (747) EFECTOS RENALES DE LA TOXINA SUBTILASA ASOCIADA AL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

Seyahian E.^{1,4}; Ochoa F.¹; Melendi S.¹; Chiquillito F.¹; Araoz A.¹; Hermes R.³; Ibarra C.¹; Lago N.²; Zotta E.¹

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; Laboratorio Central, Hospital Juan A. Fernández³; Universidad Maimónides, Buenos Aires⁴.

En Argentina, el SUH es la primera causa de falla renal aguda en niños. *E. coli* O113:H21, produce la citotoxina subtilasa (SubAB) cuyos efectos están en estudio. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos renales de SubAB. Ratas machos, Sprague Dawley de 200 g fueron inoculadas por vía intraperitoneal con 5uL de SubAB (1,49 μ g/ μ L). El grupo control se inoculó con el mismo volumen de solución salina. Se realizaron estudios inmunohistoquímicos (IHQ), funcionales y moleculares a 48 hs y 20 d post inoculación. Histológicamente a 48 hs detectamos necrosis tubular y glomerular. El estudio del transporte de proteínas mostró un aumento del ARNm de megalina por RT-PCR con disminución de su expresión por IHQ al igual que NHE-3. A los 20 d por IHQ no detectamos megalina, mientras que NHE-3, normalizó su expresión. A los 20 d se observó esclerosis glomerular focal y segmentaria. La respuesta tubular por western blot se caracterizó por una transformación epitelio mesenquimática (EMT) evidenciada por el aumento de expresión de FSP-1 y TGF beta1. Los estudios funcionales en orina indicaron microalbuminuria. El daño de la barrera de filtración demostrado por la condensación de los tonofilamentos reportada previamente, aumentaría la oferta de albúmina al túbulo proximal con la estimulación de la síntesis de megalina. El daño tubular a las 48 hs podría ser la causa de su falta de expresión en membrana, que es máxima a los 20 d. La disminución de NHE-3 a las 48 hs indicaría una alteración de la acidificación del endosoma temprano con la imposibilidad del reciclaje de megalina a la membrana, mecanismo facilitado por el aumento del TGF beta y la EMT. La disminución del volumen circulante efectivo por la ascitis ya descrita a los 20 d podría explicar la normalización de la expresión de este transportador. En conclusión SubAB desarrolla microalbuminuria, alteración de la barrera de filtración glomerular y del sistema de endocitosis del túbulo proximal.

FISIOLOGÍA CELULAR 2

419. (208) EFECTOS DEL MASTOPARÁN 7 SOBRE LA SALIDA DE ATP DE ERITROCITOS HUMANOS: PARTICIPACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR Y LA ADHESIÓN CELULAR

Leal Denis M.; Incicco J.; Espelt M.; Schwarzbach P.
Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Los eritrocitos humanos liberan ATP al medio extracelular en respuesta a la deformación mecánica, la estimulación adrenérgica, la hipoxia y la acidosis. *In vitro*, la exposición de estas células al péptido mastoparán 7 (MST7) induce un aumento de la concentración de AMPc, lo que desencadena eventos intracelulares que activan la salida de ATP. En este trabajo se estudió la participación del volumen celular y la adhesión celular en la liberación de ATP inducida por MST7. Para ello, se determinaron las cinéticas de volumen celular y de acumulación de ATP extracelular (ATPe) en células adheridas a distintos sustratos, y en células sin adherir. Se observó que en células adheridas con poli-D-lisina y expuestas a MST7, la concentración de ATPe se incrementa de 0.50 ± 0.11 pmol/10⁶ cel a 3.41 ± 0.25 pmol/10⁶ cel. En células adheridas a otros sustratos se observan incrementos de distinta magnitud. Al evaluar el volumen celular de células adheridas a poli-D-lisina se observó que: 1- en medio isosmótico, el MST7 indujo un aumento de volumen de $10 \pm 1\%$; 2- en MST7 disuelto en medio hiperosmótico, este aumento de volumen pudo ser bloqueado, mientras que la salida de ATP se redujo en un 60% (comparado con MST7 en medio isosmótico). En células no adheridas expuestas a MST7 no se observó salida de ATP ni variación del volumen celular. En conclusión, en eritrocitos humanos la adhesión celular - a distintos sustratos- es un pre-estimulo necesario para inducir la salida de ATP por MST7. Esta salida es parcialmente dependiente del volumen celular. Las cinéticas del cambio de volumen y de acumulación de ATPe son similares, lo que sugiere una relación causa-efecto. Se presentará un modelo matemático que predice, en células adheridas expuestas a MST7, los flujos de salida de ATP asociados a los cambios en la concentración de ATPe observados en medios iso- e hiperosmótico. Con subsidios de UBACYT (20020100100090), CONICET (PIP1187) y ANPCyT (0151).

420. (322) LA MAQUINARIA DE TRANSPORTE DE CATEPSINA D EN CÉLULAS DE TUMORES MAMARIOS Y SU POSIBLE REGULACIÓN HORMONAL

Bannoud N.; Jael Russo S.; Vargas-Roig L.; Sosa M.
Instituto de Histología y Embriología-CONICET-Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Las células tumorales secretan Proteínasas (catepsinas), involucradas en la invasión y metástasis tumoral. Estas enzimas son comúnmente transportadas a lisosomas por receptores a manosa-6-P (MPRs), sortilina o vías alternativas. Se han descrito dos formas de MPRs: catión-dependiente (CD-MPR) y catión-independiente (CI-MPR). El CD-MPR participaría en la exocitosis de enzimas lisosomales. En algunos tipos celulares, la pro-catepsina D (pCatD) (precursor de catepsina D, CatD), interactúa con prosaposina (PSAP) y ambas son distribuidas intracelularmente por el receptor sortilina (Sort). En células de tumores mamarios malignos se observó un incremento en la secreción de pCatD, aunque aún no se conoce su mecanismo. Algunos lo atribuyen a un defecto en la acidificación de compartimientos, y otros a una regulación negativa del CI-MPR inducida por estradiol (EST). Hemos propuesto elucidar el mecanismo de secreción de catepsinas en células tumorales mamarias y su probable regulación hormonal. En una primera etapa estudiamos la expresión de CatD, CD-MPR y Sort en dos líneas celulares (MCF-7 y MDA-MB 231, con y sin receptores a EST respectivamente), en presencia o ausencia de 17beta-EST y/o tamoxifeno (TX), y en presencia o ausencia de NH4Cl. La expresión de las proteínas fue estudiada por inmunoblot en homogenatos celulares. Observamos que la expresión de CatD y CD-MPR es mayor en las células MCF-7. A

su vez, EST incrementó la expresión de CatD y CD-MPR en estas células, y este efecto fue revertido por TX. La hormona no influyó en la expresión de Sort. El tratamiento con NH4Cl disminuyó el nivel intracelular de CatD y aumentó el de pCatD. Estos resultados sugieren que: la expresión de CatD y CD-MPR son influenciadas por EST, lo que justifica las diferencias entre las 2 líneas celulares; el receptor Sort podría ser uno de los mecanismos de transporte de proCatD en estas células; y la mayor expresión y secreción de proCatD no se debería a fallas en el proceso de acidificación.

421. (428) MICRORNAS INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA EN DROSOPHILA MELANOGASTER

De Lella Ezcurra A.; Wappner P.
Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires.

La adaptación a bajos niveles de oxígeno implica la regulación coordinada de una gran cantidad de genes, tendiente a restablecer la homeostasis celular. En mamíferos, esta respuesta a hipoxia está principalmente mediada por un factor de transcripción denominado Factor Inducible por Hipoxia (HIF), el cual actúa como heterodímero: HIF-beta es constitutivo, mientras que HIF-alfa es regulado negativamente por oxígeno. La vía de respuesta a hipoxia se encuentra conservada en *Drosophila melanogaster*, siendo Sima y Tango los ortólogos de HIF-alfa y HIF-beta respectivamente. Estudios realizados en nuestro laboratorio establecieron la participación de la maquinaria de microRNAs (miRNAs) en la respuesta celular a hipoxia en *Drosophila*. Con el objetivo de identificar los miRNAs involucrados, llevamos a cabo un *screen* utilizando una colección de líneas de moscas transgénicas que sobre-expresan los distintos miRNAs predichos en *Drosophila* bajo el control del sistema UAS/Gal4. Utilizamos el repertorio *LDH-lacZ*, que se induce en condiciones de hipoxia fuerte (5% O₂), pero no en hipoxia moderada (11% O₂). En estas condiciones de hipoxia "límite", la sobre-expresión de dos miRNAs, miR-190 y miR-274, indujo la expresión del repertorio. Consistentemente con esto, la sobre-expresión de miR-190 o miR-274 provocó también un aumento en la expresión de un gen blanco de Sima, *fatiga*, en condiciones de normoxia. Asimismo, la pérdida de función de miR-190 o miR-274 produjo una disminución de la expresión de este gen blanco de Sima a 11% de O₂. Estos resultados sugieren fuertemente que miR-190 y miR-274 participan en la regulación de la respuesta a hipoxia en *Drosophila*. Nuestro siguiente objetivo será definir cuáles son los mRNA blanco sobre los cuales operan los miRNAs identificados. De este modo, a través de estudios *in vivo*, podremos aumentar nuestra comprensión de los complejos mecanismos que regulan la respuesta a hipoxia, así como también de la regulación de la expresión génica por miRNAs.

422. (460) EL ANTICUERPO ANTI-AQP4 PRESENTE EN SUE-RO DE PACIENTES CON NEUROMIELITIS ÓPTICA (NMO) AFECTA LA REGULACIÓN DE VOLUMEN EN CÉLULAS DE MÜLLER

Fernández J.; Kalstein M.; Di Giusto G.; Rivarola V.; Ford P.; Capurro C.
Laboratorio de Biomembranas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La NMO afecta principalmente al nervio óptico y la médula espinal. Recientemente se descubrió que los pacientes con NMO producen un anticuerpo específico (IgG-NMO) cuyo blanco es la AQP4, el canal de agua más abundante del SNC. Nuestros estudios previos en astrocitos mostraron que el IgG-NMO induce la endocitosis-degradación de la AQP4 alterando la permeabilidad al agua de la membrana (P₁). Las células de Müller expresan AQP4 y poseen una importante maquinaria reguladora de volumen (RVD) necesaria para contrarrestar el swelling celular que ocurre debido a la intensa actividad neuronal. Sin embargo, se desconoce aún si el IgG-NMO afecta la función de estas células. El objetivo de este trabajo fue evaluar las consecuencias de la unión del IgG-NMO a la AQP4 expresada en células de Müller sobre la respuesta reguladora de volumen. Para ello se utilizó una técnica de videomicroscopía de fluorescencia. Las células fueron

expuestas a suero control o de paciente durante 1h a 4°C o 12h a 37°C, condiciones que impiden o facilitan, respectivamente, la eventual endocitosis-degradación de la AQP4 luego de la unión del anticuerpo. Los resultados muestran que la simple unión del IgG-NMO a la AQP4 (1h, 4°C) no afecta ni el Pf ni el RVD. Por el contrario, la incubación de las células a largo plazo (12h, 37°C) con suero IgG-NMO redujo significativamente el P_i en un 28% ($p < 0.05$) y el RVD en un 31% ($p < 0.05$). Mostramos, además, que el suero IgG-NMO redujo significativamente el aumento de calcio inducido por hipotonía en un 70% ($p < 0.02$) mientras que no afectó el aumento de calcio inducido por un activador del canal de calcio TRPV4 (4aPDD 10mM). Esto indica que, si el suero está afectando al TRPV4, lo hace a través de una vía que se activa específicamente por hipotonía. Concluimos que el IgG-NMO afecta en las células de Müller la expresión de AQP4 disminuyendo el P_i y la respuesta reguladora de volumen, lo que podría alterar la homeostasis del medio extracelular en la retina.

423. (566) LA SUBUNIDAD REGULATORIA $\beta 1$ DEL CANAL DE K+ DE ALTA CONDUCTANCIA CALCIO Y VOLTAJE-DEPENDIENTE (BK) COMO BLANCO ESTRATÉGICO DE SUSTANCIAS VASODILADORAS: ROL DE LOS ESTRÓGENOS

Piccinini L.^{1,2}; Vilche M.^{1,2}; Enrique N.^{1,2}; Asuaje A.^{1,2}; González C.³; Martín P.^{1,2}

GINFIV¹; Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata²; Centro Interdisciplinario en Neurociencia de Valparaíso, Valparaíso, Chile³.

El canal BK es uno de los principales canales iónicos que regulan el potencial de membrana del músculo liso vascular. Se puede encontrar asociado a subunidades auxiliares regulatorias β ($\beta 1-4$) que modulan la cinética, la sensibilidad al Ca^{2+} y al voltaje de este canal. El músculo liso expresa principalmente la subunidad $\beta 1$ y se ha demostrado en sistemas de expresión heteróloga que el 17 β -estradiol modula la actividad del canal BK interactuando con dicha subunidad. En este trabajo, utilizando la técnica de patch-clamp, se evaluó el efecto del 17 β -estradiol sobre las corrientes mediadas por canales BK en células de músculo liso aisladas enzimáticamente a partir de la arteria umbilical humana. El agregado de 17 β -estradiol 10 μ M aumentó significativamente el valor de las corrientes salientes evocadas por un pulso de voltaje desde -50mV a +40mV (control: 403 \pm 160 pA, 17 β -estradiol: 894 \pm 122 pA, N=7, P<0,05), consistente con una activación de canales de K⁺. Además se observó un desplazamiento de la curva corriente voltaje (I-V) hacia la izquierda, lo que indica una hiperpolarización celular y una probable vasorelajación. Para confirmar que las corrientes inducidas por el 17 β -estradiol son llevadas a través del canal BK, se registró el efecto del mismo en presencia de paxilina 500 nM, bloqueante específico para este canal (N=3). En estas condiciones el 17 β -estradiol no generó un efecto significativo sobre las corrientes iónicas. Estos resultados muestran que el 17 β -estradiol en el músculo liso arterial humano es un activador del canal BK. Este efecto podría estar mediado por la presencia de la subunidad $\beta 1$ del canal permitiendo proponer a la misma como blanco estratégico para la acción selectiva de sustancias vasodilatadoras.

424. (787) ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE EL TRANSPORTE DE AGUA A TRAVÉS DE AQP1 Y EL DE NA+ A TRAVÉS DE ENAC CO-EXPRESADOS EN OVOCITOS DE X. LAEVIS

Gutierrez F.¹; Ozu M.¹; Dorr R.²; Toriano R.^{1,2}

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)².

A pesar de existir consenso en el papel de las acuaporinas (AQPs) como actores fundamentales en la permeabilidad al agua de la membrana plasmática, el uso de modelos en que se manipula la expresión de AQPs revela su participación en distintos pro-

cesos del metabolismo celular. En ese sentido AQP1 se describe en células de endotelio y de músculo liso vascular, proponiéndose como transportador de óxido nítrico (NO) y por tanto interviniendo en la regulación de la resistencia vascular. En las mismas células se describe la presencia del canal epitelial de sodio (ENaC). Su función se relacionaría con cambios en las propiedades biomecánicas que la célula sufre frente a distintos estímulos, algunos asociados a la liberación de NO. Estos datos nos permiten hipotetizar una posible interacción entre ambas proteínas en los casos mencionados. Abordamos esta hipótesis usando un sistema heterólogo en el que se coexpresan alternativamente cada una o ambas proteínas. Se realizaron mediciones de corriente a través del ENaC (I_{Na} sensible a amiloride) por clampeo de voltaje y de permeabilidad osmótica (P_{OSM}) por videomicroscopía, perfundiendo los ovocitos con soluciones de distinta osmolaridad e igual fuerza iónica. En todas las condiciones testeadas la I_{Na} resultó significativa respecto del control (ovocitos que expresan H₂O o AQP1) $p < 0.05$ (n=3-6). Al someter a los ovocitos que expresan ENaC o ENaC+AQP1 a un shock hiposmótico, (25mOSM, 90s, 100mV) se observó una disminución de la I_{Na} en ambos casos. Esta disminución fue significativamente menor para los ovocitos con ENaC vs ovocitos ENaC+AQP1 ($p < 0.01$, n=11). Al cabo de 10min, la I_{Na} se recuperó en un 90-95%, aun en condición hipotónica. Respecto de la P_{OSM} no se observaron diferencias significativas entre los ovocitos que expresan AQP1 o ENaC+AQP1, aumentando ambos su permeabilidad de forma similar respecto del control ($p < 0.05$, n=3-8). Nuestros resultados indicarían la existencia de una correlación funcional entre ambas proteínas.

MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR 2

425. (98) CARACTERIZACIÓN Y DIFERENCIACIÓN HEPÁTICA DE CÉLULAS MADRE PLACENTARIAS

Maym J.¹; Pérez Pérez A.²; Parolini O.³; Maskin B.⁴; Jaime M.⁴; Sánchez Margalet V.²; Varone C.¹

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET, Buenos Aires, Argentina¹; Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España²; Centro Di Ricerca E. Menni-Fondazione Poliambulanza- Istituto Ospedaliero, Brescia, Italia³; Hospital Nacional Alejandro Posadas, Buenos Aires, Argentina⁴.

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 ella. 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. Distintos tipos de potenciales células madre pueden ser aisladas del amnios de la placenta humana a término, entre ellas, las células epiteliales amnióticas (hAECs). Las hAECs poseen la capacidad de diferenciarse a los tres tipos de capas germinales. No expresan telomerasa y no son tumorigénicas. Previamente, hemos logrado el eficiente aislamiento y caracterización de las hAECs. Los objetivos del presente trabajo han sido caracterizar como células madre a las hAECs aisladas y determinar la expresión de marcadores de pluripotencia y hepáticos durante el inicio de la diferenciación. Empleando la técnica de qRT-PCR, determinamos que las hAECs expresan niveles significativos de Sox-2, Oct-4 y Nanog, y que su expresión disminuye a medida que transcurren los días en cultivo. Estudiamos también la expresión de estos marcadores y de α -fetoproteína, α_1 AT y albúmina, durante la diferenciación hepática, inducida con factores específicos o con medio condicionado (MC) de células HepG2. Observamos, por microscopía, el cambio en la morfología de las hAECs. Los marcadores de pluripotencia disminuyeron durante el proceso de diferenciación. Por otro lado, determinamos que el MC es capaz de inducir la expresión de marcadores hepáticos, y que el EGF (10ng/ml), no produjo aumento de los mismos, en los primeros 6 días de tratamiento. Sin embargo, el EGF en combinación con dexametasona (0,1 μ M), causó un cambio en la morfología de las hAECs, asimilándose ésta a la morfología de hepatocitos en cultivo. En resumen, logramos determinar que las

hAECs poseen características de células madre. Los resultados indicarían que se ha iniciado un proceso de diferenciación, donde la supresión de los genes de pluripotencia permite la expresión de nuevos genes específicos, que conducirán a las hAECs a la adquisición de un fenotipo hepático.

426. (282) CAMBIOS TOPOGRÁFICOS EN MATRICES POLI-MÉRICAS PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO

Alfano A.; Fernández J.

Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral, LIO MM, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

La Ingeniería de Tejido utiliza materiales que sirvan como soporte para la regeneración de tejidos. Poli-épsilon-caprolactona (PCL) es un polímero ampliamente estudiado en esta área. Cambios en la topografía de las matrices pueden afectar la actividad celular. El objetivo de este trabajo es estudiar cómo afecta la actividad de la enzima fosfatasa alcalina de células osteoprogenitoras de medula ósea de ratas (CPMO), crecidas sobre membranas de PCL tratadas superficialmente luego de 7 y 14 días en medio osteogénico (suplementado con beta-glicerol fosfato y Ac. ascórbico). Además, también se evaluó la citotoxicidad de las membranas creciendo sobre ellas macrófagos RAW 264.7. Para ello se prepararon membranas de PCL mediante la técnica de casting y se realizaron distintos tratamientos con HONa durante diferentes períodos de incubación (2N: 1 y 2 hs; 4N: 1 y 2hs). Se observaron los cambios topográficos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) habiendo un mayor número de grietas y rugosidad luego de 2hs de tratamientos respecto a PCL. Mediante cromatografías de exclusión molecular se observó que no hubo cambios en el peso molecular de los polímeros luego de efectuar los tratamientos. La actividad de fosfatasa alcalina fue superior en luego de 2 hs de tratamiento con HONa, tanto para 2N ($p < 0.05$) como 4N ($p < 0.01$) respecto a PCL luego de 7 días en medio osteogénico. Un efecto similar se observó luego de 14 días de cultivo en dicho medio. En cuanto a la citotoxicidad, se evaluó la producción de citoquinas IL1 y TNF alfa y óxido nítrico. No hubo aumento significativo en la producción de estos marcadores de citotoxicidad por parte de los macrófagos crecidos sobre las membranas luego de 7 días de cultivo respecto a control (células crecidas sobre plato de cultivo). Estos estudios demuestran que los tratamientos superficial con HONa 2H4N y 2H4N pueden mejorar la biocompatibilidad de los materiales basados en PCL.

427. (368) LA ISOFORMA DE FIBRONECTINA QUE INCLUYE EL EXÓN EDA INDUCE UN AUMENTO EN LA PROLIFERACIÓN TANTO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN COMO HUMANAS INCREMENTANDO LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS EN FASE S DEL CICLO CELULAR

Losino N.¹; Solari C.¹; Waisman A.¹; Luzzani C.¹; Cosentino S.¹; Sassone A.¹; Fernández Espinosa D.³; Muro A.²; Miriuka S.³; Barañao L.¹; Guberman A.¹

IQUIBICEN- CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; International Centre For Genetic Engineering And Biotechnology, Trieste, Italia²; Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, Fleni, Argentina³.

Las células madre embrionarias (CME) poseen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente in vitro y de dar origen a células de las tres capas embrionarias, propiedad conocida como pluripotencia, lo que las convierte en una herramienta promisoría en medicina regenerativa. Anteriormente, demostramos mediante el ensayo de MTT que una isoforma de fibronectina (FN) que incluye el exón EDA (FN EDA+) aumentaba la proliferación de CME de ratón. En este trabajo, con el propósito de extender y profundizar dicho hallazgo, estudiamos si esta molécula también aumentaba la proliferación de CME humanas. Asimismo, con el objetivo de analizar si FN EDA+ alteraba la proporción de células en fase S, evaluamos este parámetro mediante la incorporación del análogo de nucleótido BrdU. Mediante dos abordajes experimentales

diferentes proporcionamos FN EDA+ a las CME humanas y CME de ratón. Por un lado, utilizamos medios condicionados por líneas de fibroblastos embrionarios (MEF) provenientes de ratones modificados genéticamente. Los MEF derivados de ratones *wild type* expresan ambas isoformas (FN EDA+ y FN EDA-); los MEF +/- tienen modificado el sitio de splicing, de tal forma que siempre incluyen EDA y finalmente, los MEF -/-, secretan solo FN EDA-, dado que carecen de dicho exón. Por otra parte, suplementamos el medio de proliferación estándar (MP) con un péptido recombinante correspondiente a una porción de FN que incluye o no EDA. Mediante los ensayos de cristal violeta, sanado de herida y/o BrdU demostramos que la presencia de este dominio indujo un aumento de proliferación en todos los casos. Asimismo, observamos que tanto en CME humanas como de ratón, la proporción de células en fase S del ciclo celular resultó mayor en presencia de EDA. El aumento de la proliferación inducido por esta molécula en ambas especies sugiere un posible mecanismo conservado. Esperamos contribuir a mejorar las condiciones de cultivo para la futura aplicación terapéutica de las células madre.

428. (540) ESTUDIO A NIVEL BIOQUÍMICO, MORFOLÓGICO Y MECÁNICO DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO ÓSEO NEOFORMADO EN TORNO A IMPLANTES DE CIRCONIO MODIFICADOS SUPERFICIALMENTE A DIFERENTES TIEMPOS DE IMPLANTACIÓN

Vico T.¹; Ballarre J.¹; Cere S.¹; Baca M.²; Vottolla C.²; Haddad K.²; Katunar M.¹

División Corrosion, Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA)-CONICET, Universidad Nacional de Mar Del Plata¹; Hospital Interzonal General de Agudos (HIGA) "Oscar Alende", Mar Del Plata, Argentina.²

El uso de implantes no cementado está en aumento en todo el mundo y se está haciendo un gran esfuerzo para obtener mejores materiales que promuevan una mayor efectividad a largo tiempo en lo que respecta a fijación. La mayoría de los metales utilizados como implantes no cementados sufren una serie de modificaciones superficiales antes de ser utilizados clínicamente. El circonio (Zr) es un material prometedor para implantes intra-oseos debido a su favorable resistencia a la corrosión, oseointegración y baja liberación de iones metálicos al medio biológico circundante, cuando es comparado con el acero inoxidable y las aleaciones de titanio. El objetivo de este estudio es continuar con el estudio del efecto del tratamiento de anodizado sobre implantes de Zr 15 y 30 días posteriores a la cirugía de implantación. Para ello, se emplearon ratas Wistar macho adultas e implantes de Zr0 (sin tratamiento superficial) e implantes de Zr30 (con tratamiento de anodizado a 30V). Nuestro propósito es avanzar en el entendimiento de los procesos a nivel bioquímico, biológico y mecánico que conducen a la generación del nuevo hueso alrededor del implante metálico. Los resultados encontrados revelaron que los implantes de Zr mostraban una completa y regular formación de tejido óseo alrededor del implante 30 días posteriores a la cirugía. Las características de la formación del hueso fueron analizadas por la marcación con fluorocromos mostraron que el perfil de mineralización no es homogéneo alrededor de los implantes control y tratados, observándose "gaps" entre el implante y el nuevo hueso formado. Cuando cuantificamos la velocidad de aposición mineral encontramos un aumento significativo en los implantes Zr30V. Asimismo encontramos que la formación del nuevo hueso es un proceso complejo, y que este no está altamente organizado pero la formación de este nuevo hueso es mecánicamente resistente. A modo de conclusión, resulta muy importante evaluar el comienzo de la formación del nuevo hueso y la fijación a largo plazo alrededor de los implantes de Zr. Esto permitirá entender los detalles a nivel molecular y bioquímico así como también las características mecánicas que conducen al proceso de oseointegración alrededor de los implantes de Zr transformándolo en un posible candidato para implantes endomedulares permanente.

429. (585) ESTUDIO DEL POTENCIAL PROANGIOGÉNICO DE LOS PRODUCTOS IÓNICOS DE DISOLUCIÓN DE BIOMATERIALES DE TERCERA GENERACIÓN

Haro Durand L.^{1,2}; Cadena V.²; Góngora A.²; Zago P.¹; Baldi A.²; Gorustovich A.¹

Grupo Interdisciplinario de Materiales-IESING-UCASaI¹;
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-
CONICET².

Los biomateriales de tercera generación son materiales bio-reabsorbibles y/o biodegradables que tienen la capacidad de estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular como resultado de la liberación de iones a partir de los mismos. En estudios previos demostramos que las células endoteliales HUVECs poseen mayor respuesta proliferativa y migratoria *in vitro* ante el estímulo con los productos de disolución del vidrio bioactivo del sistema SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ (45S5) modificado con 2% de B₂O₃ (45S5.2B). El objetivo del presente trabajo fue analizar si los efectos observados están mediados por la activación, mediante fosforilación, de proteínas quinasas asociadas a señales proliferativas (ERK) y migratorias (FAK y p38). HUVECs fueron estimuladas durante 30 min con medio de cultivo M199 enriquecido con los productos iónicos de disolución de los vidrios 45S5 y 45S5.2B suplementados o no con bFGF, M199 suplementado con bFGF (control positivo) ó M199 (control negativo). Las células fueron homogenizadas y 20 µL de homogenizados fueron sembrados en un gel de poliácridamida al 8% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Los resultados evidenciaron un aumento estadísticamente significativo (*p<0.05) en los niveles de fosforilación de ERK (p-ERK) en las HUVECs estimuladas con los productos iónicos de disolución del vidrio bioactivo 45S5.2B. A su vez, se observó un aumento (*p<0.05) dosis dependiente en los niveles de p-ERK en HUVECs estimuladas con diferentes concentraciones de B. Por otro lado los niveles de fosforilación de FAK y p38, también mostraron un aumento estadísticamente significativo (*p<0.05) en sus niveles de fosforilación en HUVECs estimuladas con los productos iónicos de disolución del vidrio 45S5.2B. El potencial proangiogénico de los productos iónicos de disolución del vidrio bioactivo 45S5.2B estaría mediado por la activación de proteínas quinasas asociadas a señales proliferativas y migratorias en células endoteliales humanas.

430. (701) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE FIBRONECTINA EDA EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS Y EN SU DIFERENCIACIÓN A PROGENITORES CARDÍACOS

Neiman G.¹; Romorini L.¹; Garate X.¹; Blugermann C.¹; Questa M.¹; Sevelev G.¹; Guberman A.²; Miriuka S.¹

Fleni¹; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

Las células madre pluripotentes (CMP) se pueden propagar indefinidamente en cultivo teniendo la capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares adultos. Las propiedades de las CMP son en parte reguladas por la matriz extracelular, la cual presenta una estructura dinámica y no solo provee un marco estructural sino que otorga señales para el desarrollo y proliferación. La Fibronectina (FN) es un componente principal y presenta una forma plasmática y otra celular. La última incluye el dominio alternativo EDA (FN-EDA+) y se expresa en el desarrollo embriológico. El objetivo de este trabajo es determinar el rol que cumple FN-EDA+ en la mantención de las CMP cultivadas en diferentes matrices (Matrigel (Mg), Laminina (Lam) y Fibroblastos Murinos (MEF)) e investigar su rol a lo largo de la diferenciación de las ESC a cardiomiocitos. En estado indiferenciado, tanto FN-EDA+ como FN-EDA- en Mg y Lam aumentaron 10 veces su expresión con respecto a las cultivadas sobre MEF. Utilizando dos protocolos de diferenciación, uno espontáneo y otro específico para progenitores cardíacos, analizamos el perfil de expresión de mRNA por RT-PCR en los días 0, 4 y 11 (D0, D4 y D11) comparándolo tanto con Fibroblastos Humanos (HFF) como con D0. FN-EDA+ en el D0 se encuentra significativamente más expresada que FN-EDA- y al comparar con HFF, durante la diferenciación, FN-EDA+ llega a un máximo en D10 que representa el 20% de la presente en HFF, mientras FN-EDA- se encuentra en cantidades no detectables. Repetimos los análisis en células madre pluripotentes inducidas a partir de HFF y observamos el mismo perfil de expresión que en las ESC,

tanto en el D0 como durante la diferenciación. En conclusión, la forma de cultivo de las células pluripotentes afecta la expresión génica de las proteínas extracelulares, particularmente FN. Además, la expresión de FN-EDA+ y FN-EDA- varía con el proceso de diferenciación, acercándose a un tipo adulto.

431. (735) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL DE TERCEROS MOLARES

Rodríguez Ceschan M.; Loresi M.; Ielpi M.; Fagundez C.; Pizarro G.; Bagú L.; Barbich M.

ICBME, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires.

La pulpa dental de terceros molares constituye una nueva fuente de células madre mesenquimales que podrían ser utilizadas en aplicaciones de ingeniería de tejidos. El objetivo de nuestro trabajo fue aislar, cultivar y caracterizar células madres de la pulpa dental de terceros molares de donantes jóvenes extraídas por indicación odontológica. Se estudiaron 2 muestras, previa firma de un consentimiento informado. De las muelas extraídas se procedió al aislamiento de la pulpa y posterior digestión enzimática con Colagenasa tipo I y Dispasa. Las células aisladas fueron cultivadas en medio: Alpha MEM (Gibco), suplementado con 15% de Suero Fetal Bovino, 2mM de L-glutamina, 100 µM de ácido ascórbico, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de streptomycin. Una de las muestras fue sucesivamente criopreservada y descongelada previo a su estudio. Los cultivos fueron estudiados entre los pasajes 2 y 7 mediante técnicas moleculares: PCR (OCT-4, C-MYC, ALBUMINA, RUNX2) e inmunocitoquímica (ICQ): CD105, CD90, CD73, CD29, STRO-1, CD34 y CD45, determinándose la media (X) y ± desvío estándar (SD) de los porcentajes (%) de células positivas. Resultados: Las células obtenidas fueron cultivadas y amplificadas por un periodo de tres meses. Mediante PCR se observó, en todos los casos, la expresión de oct-4, c-myc, runx-2 y la ausencia de albumina. En cuanto a ICQ, todas las muestras fueron negativas para CD34 y CD45 y positivas para los demás marcadores., si bien no se encontró un patrón homogéneo en ambas muestras: el caso uno mostró: CD90:73,13 ±15,8%, CD105:82,30 ±12,68%, CD73:94,07 ±2,27%, CD29:97,23 ±0,70%, STRO-1:91,70 ±5,52%. Nuestros resultados confirman la presencia de células de tipo MSCs en la pulpa dental de terceros molares de adultos jóvenes que pudieron ser amplificadas, criopreservadas y mantenidas, manteniendo sus marcadores a lo largo de los pasajes estudiados, la marca de Runx-2 podría mostrar una incipiente diferenciación hacia linaje de tipo osteoblastico.

NEUROCIENCIAS 2

432. (31) EFECTOS DE LA INDUCCION DE DIABETES MELLITUS SOBRE LA ARBORIZACION DENDRITICA Y DENSIDAD DE ESPINAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGION CA1 DEL HIPOCAMPO DE RATAS ESPONTANEMENTE HIPERTENSAS (SHR)

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

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CO-NICET¹; Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

Previamente demostramos que la longitud de dendritas apicales y la densidad de espinas en la región CA1 del hipocampo estaba disminuida en SHR respecto a los controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) (Brocca y col. Exp.Neurol. 2013). Considerando que la Diabetes Mellitus origina una importante encefalopatía, estudiamos los efectos de la diabetes en SHR. Ratas WKY y SHR de 20 semanas recibieron vehículo o 40 mg/kg estreptozotocina (STZ) iv. Al mes de inducción de diabetes, disminuyó la tensión arterial media (TAM) de SHR (188 ±3 vs. 153 ±7 mm Hg, p<0.001) sin cambios en WKY. Secciones del hipocampo fueron impregnadas con nitrato de plata siguiendo el método de Golgi y posteriormente se analizaron las neuronas piramidales de la región CA1 por el método de Sholl. La longitud dendrítica apical fue menor en SHR vs WKY (1313 ±71 vs. 1774 ± 84 µm,

$p < 0.001$). Este parámetro no varió en WKY diabéticas vs. WKY, mientras que se incrementó en SHR diabéticas vs SHR ($1761 \pm 102 \mu\text{m}$, $p < 0.01$). Por análisis de Sholl, la mayor longitud dendrítica apical en las SHR diabéticas se manifestó en el rango 220-300 μm distante al soma. Resultados similares se obtuvieron con las dendritas basales, aunque en este caso el cambio se obtuvo en el rango 120-200 μm . La densidad de espinas apicales fue menor en SHR vs WKY ($p < 0.05$), y disminuyó en las SHR diabéticas vs SHR ($p < 0.05$). La correlación entre TAM y longitud dendrítica de todos los grupos mostró un r^2 0.18 ($p < 0.01$), de manera que a menor longitud dendrítica mayor TAM y viceversa. Los cambios opuestos en longitud dendrítica y densidad de espinas de SHR diabéticas muestran la extrema sensibilidad de la arborización neuronal a los cambios tensionales. Los datos aportan para el conocimiento de la patogénesis de la encefalopatía de la hipertensión + diabetes tipo 1, una asociación cuyo porcentaje se eleva considerablemente con el tiempo de hipertensión.

433. (89) TERAPIA GÉNICA ICV CON IGF-I PARA TRATAR EL DÉFICIT COGNITIVO RELACIONADO A LA EDAD EN LA RATA SENIL

Pardo J.; Morel G.; Reggiani P.; Hereñú C.; Goya R.
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata.

La edad es el componente etiológico más importante en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo son escasos los trabajos que examinan los cambios de las células nerviosas en animales muy viejos. La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia, y la contribución del envejecimiento, el principal factor de riesgo, hasta ahora es pobremente entendida. Una posibilidad terapéutica de creciente interés clínico para tratar procesos neurodegenerativos es emplear neurotrofinas, tales como el factor de crecimiento insulino-símil (IGF-I) que prevengan la degeneración y restauren la función de las poblaciones neuronales remanentes. Ha sido demostrado que la administración intracerebroventricular (icv) de IGF-I mejora el aprendizaje espacial incrementando la transmisión sináptica en la región CA1 e induciendo la neurogénesis. Se implementó entonces terapia génica icv de corto plazo (17 días) con un adenovirus codificante para IGF-I o con su contraparte control codificante para la proteína fluorescente roja DsRed en ratas hembra seniles y se evaluó su performance cognitiva antes y después del tratamiento, en el laberinto de Barnes. Se evaluaron parámetros tales como: tiempo para encontrar el agujero meta, número de errores al acceder a la meta y preferencia por la región meta (agujeros -2, -1, 0, 1 y 2). Se observó que las ratas tratadas con IGF-I exploraron un 14% más la región meta en el ensayo de evaluación sin caja en comparación con los datos previos al tratamiento. Los controles DsRed mejoraron su desempeño sólo en un 4%. Sin embargo durante la adquisición del aprendizaje espacial en los ensayos con caja no se observaron diferencias significativas en la latencia y los errores, aunque las ratas tratadas con IGF-I se mostraron más regulares en estos parámetros. Se concluye que en la rata senil la sobreexpresión icv de IGF-I de corto plazo mediada por un vector adenoviral, induce una moderada mejoría en la función cognitiva.

434. (95) 3,3-DIBROMOFLAVANONA, UNA NUEVA Y PROMISORIA DROGA ANTINOCICEPTIVA CON MENORES EFECTOS ADVERSOS QUE LA MORFINA

Higgs J.; Wasowski C.; Marder M.
Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: A partir de la evaluación de una serie de flavonoides naturales y sintéticos por su afinidad al receptor mu-opioide surgió la 3,3-dibromoflavanona (DBF) como compuesto líder. DBF administrada en forma aguda intraperitoneal (i.p.) en ratones mostró actividad antinociceptiva dosis dependiente en modelos de analgesia térmica (ensayo de plato caliente) y química (ensayos de contorsiones abdominales y formalina) con

acción central mediada por los receptores mu-opioides. **Objetivos:** Realizar la síntesis de la DBF a mediana escala. Determinar su efecto luego de la administración crónica. Estudiar sus efectos adversos y compararla con la morfina, droga de referencia. **Diseño del estudio:** Se utilizaron ratones Swiss machos de 2 meses y medio de edad administrados con vehículo (VEH), morfina 6 mg/kg o DBF 30 mg/kg en tratamiento agudo (una inyección i.p., 30 min antes del ensayo) o crónico (una inyección i.p. a las 12:00 hs durante 12 días consecutivos). Se realizaron los ensayos de plato caliente, actividad locomotora, malla invertida y evaluación del tránsito gastrointestinal (carbón activado). **Resultados:** La síntesis realizada fue sencilla, de bajo costo y alto rendimiento. Los tratamientos crónicos y agudos con DBF mostraron aumentos significativos en el tiempo de latencia en el ensayo de plato caliente. No se observaron efectos sobre la coordinación motora, modificación de la actividad locomotora o alteración de la motilidad gastrointestinal. El tratamiento crónico con morfina mostró una disminución significativa en el tiempo de latencia en el ensayo del plato caliente, un aumento de la actividad locomotora y la misma disminución sobre el tránsito gastrointestinal con respecto a su tratamiento agudo. **Conclusiones:** La DBF posee un potencial terapéutico relevante y no presenta los efectos adversos característicos de los opiáceos, tales como constipación, alteración de la actividad locomotora y tolerancia.

435. (117) DEXAMETASONA RESCATA LA INTEGRIDAD NEUROVASCULAR DEL DAÑO CELULAR CAUSADO POR LA ADMINISTRACIÓN ENDOVENOSA (E.V.) DE LA TOXINA SHIGA 2 (STX2) Y LPS PRODUCIDAS POR ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) EN EL CUERPO ESTRIADO DE CEREBRO DE RATONES

Pinto A.¹; Cangelosi A.²; Tironi-Farinati C.¹; Geoghegan P.²; Goldstein J.¹

Laboratorio de Neurofisiopatología, Facultad de Medicina; Universidad de Buenos Aires¹; Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos (CNCCB), ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires².

El sistema nervioso central está frecuentemente afectado en pacientes con síndrome urémico hemolítico infectados con Stx2 de EHEC. Además de la Stx2, el LPS secretado puede estar involucrado en la patología. El objetivo fue determinar: i) si el LPS exacerba el efecto deletéreo de la Stx2 en la unidad neurovascular (UN) del cuerpo estriado, ii) si la Stx2 altera el comportamiento motor y iii) la existencia de un compromiso proinflamatorio. Ratones NIH (n=6) fueron inyectados vía e.v. con Stx2 (5 ng/animal) para un ensayo de comportamiento motor y observadas hasta los 8 días de tratamiento. Para determinar la alteración de la UN 4 tratamientos fueron realizados (n=5): Stx2 (5 ng/animal)+LPS (400 ng/animal), Stx2, LPS o vehículo. Los animales fueron perfundidos intracardiamente con fijador hasta los 20 días y sus cerebros fueron sometidos para histofluorescencia con lectinas (*Licopersicum esculentum*) e inmunofluorescencia con anti-VEGF para estudiar el perfil de la microvasculatura; anti-NeuN, anti-MAP2, anti-Gb3 y anti-Stx2 para caracterizar la lesión neuronal; anti-GFAP para determinar reacción astrocitaria. Se observaron alteraciones significativas ($p < 0.05$) en las células endoteliales, neurodegeneración y reacción astrocitaria en los tratados con Stx2+LPS respecto a los controles y entre los tratados con Stx2 respecto a los tratados con LPS. Sin embargo el tratamiento con Dexametasona (7,5mg/kg) redujo significativamente estos cambios ($p < 0.05$). En el ensayo motor, los ratones tratados con Stx2 mostraron una conducta motora significativamente alterada a los 8 días de tratamiento respecto al vehículo ($p < 0.05$). Se concluye que la Stx2 altera la unidad neurovascular y la función motora, el LPS potencializa su acción deletérea, y la Dexametasona logra reducir la encefalopatía generada por ambas toxinas.

436. (155) RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LXR-BETA EN EL HIPOTÁLAMO Y LA RESPUESTA A UNA SOBRECARGA DE GLUCOSA EN RATAS

Coirini H.; Vega M.; Rey M.; Kruse M.

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET.

Los receptores hepáticos X (LXR) son receptores nucleares cruciales en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos. Existen dos subtipos, LXR- α expresado en niveles bajos y variables en el sistema nervioso y el LXR β ampliamente expresado en el cerebro de roedores. Previamente hemos descripto la presencia de este subtipo en el hipotálamo de rata y la relación entre su expresión y los niveles séricos de glucosa. En el presente trabajo evaluamos esa relación utilizando animales adultos nacidos de madres con diabetes experimental. Se utilizó un modelo de diabetes gestacional inducida con estreptozotocina (30mg/Kg peso i.v), y la expresión de LXR se realizó por Western blot. El tejido se obtuvo de animales nacidos de madres diabéticas (OD) y madres controles (OC) a 5 meses de edad, previa realización (48hs) de una prueba de tolerancia a la glucosa (PTG). El área bajo la curva (AUC) obtenida de PTG se calculó utilizando un método de integración trapezoidal. Se analizó la correlación entre las AUC y los niveles hipotalámicos en LXR β . Entre los OD, se observaron dos poblaciones diferentes (AUC <300 vs AUC > 300). Los animales con AUC<300 y los OC, mostraron una correlación negativa (OC: F (1,5)=21/ y=-2,1+464 r²=0,81; OD: F (1,5)=15/ y=-1,0+336 r²=0,76 p<0,01). Mientras que los animales OD con AUC > 300, presentan una correlación positiva (F (1,4)=13/ y=1,3+194 r²=0,76; p<0,01) sugiriendo que este grupo desarrollo intolerancia a la glucosa asociada con una alteración en los LXR β hipotalámica. Estos resultados sugieren que la intolerancia a la glucosa en animales OD mayores de 4 meses de edad puede estar asociada a alteraciones en este tipo de receptor hipotalámico. Estos resultados avalan los obtenidos previamente con otro modelo experimental indicando que la expresión de LXR en el hipotálamo, estaría relacionada con el control de la ingesta y el gasto energético corporal.

437. (164) EFECTO DEL BDNF SOBRE LA VIABILIDAD DE ASTROCITOS

Saba J.; Ramírez D.; Carniglia L.; Durand D.; Lasaga M.; Caruso C.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una neurotrofina que promueve el desarrollo y la supervivencia neuronal. También es un factor protector ya que inhibe la apoptosis de neuronas y de oligodendrocitos. Dado que poco se sabe del efecto del BDNF en los astrocitos, decidimos estudiar los efectos del BDNF sobre la viabilidad de astrocitos. Para esto utilizamos cultivos primarios de astrocitos de rata que fueron incubados por 24 h con BDNF y evaluamos la viabilidad por la técnica de MTT. El BDNF 20 y 50 ng/ml aumenta la viabilidad de los astrocitos de manera dosis dependiente (p<0.05). Por otro lado, el BDNF no modifica la viabilidad de una línea celular de glioma de rata C6, demostrando que este efecto es específico para cultivos primarios. También evaluamos los mecanismos involucrados en esta acción del BDNF en astrocitos. Para esto incubamos a los astrocitos con inhibidores de distintas vías como de las MAPKs ERK o de la vía PI3K/Akt en presencia de BDNF por 24 h. El efecto estimulador del BDNF (50 ng/ml) sobre la viabilidad de los astrocitos fue bloqueado por inhibidores de ERK (PD98059 10 μ M) y de Akt (0,5 μ M) pero no por un inhibidor de la PKA (Rp-cAMP 50 μ M). Determinamos la activación de ERK y Akt midiendo sus formas fosforiladas (pERK y pAkt) y totales en astrocitos tratados por 30 min con BDNF por la técnica de Western blot. El BDNF indujo un aumento dosis dependiente de los niveles de pERK y pAkt, confirmando la participación de estas proteínas en sus efectos. Por otro lado, determinamos el efecto del BDNF sobre las distintas fases del ciclo celular de los astrocitos. Luego de 24 h, el BDNF (50 ng/ml) indujo un aumento del porcentaje de células en fase S y en fase G2 (Control: S: 2,8%, G2: 41,25%; BDNF S: 4%, G2: 56,2%), lo que sugiere que esta neurotrofina podría inducir la proliferación de los astrocitos. Estos resultados indican que el BDNF podría jugar un rol importante en la supervivencia y/o proliferación de los astrocitos a través de ERK y Akt.

438. (230) COMPARACIÓN DEL MOMENTO Y GRADO DE EXPOSICIÓN DE ZNTE EN RATAS-MADRE EN LAS CONDUCTAS DE EXPLORACIÓN LATERALIZADA DE SUS HIJOS EN EL PERÍODO PREPUBERAL

Ratti S.; Gaglio E.; Álvarez E.

Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza.

Nuestro laboratorio previamente ha presentado evidencias que el elemento "traza" ZnTe administrado crónicamente en dosis bajas a ratas madre, modifica la exploración motivada y ciertas conductas sociales de sus hijos en la etapa prepupal, así como su regulación epigenética. También en reuniones anteriores, se presentaron datos que sugieren que el elemento activo es el Te y no el Zn. El objetivo del presente trabajo fue evaluar cuanto tiempo es necesario en el proceso preñez-parto-lactancia para que el elemento traza pueda afectar los parámetros cognitivos de los hijos. En esta comunicación, se evalúa la etapa de preñez. Para ello, se trabajó con ratas prepupales provenientes de ratas-madre expuestas a 0.3 μ g/L (1.55 nM) de ZnTe disueltos en el agua de beber durante toda la preñez. Ratas que ingieren agua corriente se consideraron control. Se dispuso de 3 grupos: [1] Control (n=20); [2] 0.3 μ g/L de ZnTe crónico (n=12) y [3] 0.3 μ g/L de ZnTe preñez (n=19). Al día 30, los hijos de los tres grupos se testaron en el Laberinto Doble Hole-Board Lateral que mide la duración de la exploración preferencial izquierda/derecha (Izq/Der) en Cuentas/3 min (C/3min). Los resultados mostraron como ya se describió, que las ratas controles tienen exploración preferencial izquierda (60.2 \pm 5 C/3min, Izq, Versus 40 \pm 4 C/3 min, Der, p < 0.05). En el grupo tratado en la preñez con ZnTe, al igual que el tratado crónicamente, la exploración preferencial izquierda quedó anulada (49 \pm 6 C/3min Izq Vs 57 \pm 4 C/3min Der; n.s. y 38 \pm 5 C/3min Izq Vs 33 \pm 7 C/3min Der, n.s.; respectivamente). Otras variables relacionadas con motivación exploratoria, también fueron afectadas de la misma manera. Los resultados sugieren que la exposición al ZnTe en la preñez en la madre es suficiente para afectar el comportamiento de los hijos posteriormente.

439. (278) ESTIMULACIÓN CENTRAL DEL RECEPTOR DE ENDOTELINAS TIPO B. EFECTOS SOBRE PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA EN EL BULBO OLFATORIO DE RATAS DOCA-SAL

Guil M.¹; Soria C.¹; Pane A.¹; Morales V.¹; Catanzariti A.¹; Bianciotti L.²; Vatta M.¹

Cátedra de Fisiología, Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM-CONICET), Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

En trabajos previos demostramos una relación entre el sistema noradrenérgico y endotelinérgico endógeno a nivel de los Bulbos Olfatorios (BO) de ratas hipertensas DOCA-sal mediante la administración aguda vía intracerebroventricular (icv) de un antagonista del receptor de endotelinas (ETs) ETA. Así observamos que el bloqueo de este receptor disminuía tanto la actividad como los niveles totales de la tirosina hidroxilasa (TH) en los BO de ratas hipertensas DOCA-sal. Sobre la base de estos resultados sugerimos la hipótesis que los efectos observados podían deberse a una acción de las ETs endógenas sobre el receptor ETB. Con el objetivo de responder este interrogante se plantea evaluar los efectos de la potenciación de la respuesta ETB mediante la administración aguda vía icv de un agonista específico (IRL-1620). La determinación de los parámetros cardiovasculares (Presión Arterial, Frecuencia Cardíaca) durante la hora de registro post-inyección, demostró que la exposición de los animales al IRL-1620 (50 ng/1 μ l/min) produce una disminución de la Presión a partir de los 20 min post-inyección en animales normotensos, mientras que

en animales DOCA-Sal el mismo efecto se observó a partir de los 50 min y principalmente en expensas de un marcado descenso de la Presión Sistólica. Luego del sacrificio los BO se extrajeron y se determinó las cantidades totales de TH y sus formas fosforiladas (Serina 19, 31 y 40) por western blot. En ratas normotensas, la exposición al agonista no produce modificaciones significativas. Por su parte, en ratas DOCA-sal tratadas con IRL-1620 tanto los niveles de TH total como de sus formas fosforiladas se encuentran marcadamente disminuidos, obteniéndose cantidades significativamente menores que en DOCA-sal con vehículo. Estos resultados avalarían la hipótesis planteada, indicando entonces que los efectos previamente observados por bloqueo ETA podrían mediarse por una potenciación de la respuesta ETB.

440. (294) EFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO HIPO-TÉRMICO OCULAR SOBRE LAS ALTERACIONES RETINIANAS INDUCIDAS POR DIABETES MELLITUS TIPO 2 EXPERIMENTAL

González Fleitas M.; Salido E.; Bordone M.; Chianelli M.; Keller Sarmiento M.; Dorfman; Rosenstein R.
Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET-UBA.

La retinopatía diabética (RD) es la principal causa de ceguera en adultos, en su mayoría afectados por diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Hemos demostrado que una hipotermia ocular breve, aplicada 24 hantes de la isquemia, previene el daño retiniano inducido por isquemia. Considerando que la isquemia es un componente central de la RD, el objetivo de este trabajo fue examinar el efecto de la aplicación semanal de una hipotermia ocular breve (32°C por 20 min) sobre los cambios retinianos observados en un modelo de DM2 desarrollado en nuestro laboratorio. Para ello, ratas *Wistar* macho adultos recibieron una dieta estándar ó 30% de sacarosa en el agua de bebida. Tres semanas después de este tratamiento, los animales se inyectaron con vehículo o estreptozotocina (STZ, 25 mg/kg, i.p.) y 3 días después de la inyección, un ojo de cada animal fue sometido semanalmente a hipotermia ocular (a través del flujo de un gel enfriado a 13°C por 20 min) o procedimiento simulado. Se examinó la glucemia en ayunas y postprandial y el test de tolerancia i.p. a insulina y a una sobrecarga de glucosa. 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 el grupo control. La hipotermia ocular, 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), así como el aumento de la peroxidación lipídica, la actividad de NOS, los niveles de TNF α ($P < 0.05$ vs. diabetes), y el aumento en los niveles de proteína ácida glicofibrilar en células de Müller y del factor de crecimiento vascular endotelial. Los resultados indican que la hipotermia ocular, una maniobra inocua *per se*, protege a la retina de las alteraciones observadas en un modelo experimental de RD asociada a DM2.

441. (327) LA DEPRIVACIÓN PROLONGADA DE HORMONAS OVÁRICAS MODULA LA EXPRESIÓN DE RATINA Y LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL HIPOCAMPO

Zárate S.¹; Ferraris J.¹; Magnani N.³; Gottardo F.¹; Imsen M.¹; Jaita G.¹; Pisera D.¹; Álvarez S.³; Reinés A.²; Selicovich A.¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. De Robertis" (IBCN)-CONICET, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

Las hormonas sexuales ejercen una acción protectora sobre la funcionalidad mitocondrial jugando un papel clave en el man-

tenimiento del metabolismo energético del cerebro. Dado que el sistema nervioso central posee una alta demanda energética y que el hipocampo es una de las áreas más sensibles a la disfunción mitocondrial y al daño oxidativo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la privación prolongada de hormonas sexuales sobre la expresión de ratina, una proteína citoprotectora mitocondrial, y sobre la función mitocondrial en el hipocampo. Para ello, ratas hembras *Wistar* adultas fueron ovariectomizadas (OVX) o sometidas a ovariectomía simulada (SHAM) y luego de 12 semanas determinamos la expresión hipocampal de ratina por inmunofluorescencia y PCR en tiempo real. En animales SHAM, observamos que la ratina está localizada en el soma y en los procesos de los astrocitos, mientras que en animales OVX, dicha localización es casi exclusivamente somática. Mediante PCR en tiempo real observamos una menor expresión de ratina en el hipocampo de ratas OVX con respecto a las SHAM (OVX: 0.26 ± 0.10 , SHAM: 1.0 ± 0.26 UA; $p < 0.05$). Además, evaluamos el consumo de oxígeno por respirometría de alta resolución y la velocidad de producción de ATP por quimioluminiscencia en mitocondrias aisladas de hipocampo de ambos grupos de animales. Las mitocondrias de hipocampo de animales OVX presentaron un menor consumo de oxígeno en estado 3 y una menor velocidad de producción de ATP que los SHAM (OVX: 58 ± 6 ; SHAM: 68 ± 6 ng-at O/min.mg proteína; OVX: 103 ± 9 , SHAM: 139 ± 12 mmol ATP/min.mg proteína; $p < 0.05$). Estos resultados indican que la ovariectomía modifica el patrón y los niveles de expresión de ratina y reduce la velocidad de respiración y de producción de ATP mitocondrial en el hipocampo, sugiriendo que las hormonas ováricas estarían involucradas en la modulación de la expresión de ratina y en el mantenimiento de la función mitocondrial en esta área cerebral.

442. (366) LA EXPOSICIÓN A UNA DIETA ALTA EN GRASA DURANTE EL PERÍODO JUVENIL SE ASOCIA A CAMBIOS METABÓLICOS, COGNITIVOS Y ALTERACIONES EN ESTRUCTURAS LÍMBICAS EN RATONES C57BL/6. POSIBLE RELACIÓN CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?

Vinuesa M.^{1,2}; Pomilio C.^{1,2}; Menafrá M.³; Brites F.³; Crivello M.¹; Lux V.¹; Pava P.^{1,2}; Beauquis J.^{1,2}; Saravia F.^{1,2}
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

La obesidad y la diabetes tipo 2 son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (AD). La resistencia a insulina, las alteraciones en sus vías de señalización y la inflamación juegan un rol crucial en la evolución de la patología. En este trabajo nos propusimos estudiar el efecto de la exposición de ratones C57BL/6 a una dieta rica en grasa (HFD) o estándar (DN) durante 5 meses luego del destete. Los ratones HFD presentaron un significativo sobrepeso, elevada glucemia, hipercolesterolemia, alta concentración de c-HDL ($p < 0.05$) y una mayor acumulación de lípidos en cortes histológicos de hígado teñidos con hematoxilina-eosina. Se evaluó el efecto de la dieta HFD en aspectos conductuales y se encontraron alteraciones en el test de campo abierto, en la construcción de nido y en la memoria espacial, que se estudió mediante el test de reconocimiento de localización novedosa de un objeto, donde los animales DN exploraron una mayor proporción del tiempo al objeto relocalizado, mientras que los HFD exploraron ambos objetos aleatoriamente ($p < 0.05$). Por otra parte, se encontró que los ratones expuestos a HFD poseían menor volumen del hipocampo, estructura principalmente afectada en la AD y un elevado número de núcleos c-Fos+, marcador de activación neuronal, en la amígdala, estructura relacionada a la emocionalidad (121.9 ± 9.544 vs 221.4 ± 31.78 núcleos cFos+/mm² $p < 0.05$). Llamativamente, las alteraciones conductuales y neuronales fueron verificadas en ratones transgénicos PDAPP-J20 (modelo de AD familiar) de la misma edad expuestos a DN. Concluimos que la HFD produce alteraciones metabólicas y cognitivas que se acompañan de cambios morfo-funcionales

en el sistema límbico. El hecho de que los mismos cambios se observen en ratones que modelizan AD hace que el estudio en profundidad de la dinámica e interrelación entre patologías metabólicas y neurodegenerativas sea fundamental para identificar potenciales blancos terapéuticos.

443. (371) LA ADMINISTRACION DE GABAPENTINA DISMINUYE LA GLIOSIS REACTIVA Y LA NEURODEGENERACION EN UN MODELO DE EPILEPSIA DEL LOBULO TEMPORAL

Rossi A.; Villarreal A.; Rajoy J.; Ramos A.

Laboratorio de Neuropatología Molecular, Instituto de Biología Celular y Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El modelo experimental de litio-pilocarpina, reproduce en animales características de la epilepsia del lóbulo temporal. Tras un periodo agudo de status epilepticus (SE), comienza un periodo de latencia, donde se produce daño neuronal acompañado de una intensa reacción glial y reorganización de las conexiones sinápticas lo que constituiría el sustrato del periodo crónico caracterizado por la aparición de descargas epilépticas espontáneas y recurrentes. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta neuronal y glial durante el periodo de latencia, así como la respuesta al tratamiento con el antagonista del receptor de trombospondina $\alpha 2\delta 1$, gabapentina (Gp). Ratas macho wistar recibieron 3mEq/Kg. de cloruro de litio, seguido 20hs después de 30mg/kg de pilocarpina. Alcanzado el SE, las convulsiones fueron detenidas 15 minutos después, con 20mg de diacepam. Los animales recibieron 400mg/Kg. de gabapentina o vehículo durante 4ds y fueron sacrificados a los 7, 15 o 21ds postSE. Durante el periodo de latencia se observó en hipocampo y corteza piriforme una profusa gliosis reactiva con un pico máximo a los 15ds postSE. También se observó reacción de la microglia y degeneración neuronal manifestada por alteración en la inmunomarcación para NeuN. Interesantemente, en la corteza piriforme, las neuronas que mostraron redistribución hacia el citoplasma de NeuN también mostraron inmunomarcación para TLR4, receptor relacionado con las moléculas asociadas al daño celular (DAMP). El tratamiento con Gp fue capaz de disminuir la reacción glial, y la pérdida neuronal pero solo parcialmente logró disminuir la marcación neuronal para TLR4. Subsidios: UBACYT / PIP CONICET1728 / PICT2008-1590

444. (400) MODIFICACIÓN EN LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN MODELOS CELULARES NEURONALES DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAR

Alaimo A.¹; Gorjod R.¹; Uchitel O.²; Kotler M.¹

Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-Oncología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET¹; Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias, (IFIBYNE)-CONICET, Universidad de Buenos Aires².

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa con desenlace fatal que afecta a las motoneuronas. Se clasifica en esporádica y familiar y ambas formas comparten el curso clínico y los eventos patológicos. El 20% de los casos familiares son causados por mutaciones en el gen de la Cu/Zn SOD1. Las mitocondrias son organelas dinámicas y de morfología variable como resultado de un balance entre eventos de fusión y fisión, procesos regulados por un grupo de GTPasas, entre ellas Opa-1, Mfn-1/2 y Drp-1. Nuestro objetivo fue estudiar la morfología mitocondrial y el perfil de expresión de las proteínas que la modulan en dos modelos *in vitro* de ELA familiar. Se transfectoron células NSC-34 (motoneuronas de médula espinal hibridadas con células de neuroblastoma) y Neuro-2a (neuroblastoma) con la forma humana WT ó mutante G93A de SOD1. Los ensayos de viabilidad de MTT y Neutral Red determinaron que la mutante induce un 25 y 35% ($p < 0,05$) de muerte en las NSC-34 y Neuro-2a respectivamente. Mediante tinción con el colorante fluorescente Mitotracker Red se observó que la G93A-SOD1 promueve altera-

ciones en la red de túbulos mitocondriales incrementando su fisión (NSC-34: 56% $p < 0,01$; Neuro-2a: 32% $p < 0,05$). Este fenómeno fue acompañado por cambios en los perfiles de expresión de las proteínas de pro-fusión (Opa-1 y Mfn-2) y pro-fisión (Drp-1) medidos por Western Blot. Dado que ciertos factores ambientales pueden inducir estrés oxidativo (EO) y alterar la conformación y función de la SOD1, se indujo EO con H_2O_2 (250 μ M, 90min) en las células transfectadas. Los parámetros descritos anteriormente se vieron incrementados en las células portadoras de la G93A-SOD1 tratadas con H_2O_2 . Nuestros resultados sugieren que las proteínas moduladoras de la dinámica mitocondrial podrían ser posibles candidatas a biomarcadores en ELA, un avance en el proceso de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad que aún se encuentra pendiente.

445. (430) LAS SEÑALES PURINÉRGICAS REGULAN LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR UNA LESIÓN CITOTÓXICA EN LA RETINA DE ZEBRAFISH ADULTO

Medrano M.¹; Venera G.^{2,1}; Faillace M.¹

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires e Instituto de Química y Fisiocoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR)².

Los peces óseos, a diferencia de los mamíferos, regeneran la retina luego de un daño. Se estudiaron diversos mecanismos implicados en la proliferación y diferenciación celular utilizando este modelo experimental. Las señales purinérgicas -ATP/ADP/UTP extracelular, sus receptores de membrana (P) y las enzimas que catalizan su hidrólisis extracelular- regulan la división, migración y diferenciación celular en el desarrollo embrionario de vertebrado. Los nucleótidos serían liberados al medio extracelular como consecuencia del daño, por ende, se examinó la capacidad regenerativa de las células retinianas de zebrafish (*Danio rerio*), luego de una lesión, en presencia o ausencia de señalización purinérgica endógena. La lesión se realizó por inyecciones intravítreas de Ouabaína 12 μ M, que daña todas las capas retinianas. Luego, se administró Apirasa (enzima que hidroliza nucleótidos), ARL67156 (inhibidor de ecto-ATPasas) o antagonistas de receptores purinérgicos durante 6 días posteriores a la lesión (dpi). Además, se inyectó el antagonista específico de receptores P2Y1 (MRS2179) entre 0-4 o 4-7 dpi. ARL67156 y Apirasa se administraron también entre 4-7 dpi. Se examinó la proliferación celular, el día 7 post-lesión, por incorporación nuclear de BrdU administrada desde el cuarto día. Se determinó la expresión del receptor P2Y1 por WB. Se observó una disminución significativa de la proliferación en presencia de MRS2179 y ARL67156 independientemente del intervalo de administración. Los antagonistas de los receptores P2X1/2/3, P2Y11/12/13, o los de adenosina, no modificaron la proliferación. La Apirasa inyectada desde 1 dpi disminuyó significativamente la proliferación. La lesión indujo la expresión del receptor P2Y1 observada a los 7 dpi. Las señales purinérgicas inducen un incremento de las células proliferativas necesario para la reparación del tejido. A su vez, el daño provoca un aumento de la expresión del receptor P2Y1, que mediaría los efectos de estas señales.

446. (450) REVERSIÓN DE LA DEPENDENCIA A DIAZEPAM Y DE LA EXCITABILIDAD HIPOCAMPAL ASOCIADA POR INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ÓXIDO NITRICO SINTASA

Artur De La Villarmois E.¹; Gabach L.^{1,2}; Pérez M.^{1,2}

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba².

Las Benzodiacepinas son fármacos muy utilizados como hipnóticos, sedantes, anticonvulsivantes y ansiolíticos, aunque su uso crónico produce tolerancia y dependencia. Antecedentes previos demostraron que un fenómeno de aprendizaje asociativo subyace al desarrollo de tolerancia y dependencia a diazepam (DZ) generando una memoria capaz de ser evocada por la pre-

sentación de claves contextuales, donde la excitabilidad neuronal del hipocampo tiene un rol importante. La activación de receptores glutamatérgicos (NMDA) promueve la síntesis de óxido nítrico (NO) por estimulación de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). La inhibición de nNOS atenúa el síndrome de abstinencia a DZ en ratones dependientes, aunque los mecanismos por los cuales el NO participa en el desarrollo de dependencia y las estructuras cerebrales involucradas no fueron explorados. **Objetivos:** Examinar el impacto de la inhibición de nNOS durante el desarrollo de dependencia a DZ y en la plasticidad sináptica hipocampal asociada. **Métodos:** Ratas macho fueron inyectadas con DZ durante 18 días, a partir del día 14 recibieron un inhibidor de nNOS (7-Nitroindazole) antes de la administración de DZ. La dependencia se evaluó 24 horas después de la última administración, midiendo uno de los signos del síndrome de abstinencia a DZ (ansiedad) con el test de "Plus Maze". Luego los animales fueron sacrificados para realizar estudios electrofisiológicos y determinar el nivel de excitabilidad neuronal hipocampal. **Resultados:** La administración del inhibidor de nNOS bloqueó la expresión de la dependencia y revirtió el aumento de la excitabilidad neuronal producida por la dependencia a DZ. **Conclusión:** La formación de NO en las distintas estructuras cerebrales que participan en el desarrollo de dependencia a DZ, como el hipocampo, podrían tener un rol importante en los procesos que la generan. El estudio de las vías activadas por NO podrían representar blancos terapéuticos útiles en el tratamiento de la dependencia a DZ.

447. (479) EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y NEUROTROFINAS EN HIPOCAMPO Y GANGLIO DE RATONES BALB/C.

Simon E¹; Genaro A.^{1,2}; Palumbo M.¹

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; 1 Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

El hipocampo, estructura límbica relacionada con el comportamiento y la memoria, es particularmente sensible a los efectos del estrés crónico. Clásicamente las neurotrofinas y recientemente las citoquinas han sido asociadas a déficit cognitivo. Previamente encontramos que el estrés crónico moderado (CMS) indujo alteraciones en el aprendizaje y la memoria que se correlacionó con el desbalance Th1/Th2. En el presente trabajo investigamos si los linfocitos pueden servir como marcadores periféricos de trastornos cognitivos. A tal fin, se expusieron ratones BALB/c a CMS y se analizó su desempeño en el laberinto de Barnes que evalúa la memoria espacial. Además se determinaron los niveles de ARNm de citoquinas (IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10) y neurotrofinas (BDNF, NT3 y NGF) en hipocampo y ganglio de ratones controles y CMS. En el laberinto de Barnes observamos que los CMS tardan más tiempo en encontrar la caja (blanco) ($p=0,015$) y cometen más errores totales ($p=0,040$) a lo largo de las sesiones con respecto a sus controles. Además los ratones controles pasan la mayor parte del tiempo en el cuadrante blanco a lo largo de las sesiones mientras que los CMS exploran otros cuadrantes antes de encontrar la caja. Por otra parte, en los CMS se encontró una disminución de IFN- γ y aumento de IL-4 tanto en ganglio (IFN- γ : $p=0,028$; IL-4: $p=0,033$) como en hipocampo (IFN- γ : $p=0,028$; IL-4: $p<0,0001$). Sólo se halló un aumento significativo de IL-6 en ganglio ($p=0,004$) sin encontrar cambios en los niveles de IL-1, IL-2 e IL-10 tanto en ganglio como en hipocampo. Asimismo, no se observaron diferencias en los niveles de ARNm de neurotrofinas entre los grupos estudiados. Estos resultados sugieren que en este modelo de estrés crónico el déficit cognitivo se relacionaría con la disminución de IFN- γ y el aumento de IL-4 encontrado tanto en ganglio como en hipocampo y que podrían ser utilizados como potenciales biomarcadores de patologías que cursan con déficit cognitivo.

448. (551) INSULINA INDUCE CAMBIOS A NIVEL TRANSCRIPCIONAL Y POST-TRANSDUCCIONAL EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE GABAA EN CÉLULAS JURKAT
Dionisio L.; Chrestia F.; Bouzat C.; Esandi M.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Baha Blanca (INIBIBB)-CONICET, Bahía Blanca.

Hemos demostrado la presencia de receptores de GABA_A en la línea celular de linfocitos T, Jurkat. Al igual que lo descrito en neuronas, observamos variación en la expresión de subunidades frente a diferentes estímulos, tales como GABA y progesterona. Dado que en neuronas insulina induce cambios en la expresión de receptores GABA_A, evaluamos si este fenómeno también ocurre en linfocitos. Para ello, células Jurkat fueron expuestas a insulina 0,5 μ M durante 15 y 40 h y evaluamos mediante RT-qPCR cambios en la expresión del ARNm de subunidades del receptor. Luego de 15 h de incubación con insulina, se detectó aumento de la subunidad $\beta 3$ y disminución de la subunidad $\alpha 1$. Por otro lado, se evaluó si insulina induce cambios rápidos en la expresión de receptores en membrana. Se expuso a células Jurkat durante 10 minutos a insulina y luego se realizó una tinción por inmunofluorescencia de los receptores de superficie utilizando un anticuerpo contra la subunidad $\beta 3$. Se observó un incremento en membrana de la marca específica para dicha subunidad luego de la incubación con la hormona. Durante este tiempo, los niveles de ARNm de dicha subunidad no fueron alterados, sugiriendo que insulina induce en células Jurkat, al igual que en neuronas, una rápida translocación a membrana de los receptores GABA_A sin afectar la transcripción de genes. Nuestros resultados demuestran dos efectos temporalmente separados de insulina en la expresión de receptores de GABA_A en células Jurkat: uno lento, que consiste en la modificación de la expresión de subunidades a nivel de ARNm; otro rápido, post-traducciona, en el que la subunidad $\beta 3$ sería fosforilada aumentando la translocación de receptores a membrana.

449. (570) LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ESTEROIDE SULFATASA (STS) MODIFICA LA CONDUCTA SEXUAL EN RATAS HEMBRAS

Bazzocchini V.; Casado J.; Giuliani F.; Cabrera R.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), Universidad de Mendoza, IMBECU CCT, Mendoza.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la inhibición irreversible de la enzima esteroide sulfatasa (STS) por Coumate 667 (C), produce una disminución significativa de las concentraciones séricas de LH a las 20 hs en ratas ovariectomizadas (OVX) impregnadas con estrógeno (E) y progesterona (P). Nuestro objetivo fue evaluar si la disminución de LH inducida por C produce modificaciones en la conducta sexual. Se utilizaron ratas hembras adultas Sprague-Dawley OVX impregnadas con E (25 μ g/rata) y P (1 mg/rata) 48 y 5 hs respectivamente antes de comenzar el test ($n=7$), canuladas en 3^o ventrículo (icv) para la administración de C (grupo tratado) o solución fisiológica (grupo control). La dosis de C fue de 1 μ M inyectado 24 hs previas al test de lordosis/monta. Los animales fueron testeados a las 20 hs del día del experimento, horario donde se produce el pico máximo de la concentración de LH en el grupo control o la disminución de la misma en el grupo tratado. Los datos se expresan como la media \pm SEM del coeficiente lordosis/monta y analizados estadísticamente por test de "t" no pareado. La inhibición de STS disminuyó el coeficiente de lordosis/monta significativamente en el grupo tratado ($0,2 \pm 0,09$) con respecto al grupo control ($0,91 \pm 0,07$) $p < 0,001$. Concluimos que la alteración en la concentración de neuroesteroides sulfatados produce modificaciones neuroendócrinas que afectan los patrones reproductivos en la rata hembra.

450. (577) CALCITRIOL BLOQUEA EL EFECTO OXIDANTE DE MENADIONA EN RETINA DE POLLOS

Carpentieri A.; Diaz de Barboza G.; Tolosa de Talamoni N.
Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)- CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

El estrés oxidativo contribuye a la patogénesis de numerosas enfermedades neurodegenerativas del sistema visual. La vitamina K₃ o menadiona (MEN), empleada en el tratamiento de la

osteoporosis o en tratamientos oncológicos, puede desencadenar un efecto oxidante en las células de la retina. En las estructuras oculares se encontraron sustancias antioxidantes como la vitamina D, cuyo rol aún no está dilucidado. En el presente trabajo, nos propusimos estudiar los efectos del tratamiento con MEN sobre las células de la retina *in vivo* e *in vitro* y evaluar el posible rol protector del calcitriol hormona activa de la vitamina D. Para los estudios *in vitro* se purificaron células ganglionares de retina (CGR) de embriones de pollos de 8 días y se cultivaron con el agregado de MEN, calcitriol o la combinación de ambos al medio de cultivo. La valoración de la apoptosis se realizó por la técnica de TUNEL y la expresión de la proteína antiapoptótica calbindina (CB) mediante técnica inmunohistoquímica. En los estudios *in vivo*, se hicieron los mismos tratamientos pero por vía intraocular. Se determinó el glutatión total (GSH) y la actividad superóxido dismutasa (SOD) por espectrofotometría. En las CGR, el número de células TUNEL positivas incrementó 30% con el tratamiento de MEN, en comparación al de las CGR controles. El tratamiento con calcitriol bloqueó el aumento del índice apoptótico producido por MEN. Tanto en los experimentos *in vivo* como *in vitro* el contenido de GSH total disminuyó con el tratamiento de MEN retornando a los valores controles mediante administración de calcitriol. La actividad de SOD incrementó tanto con calcitriol como con el tratamiento combinado. Los resultados sugieren que MEN produce apoptosis de las CGR mediante desencadenamiento de estrés oxidativo como sugiere la disminución del GSH total. El tratamiento con calcitriol ejerce un efecto protector de la retina, posiblemente por un mecanismo antioxidante como lo indica el aumento de la actividad de SOD.

451. (607) PSA-NCAM COMO BLANCO FARMACOLÓGICO EN LOS EFECTOS CONDUCTUALES Y SINÁPTICOS INDUCIDOS POR FLUOXETINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESIÓN

Podestá M.^{1,2,3}; Codagnone M.^{1,2,3}; Saborido M.³; Lorenzo Lopez J.¹; Yam P.⁴; López M.¹; Brusco A.¹; Wikinski S.³; Colman D.³; Reines A.^{1,2,3}

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. de Robertis" (IBCN)-CONICET¹; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-CONICET, Universidad de Buenos Aires³; MNIH, McGill University, Canadá⁴.

Numerosas evidencias indican la existencia de cambios plásticos en el hipocampo de pacientes deprimidos y en modelos experimentales de depresión, aunque se desconoce en qué medida el remodelado sináptico se relaciona con la falla conductual y con el efecto antidepressivo. En este trabajo estudiamos las características de las sinapsis hipocámpales de animales expuestos al modelo de depresión paradigma de desesperanza aprendida que fueron tratados crónicamente con fluoxetina (Flx) y evaluamos su correlación con la conducta de desesperanza (CD). Los animales adquirieron la CD (día 4 post-entrenamiento) en ausencia de cambios ultraestructurales sinápticos. Por el contrario, 25 días después del entrenamiento, se evidenció remodelado estructural concomitantemente con la persistencia de la CD. Mientras la molécula de adhesión celular neural (NCAM) no se modificó a día 4, un descenso se observó a día 25. Su forma polisialilada (PSA-NCAM) se halló disminuida tanto a día 4 como a día 25. Idénticos resultados se obtuvieron en cultivos primarios de neuronas hipocámpales expuestas a glutamato. El tratamiento crónico con Flx entre los días 4 y 25 corrigió la CD, previno las alteraciones sinápticas, exacerbó el descenso de NCAM y aumentó PSA-NCAM. Llamativamente, los niveles de PSA-NCAM persistieron disminuidos en los animales CD resistentes a la Flx. La administración intrahipocámpal de un péptido mimético funcional de PSA indujo una mejoría conductual y previno el remodelado sináptico en los animales CD. Nuestros resultados indican que la aparición de la CD y la reducción de PSA-NCAM anteceden a los cambios sinápticos y al descenso de NCAM; estos últimos representarían entonces cambios adaptativos. Además, nuestros hallazgos sugieren la participación de PSA-NCAM en la mejoría conductual y en la prevención del remodelado sináptico negativo inducidos por la Flx.

De esta manera, PSA-NCAM emerge como un novedoso blanco farmacológico para el tratamiento de esta patología.

452. (623) EFECTO DE DOSIS VARIABLES DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS SOBRE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS EN UN MODELO MURINO

Bianconi S.; Carlini V.; Santillán M.; Stutz G.

Cátedra e Instituto de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Un adecuado aporte dietario de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) durante la gestación y la lactancia puede tener repercusiones en las habilidades psicomotrices del individuo adulto. El cerebro contiene grandes cantidades de ácido docosahexaenóico (de la familia n-3) y su mayor acumulación en el tejido nervioso, así como del ácido araquidónico (de la familia n-6), ocurre durante la etapa perinatal. En el presente estudio exploramos la influencia de diferentes niveles dietarios de estos compuestos, desde la gestación hasta la adultez, sobre la performance de la memoria en ratones *Albino swiss* machos. Se emplearon cuatro tratamientos dietarios en ratones hembra durante gestación- lactancia y en sus crías machos desde destete a adultez: **D** (deficiente en n-3; dieta purificada; 7% aceite de girasol; PUFAs:3,48%; n-3:0%; n-6/n-3:0); **A** (adecuada en n-3; dieta purificada; 7% aceite de soja; PUFAs:3,85%; n-3:0,57%; n-6/n-3:5,7); **E** (excesiva en n-3; dieta purificada; 7% aceite mezcla: hígado de bacalao 60%+soja 40%; PUFAs:3%; n-3:1,25%; n-6/n-3:1,29) y **C** (control; alimento balanceado comercial; PUFAs:1,67%; n-3:0,08%; n-6/n-3:19,88). Se realizó test de reconocimiento de objetos para evaluar memoria no aversiva según Ennaceur y Aggleton. El número de animales que cumplieron con los criterios de inclusión del test para cada dieta, fue: **C**: 10; **D**: 10; **A**: 11; **E**: 10. Los tratamientos suministrados no produjeron diferencias estadísticamente significativas al considerar el tiempo de exploración del objeto nuevo. Sin embargo, se observó un incremento significativo en la actividad locomotora del grupo **E** con respecto a **C**, expresado en un aumento del tiempo total de exploración durante el test (29,37±4,15 vs 16,37±1,99 seg; $p < 0,05$). Estudios adicionales utilizando pruebas que evalúen la conducta locomotora y el estado de ansiedad del animal, así como otras pruebas de memoria aversiva, permitirán elucidar los potenciales efectos del exceso de ácidos grasos poliinsaturados n-3 sobre estos parámetros.

453. (629) EFECTO MODULADOR DE LAS PURINAS ENDÓGENAS EN TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS DESPOLARIZADAS POR POTASIO

Cinalli A.; Guarracino J.; Losavio N.

Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM-CONICET), Buenos Aires.

En trabajos anteriores hemos demostrado que, en sinapsis neuromuscular de mamífero (SNM), el ATP/ADP y su metabolito adenosina modulan la liberación de ACh al activar receptores (R) presinápticos inhibitorios P2Y y R de adenosina inhibitorios A1 y excitatorios A2A, respectivamente. Asimismo, encontramos que la SNM cuenta con R inhibitorios A3 que pueden ser activados por adenosina o por su metabolito inosina. Demostramos que cuando las terminales nerviosas son despolarizadas por alto K^+ , los agonistas de los R P2Y, A1 y A3 fallan en producir su efecto inhibitorio sobre la neurosecreción, mientras que la activación de los R A2A induce facilitación de la liberación asincrónica de ACh. Nuestro objetivo fue investigar si la falta de efecto de los agonistas purinérgicos se debe a los R P2Y, A1 y A3 ya han sido ocupados por las purinas endógenas generadas durante la exposición a alto K^+ . Para ello incubamos preparaciones frénico-diafragma de ratones CF1 con los antagonistas selectivos de los R P2Y (5 μ M reactivo azul), A1 (0.1 μ M DPCPX), A3 (5 μ M MRS-1191) y A2A (50 nM SCH-58261) en 15 y 20 mM de K^+ externo. Encontramos que los antagonistas de los R P2Y, A1 y A3 provocaron un incremento de la liberación asincrónica de ACh en 15 y 20 mM K^+ (reactivo azul 67.7 ± 6.5% y 57.7 ± 6.5%, $p < 0,05$, n: 4; DPCPX 79.1 ± 7.2% y 66.1 ± 3.5%. $p < 0,05$, n: 5; MRS-1191

28.5 ± 4.3% y 30.4 ± 5.3%, p<0.05, n: 4). La incubación con SCH-58261 no mostró una diferencia significativa con respecto a los valores obtenidos sin el antagonista en 15 mM K⁺, mientras que en 20 mM K⁺, SCH-58261 indujo una menor secreción de ACh (31.0 ± 7.2%, p<0.05, n: 3). Los resultados demuestran que en terminales nerviosas de SNM despolarizadas por alto K⁺, el ATP/ADP, adenosina e inosina generados endógenamente inducen inhibición presináptica de la secreción de ACh al activar R P2Y₁ y A₃, respectivamente. Por otro lado, los R A_{2A} requieren mayor concentración de adenosina endógena para ser activados.

454. (688) NEUROPROTECCION POR TETRAHIDROPROGESTERONA (THP) EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD DE MOTONEURONA

Garay L.¹; Gargiulo Monachelli G.¹; Meyer M.¹; Schumacher M.²; Guennoun R.²; De Nicola A.¹; González Deniselle M.¹
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET¹; U788, Inserm, Francia².

Progesterona (PROG) es neuroprotectora en la médula espinal de Wobbler (Wr), modelo murino de la esclerosis lateral amiotrófica, actuando a través de receptores clásicos, de membrana, o por transformación en THP. Objetivo: estudiar el rol de THP en la actividad neuroprotectora de PROG. Para ello, Wr y controles permanecieron libres de tratamiento o recibieron THP x 5 días (4 mg/kg s.c.) ó 30 días (3.3 mg/kg s.c.). Se estudió la expresión del ARNm para BDNF (factor derivado del cerebro), sus receptores TrkB y p75, y el% de células vacuoladas en asta ventral. La hipoeexpresión del ARNm para BDNF en motoneuronas de Wr no fue modificada por THP x 5 días, aunque aumentó en Wr THP x 30 días (granos/100um²=27.38±0.7 vs Wr:19.13±2.2, p<0.05). Se observó una reducción significativa del ARNm para TrkB en Wr vs control (0.05±0.003 vs 0.09±0.003, p<0.001) y regulación positiva en Wr THP x 5 días (Wr THP: 0.09±0.005 vs Wr, p<0.001). Motoneuronas de Wr hiperexpresaron p75 vs controles (p<0.01), mientras que THP x 5 días en Wr redujo significativamente este parámetro (p<0.05). Estos efectos de THP se asociaron a menor% de células vacuoladas en asta ventral (Wr: 28.7±2.7 vs Wr THP: 20.5±0.7, p<0.05). En un experimento, un grupo Wr permaneció sin tratamiento o recibió: finasteride (FIN, pellet 2.5mg s.c.), un inhibidor de 5 alfa reductasa, enzima que transforma PROG en dihidroPROG que luego se metaboliza en THP; PROG (pellet de 20 mg) o FIN+PROG. En comparación a Wr, FIN aumentó significativamente el% de células vacuoladas (Wr FIN: 39.5±2.2 vs Wr, p<0.05) y PROG redujo significativamente este parámetro (p<0.05). FIN+PROG no fue capaz de modular el grado de vacuolización de Wr. El grado de fuerza muscular aumentó significativamente luego de 30 días de THP en Wr (Wr: 1.1±0.15; Wr THP: 2.2±0.4, p<0.05). Conclusión: Los efectos neuroprotectores de PROG podrían estar mediados en parte por su transformación a THP, un esteroide agonista gabaérgico y antagonista glutamatergico.

455. (777) EFECTOS DE FLUOXETINA Y VENLAFAXINA SOBRE LA INGESTA DE ALIMENTOS Y LA EXPRESIÓN DE GENES DEL SISTEMA DE RECOMPENSA EN UN MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN

Poretti M.¹; Bianconi S.¹; Fiol De Cuneo M.²; Carlini V.²
Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina¹, Instituto de Fisiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)- CONICET, Universidad Nacional de Córdoba².

Ha sido demostrado que tanto la depresión como su tratamiento inducen alteraciones en la ingesta de alimentos y el peso corporal. Con el objeto de aportar evidencias sobre los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos del tratamiento crónico con fluoxetina (F) o venlafaxina (V) sobre la ingesta de alimentos y la conducta hedónica, estudiamos en un modelo depresión animal (bulbectomía olfatoria-BOB), la expresión de genes en el hipotálamo relacionados a estos procesos. Ratones machos Albino's Swiss divididos en Sham (libre de BOB) y bulbectomizado (OB) fueron tratados oralmente, durante 28 días con

salina (S), F (10 mg/kg/día) o V (10 mg/kg/día), n=10 animales/grupo, registrándose diariamente la ingesta de alimento y el peso corporal. Los animales fueron sacrificados y su hipotálamo disecado para estudiar la expresión de genes que codifican para dinorfina y los receptor kappa (KOR), mu (MOR) y delta-opioide (DOR). La ingesta de alimento y la ganancia de peso disminuyeron significativamente en los OB (ingesta acumulada OB-S=115.75 ± 3.06 gvs. Sham-S=131.17 ± 2.52 g; p< 0.001). El tratamiento con F o V revierte significativamente este efecto (p< 0.001). La expresión del gen de dinorfina aumentó significativamente en los OB-S en relación a los Sham-S (expresión relativa (AU) OB-S=2.23 ± 0.03 vs. Sham-S=1.21 ± 0.01; p<0.001). Los animales OB tratados con F mostraron una disminución significativa en la expresión de dinorfina en relación a los OB-S (AU OB-F=1.35 ± 0.02 vs. OB-S=2.23 ± 0.03 ζ ; p<0.001). La expresión de KOR y MOR disminuyó significativamente en los OB-F en comparación con OB-V (p< 0.01). Teniendo en cuenta que dinorfina promueve la conducta de ansiedad y disminuye la ingesta, es posible sugerir que el incremento en la expresión de este gen en hipotálamo podría explicar la disminución en la ingesta de alimentos y en la ganancia de peso corporal en los animales OB-S.

456. (811) INDUCCIÓN DE SENESCENCIA EN CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA POR COMPONENTES DEL HUMO DE TABACO

Marazita M.¹; Dugour A.²; Marquioni-Ramella M.¹; Figueroa J.²; Suburo A.¹

Laboratorio de Medicina Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral¹; Fundación Pablo Cassará, Buenos Aires².

La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una de las principales causas de ceguera en todo el mundo. Las lesiones de esta enfermedad incluyen la muerte de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario de la retina (EPR), cuya desaparición es típica de la forma seca o atrofia geográfica. La DMAE tiene un importante componente genético pero también se asocia fuertemente con el consumo de cigarrillos y ciertos factores nutricionales. Potentes oxidantes presentes en el tabaco promueven el daño oxidativo de las macromoléculas celulares. Precisamente, las señales de daño persistente en el ADN pueden inducir la senescencia celular prematura. Postulamos que la inducción de esta forma de senescencia por efecto de componentes del humo de tabaco podría contribuir a explicar la asociación de DMAE con el consumo de cigarrillos. Utilizamos la línea celular de EPR humano ARPE-19 y estudiamos la inducción de senescencia mediante la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (β -Gal-S). Aplicamos un inductor conocido, H₂O₂, y comparamos sus efectos con condensado de humo de cigarrillo (CSC, Murty Pharmaceuticals, Lexington, KY), y metilgloxal (MGO, Sigma-Aldrich). Los estudios se repitieron en presencia del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC, Sigma-Aldrich). El daño por H₂O₂ (150 μ M) demostró que las células ARPE-19 pueden ser inducidas a senescer. Tanto la incubación con CSC (100-150 μ g/ml) como con MGO (1–10 μ M), produjeron un aumento dosis dependiente en el número de células positivas para la actividad de β -Gal-S. En todos los casos, la inclusión de NAC (1 mM) en el medio de cultivo disminuyó la aparición de cambios de tipo senescente. Concluimos que las células ARPE-19 pueden sufrir un proceso de senescencia prematura asociada a estrés oxidativo provocado por CSC o MGO. Un proceso semejante podría afectar al EPR como consecuencia del tabaquismo, contribuyendo al desarrollo de la DMAE.

457. (846) EXPRESIÓN DIMÓRFICA DEL PATRÓN DE INGESTA DE FLUIDOS Y DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA VASOPRESINÉRGICO

Macchione A.; Dadam F.; Dalmasso C.; Vivas L.
Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC)-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba.

Estudios previos de éste y otros laboratorios dan cuenta del dimorfismo sexual existente en los patrones de ingesta de agua y

sodio así como en la actividad neural de áreas cerebrales implicadas en el control del balance hidrosalino, como la lamina terminalis (LT). El objetivo de este trabajo fue analizar comparativamente en machos y en hembras con y sin reposición de estrógeno (Eg) el patrón de ingesta de agua y sodio hipertónico (2% NaCl) y la actividad del sistema vasopresinérgico (AVPérgico) en un modelo de sed hipovolémica inducida por furosemida y dieta baja en sodio (F/DBS). Con este fin se estudió el consumo inducido de agua y sodio y la inmunoreactividad doble Fos/AVP en los núcleos hipotalámicos supraóptico (SON) y paraventricular (subdivisión magnocelular lateral, PaLM). Se utilizaron ratas Wistar adultas machos (M), hembras ciclantes en diestro (D) y en estro (E) y hembras ovariectomizadas con y sin reemplazo de Eg (OVX+Eg, OVX respectivamente). Nuestros resultados muestran que tanto la ingesta de fluidos como la actividad del sistema AVPérgico inducida por el tratamiento F/DBS son respuestas dimórficas. Por un lado, los machos consumieron mayores volúmenes de agua que las hembras (D,E,OVX,OVX+Eg); pudiendo interrelacionarse este consumo con la actividad del sistema AVPérgico, ya que las hembras de todos los grupos experimentales mostraron una mayor activación del sistema AVPérgico en relación a los machos. En lo que respecta a la ingesta de sodio se observó una relación inversa entre los niveles de Eg circulantes y los volúmenes de sodio hipertónico consumidos. En conclusión, el modelo de sed hipovolémica sería un comportamiento sexualmente dimórfico donde los niveles de Eg estarían modulando la respuesta ingestiva tanto de agua como de sodio hipertónico. Asimismo, la actividad dimórfica del sistema AVPérgico agrega evidencia al dimorfismo observado en la LT, modulando en forma secundaria la ingesta de agua. Financiamiento: ANPCyT, CONICET, MinCyT, SECyT.

FARMACOCINÉTICA 2

458. (248) ESTABILIDAD Y DESTINO DEL ANTIPARASITARIO IVERMECTINA DURANTE LA PREPARACIÓN DE CALDO DE HUESO BOVINO

Lifschitz A.¹; Iezzi S.¹; Sanjurjo E.²; Lanusse C.¹

Laboratorio de Farmacología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)- CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires¹; JBS Argentina².

Ivermectina (IVM) es un antiparasitario ampliamente usado en medicina veterinaria y humana. Dado su elevada lipofiliencia, IVM tiene una elevada distribución en el organismo animal. Su uso masivo bovinos puede determinar la presencia de residuos de IVM por encima de lo permitido en diferentes productos de origen animal, generando inconvenientes en procesos industriales de elaboración de alimentos. El objetivo de este trabajo fue conocer el destino de IVM presente durante el proceso de elaboración de caldo de hueso salado bovino. Se estudió la estabilidad química de diferentes concentraciones de IVM (10-1000 ppb) en condiciones de presión (1.5 kg/cm²) y temperatura en autoclave de laboratorio (Fase 1). Luego se evaluó el destino de una concentración conocida de IVM (100 ppb) durante las diferentes etapas de elaboración de caldo de hueso bovino en planta industrial a partir de tanques de 4500 kg (Fase 2). Las muestras obtenidas en ambas fases fueron analizadas por HPLC. Se produjo una significativa reducción en las concentraciones de IVM en las muestras procesadas en autoclave durante 90 minutos (P<0.05), siendo los porcentajes de recuperación promedio de droga respecto a las muestras controles (100%) entre 5.16 y 9.53%. Cuando IVM fue adicionada al inicio del proceso industrial de preparación del caldo de hueso elevadas concentraciones de droga fueron detectadas en las muestras de grasa recuperadas durante el mismo (entre 369 y 569 ppb). Luego del proceso de desgrasado, las concentraciones promedio de IVM fueron significativamente menores en las diferentes etapas de preparación, para terminar con una concentración promedio final de 0.39 ppb en los tanques mixer, que representa un 0.1% del total de IVM adicionada al inicio del proceso. Esta nivel es menor al límite máximo de residuo (10 ppb) establecido para IVM en músculo

bovino, obteniéndose un producto seguro con independencia del potencial contenido residual de ivermectina en el hueso.

459. (295) ELIMINACIÓN DE LA CEFALOTINA EN CONDICIONES QUIRÚRGICAS

Kreil V.; Monfrinotti A.; Prados A.; Tarragona L.; Hallu R.; Rebuerto M.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

La infección en el sitio quirúrgico constituye una de las complicaciones post quirúrgicas que pueden comprometer la situación del paciente. Las cefalosporinas de primera generación son probablemente los antibióticos que se utilizan con mayor frecuencia con este propósito, ya que por su espectro y falta de toxicidad están indicadas en numerosas cirugías. En el presente trabajo se comparó la eliminación de la cefalotina (20 mg/kg), administrada por vía intravenosa a 8 caninos adultos como profilaxis quirúrgica (grupo cirugía) con la eliminación en los mismos animales en condiciones no quirúrgicas (grupo control). En ambas ocasiones se colocaron catéteres en ambas venas cefálicas, se inyectó la droga por la vena derecha y se obtuvieron muestras de sangre de la vena izquierda hasta las 3 h post inyección. Las concentraciones plasmáticas fueron determinadas mediante el método microbiológico. La curva estándar fue validada para las concentraciones 0.391-100 mg/ml. Se calculó la constante de eliminación de cada canino a partir de la regresión lineal de la fase de eliminación de la curva de concentraciones plasmáticas de la cefalotina versus tiempo post administración. Las medias \pm desvío estándar de la constante de eliminación fueron 1.02 \pm 0.06/h (grupo cirugía) y 0.85 \pm 0.2/h (grupo control), no presentando diferencias significativas (test *t* de Student para muestras pareadas, p>0.05). Cuando se comparó cada animal en forma individual (test del paralelismo), las pendientes de 3 animales fueron significativamente menores en el grupo control que en el grupo cirugía. Se concluye que la constante de eliminación de la cefalotina podría modificarse cuando es administrada como profilaxis quirúrgica.

460. (404) VALORACIÓN FARMACOTÉCNICA Y FARMACOCINÉTICA DE NUEVOS COMPRIMIDOS MATRICIALES DE RICOBENDAZOL EN CANINOS

Paredes A.¹; Dib A.³; Eliopulos N.³; Fernández E.³; Lanusse C.²; Allemandi D.¹; Sánchez Bruni S.²; Palma S.¹

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina¹; Laboratorio de Farmacología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)- CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires Tandil, Argentina²; Área Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay³.

Concentraciones plasmáticas elevadas de Ricobendazol (RBZ) durante períodos prolongados efectividad de la farmacoterapia de las parasitosis en caninos. Se planteó como objetivo de este trabajo el desarrollo de comprimidos de liberación prolongada de RBZ (200mg) y su evaluación *in-vivo*. Para ello fueron diseñadas una matriz hidrofílica (MH) y una lipídica (ML). Además se formuló un comprimido control de liberación inmediata (Control). Una vez realizada la caracterización farmacotécnica y biofarmacéutica, se realizó un estudio de cinética comparativa en caninos, para ello se utilizaron tres grupos (n=2) de caninos sanos, libres de endoparásitos, raza cruzada, machos y hembras no gestadas (25.00 \pm 1.87kg). Se determinó la concentración plasmática de Albendazol Sulfóxido (ABZSO) por una técnica de HPLC previamente validada. Los tres lotes de comprimidos presentaron alta uniformidad de peso (Control: 0.5076 \pm 0.0093g, MH: 0.5056 \pm 0.0327g, ML: 0.4989 \pm 0.0102g) y de contenido (Control: 187.55 \pm 8.61mg, MH: 183.81 \pm 2.20mg, ML: 202.49 \pm 6.45mg), además pasaron con éxito los ensayos de friabilidad (<0.5%) y dureza. Los perfiles de disolución fueron acordes en todos los casos, ya que la presencia del

agente formador de matriz en la fórmula siempre se correlacionó con un efecto reservorio ($Q_{2hsControl}$:95%, Q_{2hsMH} :40% y Q_{2hsML} :20%). ML presentó un claro retraso en la aparición de la Concentración Máxima (8.00 ± 0.00 hs), en comparación con los comprimidos Control y MH que presentaron perfiles acordes a una liberación inmediata sin diferencias significativas entre sí, con tiempos máximos cercanos a 4 hs. Los valores elevados de Área Bajo la Curva para Control y MH fueron atribuidos a una absorción masiva de RBZ en períodos tempranos post-administración.

461. (432) INCREMENTO METABÓLICO COMO BASE DE LA RESISTENCIA A ALBENDAZOLE EN FASCIOLA HEPÁTICA

Ceballos L.¹; Canton C.¹; Moreno L.¹; Sanabria R.²; Lanusse C.¹; Álvarez L.¹

Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil¹; CEDIVE, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata².

Fasciola hepatica es un parásito trematodo responsable de la fasciolosis. La principal herramienta para el control de *F. hepatica* es el uso de fármacos fasciolicidas. Sin embargo, su uso frecuente condujo al desarrollo de resistencia. Los mecanismos involucrados en el desarrollo de la misma pueden resultar de cambios en la molécula blanco, en los mecanismos de absorción/eflujo así como en el metabolismo del fármaco. El objetivo del presente estudio fue comparar la capacidad metabólica de cepas de *F. hepatica* susceptibles (INTA) y resistentes (CEDIVE) a albendazole (ABZ), bajo condiciones *ex vivo*. Especímenes adultos de *F. hepatica* (n=5) provenientes de animales artificialmente infectados, fueron incubados (37°C) en presencia de ABZ (5 nmol/mL) durante 45 min. La presencia de metabolitos en el material parasitario se evaluó por HPLC. ABZ droga madre fue la única molécula cuantificada (1.5 ± 0.3 µg/g) en la cepa INTA (susceptible). Sin embargo, en la cepa CEDIVE (resistente a ABZ) se detectaron concentraciones del metabolito albendazole sulfóxido (1.07 ± 0.6 µg/g). De acuerdo a los resultados obtenidos, el incremento metabólico podría ser uno de los mecanismos implicados en la resistencia a ABZ.

462. (509) FARMACOCINÉTICA DE DIGOXINA EN PLASMA Y HUMOR VÍTREO LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRA-VÍTREA EN CONEJOS

Buitrago E.¹; Winter U.²; Laurent V.²; Williams G.²; Asprea M.²; Rodio A.²; Rubinstein M.²; Chantada G.²; Bramuglia G.¹; Schaiquevich P.²

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Hospital de Pediatría "Prof. Juan P. Garrahan", Buenos Aires².

La administración intra-vítrea (AIV) de quimioterapia surgió nuevamente luego de 40 años de los primeros intentos en el tratamiento local del retinoblastoma (Rb). Potencialmente permitiría aumentar la biodisponibilidad ocular del fármaco dirigido contra el tumor en el vítreo y en la retina con mínima exposición sistémica. En la búsqueda de drogas aprobadas y comercializadas para otras patologías pero con actividad antitumoral contra Rb, los cardenolidos demostraron actividad *in vitro* e *in vivo* comparables a drogas tradicionalmente utilizadas como la vincristina y el etoposido. Dado el estrecho margen terapéutico de los cardenolidos, es necesario evaluar la farmacocinética luego de la administración local-ocular y su relación con la exposición sistémica. Así, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la farmacocinética (PK) de la digoxina en sangre y en humor vítreo (HV) luego de su AIV en conejos. Una dosis única de 11 µg de DX se administró por vía intra-vítrea en un ojo de conejos albinos. Se obtuvieron 3 muestras de sangre periférica de cada animal y sólo una muestra de humor vítreo y retina a distintos tiempos. Las muestras de sangre se cuantificaron por enzimoimmunoanálisis de micropartículas (MEIA) y las restantes por HPLC. La exposición de digoxina en HV y plasma fue de AUC (0-48): 33.2 ug*h/ml y 12.6 ng*h/ml, respectivamente. La concentración máxima en la

retina se observó luego de 0.25h post-inyección decayendo a niveles no cuantificables luego de 16 horas. La exposición a digoxina en HV, luego de su AIV, fue aproximadamente 2600 veces la exposición sistémica. Las concentraciones plasmáticas halladas fueron \leq a la concentración inferior del rango terapéutico a todos los tiempos evaluados. La farmacocinética de digoxina luego de su administración intra-vítrea es favorable con potencial traslación a la terapéutica del retinoblastoma.

463. (559) RELEVANCIA DE BCRP EN LA FARMACOCINÉTICA DE ZIDOVUDINA Y SU CONSECUENCIA SOBRE LA GENOTOXICIDAD EN HÍGADO FETAL DE RATA

Minoia J.¹; Filia M.¹; Di Gennaro S.¹; Copello G.²; Díaz L.²; Rubio M.¹; Peroni R.¹

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-CONICET-Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET-Universidad de Buenos Aires².

Se ha demostrado que el inhibidor nucleósido de la transcriptasa reversa del VIH zidovudina (AZT) pero no la lamivudina (3TC) es sustrato del transportador de eflujo BCRP, que restringe el pasaje de xenobioticos al feto. Dado que hemos observado que BCRP se expresa también en hígado fetal, nuestro objetivo es analizar si BCRP modula la acumulación de AZT en este tejido y en consecuencia disminuye su genotoxicidad con respecto a 3TC. Métodos: Se administraron dosis de 60 mg/kg de AZT ó de 30 mg/kg de 3TC p.o. una vez al día durante 10 días a ratas hembra Sprague-Dawley preñadas. El día 21 de preñez, se extrajeron los hígados fetales y se determinó la expresión de la proteína de BCRP mediante Western-Blotting y la genotoxicidad mediante electroforesis en gel de células individuales, las células se estratificaron en una escala de 1 a 5 en orden creciente de daño. Para analizar la distribución de AZT se administró una dosis i.v. 60 mg/kg de AZT en la rata anestesiada en presencia, o no, del inhibidor selectivo de BCRP gefitinib (GFT, 60 mg/kg p.o., 2 h antes) y se extrajeron los fetos a distintos tiempos, se cuantificó la droga por HPLC-UV. Resultados: Un aumento significativo de la expresión de BCRP en hígado fetal se observó en el grupo AZT (p<0,05), sin cambios en el grupo 3TC. Ambos tratamientos causaron daño genotóxico, pero el número de células de clase 5 fue significativamente mayor en el grupo 3TC comparativamente con AZT (p<0,05). Además, la acumulación de AZT en hígado fetal disminuyó significativamente luego del tratamiento crónico con la droga (p<0.05) y este proceso fue revertido en presencia de GFT (p<0.05). Se sugiere que AZT es sustrato de BCRP en hígado fetal de rata y que la exposición crónica a esta droga en la rata preñada genera una sobreexpresión del transportador en el tejido que restringe la acumulación de AZT y esto protegería contra la genotoxicidad de la droga, a diferencia de lo que ocurre con 3TC.

464. (590) RADIOFARMACOCINÉTICA DE LA DISTRIBUCIÓN BIOLÓGICA DEL RADIOFÁRMACO 99mTc-SESTAMIBI

Leonardi N.; Tesan F.; Salgueiro M; Zubillaga M.

Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Objetivo: Evaluar la cinética de captación del ^{99m}Tc-Sestamibi a distintos tiempos para poner a punto una metodología que permita evaluar la distribución biológica del radiofármaco en animales de experimentación. Materiales y métodos: 10 ratas de la cepa Sprague Dawley de entre 200 y 250 g y sometidas a un ayuno previo de 3 horas, luego de las cuales se les restituyó la comida, fueron divididas en 3 grupos acorde con el tiempo de biodistribución (BD) a evaluar, 1 hora (n=3), 2 horas (n=3) y 3 horas (n=4). Una formulación comercial de Sestamibi se marcó con ^{99m}Tc según los lineamientos del prospecto del proveedor. Posteriormente se efectuó el control de calidad según los lineamientos de USP y mediante partición con solvente. Se les administró entre 900 y 950 µCi del radiofármaco por vía endovenosa a cada uno de los animales. Al alcanzarse el tiempo de BD en estudio, los animales fueron sacrificados. Se efectuó la disección de corazón, hígado, intestinos y estómago. Los resultados se expresaron como% de

actividad inyectada (% AI). Resultados: Los resultados obtenidos en la BD no muestran diferencias en la captación del corazón siendo para 1 hora $1.10 \pm 0.11\%$, 2 horas $1.14 \pm 0.10\%$ y 3 horas $1.19 \pm 0.24\%$. Se observa un incremento de la captación intestinal luego de 2 horas de BD (BD 1 hora: $16.71 \pm 2.92\%$ - BD 2 horas: $23.04 \pm 1.46\%$), manteniéndose sin modificaciones a las 3 horas de BD ($24.88 \pm 1.59\%$). Por otra parte, los resultados obtenidos en la BD, muestran una reducción de la captación hepática, siendo $3.30 \pm 0.82\%$, $1.75 \pm 0.11\%$ y $1.39 \pm 0.31\%$, para 1, 2 y 3 horas de BD respectivamente. Conclusión: la cinética de captación del ^{99m}Tc -Sestamibi muestra que a las 2 horas de BD, se observan las mayores diferencias entre el corazón y el hígado e intestinos, lo que precedería la menor interferencia en estudios de imágenes debida a captación tanto hepática como intestinal.

465. (779) OBTENCIÓN DE SUBMUESTRAS OPTIMAS EN UN MODELO PPK: COMPARACIÓN ENTRE DOS SOFTWARE (PFIM Y WINPOPT)

Del Duca S.¹; Vietri S.²

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Facultad de Ciencias Económicas, Universidad de Buenos Aires².

Introducción: En estudios PPK se estima la curva de concentración (cc) de droga en sangre en función del tiempo para hallar los parámetros farmacocinéticos (PF) en la población. Con datos muestrales de cc, se estiman los parámetros en un modelo no lineal de efectos mixtos. En ciertas poblaciones se desea, desde lo ético y económico, usar estrategias que permitan reducir la cantidad de tiempos muestrales a seleccionar. **Hipótesis:** Con los tiempos que surgen luego de aplicar estrategias óptimas, se obtienen estimaciones de los parámetros del modelo, similares a las resultantes con la muestra completa de tiempos. **Objetivo:** Comparar si la cantidad y los tiempos óptimos de muestreo (TOM) coinciden, usando dos software diferentes: PFIM y WinPOPT. **Diseño del estudio:** Se aplicó un modelo abierto de 1 compartimento con absorción de 1er orden, estimando los PF con la muestra disponible, aplicando PFIM y WinPOPT para obtener los TOM. **Metodología:** Se trabajó con cc plasmáticas de Carbamazepina en 12 voluntarios sanos que recibieron un comprimido de 200 mg. Tiempos observados: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 hs. posteriores a la administración de la droga. Con los valores medios de los PF se determinaron los TOM, aplicando D-optimality, basado en la Matriz de Información de Fisher (MIF). El diseño óptimo maximiza el determinante de la MIF, o sea minimiza el det de la matriz de covarianza. Para hallar los TOM se utilizó PFIM y WinPOPT con distintos algoritmos numéricos de optimización. **Resultados:** TOM: PFIM: 1, 4, 6 y 48 hs; WinPOPT: 0,5, 1, 6 y 48 hs. **Conclusiones:** Con ambas estrategias la cantidad de TOM es la misma, aunque WinPOPT prioriza los tiempos iniciales. Ambos procedimientos aseguran que tomando los TOM, no se afecta la precisión de la estimación, siendo ambos aconsejables desde el punto de vista ético y financiero.

FARMACODINAMIA 2

466. (769) EVALUACIÓN FUNCIONAL Y MOLECULAR DEL FENÓMENO DE UP-REGULATION DEL RECEPTOR B₁ A CININAS EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH)

Kilstein Y.; Nowak W.; Errasti A.; Santin-Velazque N; Armesto A.; Rothlin R.

Tercera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Las cininas son péptidos activos involucrados en procesos fisiológicos y fisiopatológicos, principalmente aquellos con un componente inflamatorio relevante. Actúan uniéndose a 2 subtipos de receptores, B₁ y B₂. Mientras que los receptores B₂ se expresan constitutivamente, la presencia de los receptores B₁ no es detectable en condiciones fisiológicas y su síntesis es inducida por diferentes estímulos proinflamatorios. El objetivo del presente trabajo es evaluar funcionalmente la respuesta

contráctil al agonista endógeno del receptor B₁, DAKD, así como la expresión cuantitativa del ARNm del receptor B₁ en VUH en función del tiempo de incubación en condiciones *in vitro*. **Método:** anillos de VUH se incubaron en solución de Krebs a 37°C, pH 7.4, burbujeados con carbógeno. Tras 0h, 2h o 5h de incubación, se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a DAKD. Al final de cada CCR se adicionó 5-HT 10 µM para obtener la respuesta contráctil máxima. A la vez se realizaron ensayos de Real Time PCR utilizando anillos de VUH sin incubación, mientras que otros se incubaron en solución de Krebs a 37°C, pH 7.4, burbujeados con carbógeno, durante 2 o 5 h. **Resultados:** Las respuestas contráctiles a DAKD (E_{max}) se incrementaron en función del tiempo de incubación (E_{max} 0h: 4.28 ± 0.53 g, $59.51 \pm 8.51\%$ de la respuesta a 5-HT, n=3; 2h: 7.73 ± 0.32 g, $79.07 \pm 2.52\%$, n=7 y 5h: 11.79 ± 0.19 g, $85.95 \pm 0.02\%$, n=40; $p < 0.05$ entre todos los tratamientos). En los ensayos moleculares la prolongada incubación *in vitro* produjo un aumento de la cantidad relativa de ARNm (RQ) proporcional al tiempo de incubación, alcanzando su máximo relativo cuando el mismo es de 5 hs (RQ 0h: 1, n=5; RQ 2h: 4.53, n=4; RQ 5h: 14.32, n=5; $p < 0.05$ entre todos los tratamientos). Estos resultados constituyen una sólida evidencia funcional y molecular del fenómeno de *up-regulation* del receptor B₁ en la VUH, dando sustento a la hipótesis de nuestro grupo del año 1997 (Sardi y col., European Journal of Pharmacology, 321,1997, 33-38).

FARMACOGNOSIA 2

467. (26) ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS Y TOXICIDAD CRÓNICA DE FRUTOS Y ARROPE DE MISTOL (ZIZIPHUS MISTOL)

Reynoso M.¹; Belizán M.¹; Salado L.¹; Vera N.²; Daud A.¹
Cátedra de Farmacodinamia, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán¹;
Cátedra de Farmacoquímica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán².

Los frutos y el arrope de mistol son importantes en la dieta de las comunidades del NOA. Se usan en medicina popular para el tratamiento de dolores de garganta, tos, y resfríos. El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva de extractos y arrope (500 y 1000 mg/Kg, vía oral) y determinar la inocuidad del arrope por administración crónica (90 días) a dosis de 1, 2 y 5 g/Kg. Se utilizaron ratas Wistar, empleándose el método de inducción de edema por carragenina para la actividad antiinflamatoria y se indujo el dolor por estímulos químicos (formalina y ácido acético) y térmico para la actividad antinociceptiva. Los resultados mostraron que en el test de la carragenina, las ratas pretratadas con el extracto alcohólico, acuoso y arrope disminuyeron la inflamación, alcanzando el máximo de inhibición (70, 95 y 100% respectivamente) a las 3 horas con la mayor dosis, similar a ibuprofeno (100%). En el test de la formalina, el extracto acuoso (1000 mg/Kg) y la morfina (1 mg/Kg) indujeron un bloqueo del dolor del 62,31 y 68,23% (fase neurogénica), mientras que en la fase inflamatoria el extracto acuoso y el arrope inhibieron el 53 y 54%. En el test de inducción de dolor por calor, el efecto inhibitorio del extracto acuoso y del arrope a 1000 mg/Kg fue 106,80 y 83,56% respectivamente, similar al valor observado con morfina. En la inducción de dolor por ácido acético el extracto acuoso, alcohólico y arrope (1000 mg/Kg) inhibieron entre el 46-56% las contorciones, menor a la actividad encontrada para morfina e ibuprofeno. Por otra parte en los estudios de toxicidad crónica, no se observaron alteraciones en los parámetros bioquímicos y hematológicos analizados a las dosis ensayadas. Los resultados sugieren que los frutos y el arrope de mistol poseen actividad antiinflamatoria y analgésica. Además se demostró la inocuidad del arrope en las dosis comúnmente empleadas en su uso etnomédico.

468. (704) ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PAPAS ANDINAS DEL NOROESTE ARGENTINO EN CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO

Martínez M.¹; Andreu A.¹; Barbini L.²

Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar Del Plata¹; Cátedra de Microbiología Clínica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.²

El hepatocarcinoma es uno de los tipos de cáncer más frecuentes y se asocia a una alta mortalidad. El estudio de compuestos de origen vegetal se basa en su posible utilización como agentes antineoplásicos. Los polifenoles poseen efectos favorables en la salud, distintas actividades biológicas y se encuentran presentes en la papa (*Solanum tuberosum*). Objetivo: Estudiar la actividad citotóxica de extractos de papas andinas sobre células de hepatocarcinoma. Se realizaron extractos metanólicos del tubérculo de la variedad CL658. Se cuantificó el contenido de: ac. fenólicos, antocianinas y flavan-3-oles y se midió la actividad antioxidante. La actividad citotóxica se ensayó en 3 líneas celulares de hepatocarcinoma: HepG2, Hep3B y Huh7, incubadas por 24 hs con distintas concentraciones de los extractos (25-800 µgEq. ac. clorogénico/mL). Se observaron alteraciones morfológicas por microscopía y se midió la viabilidad celular por el ensayo de MTS. Se determinó apoptosis por tinción con bromuro de etidio/naranja de acridina, laddering de DNA y citometría de flujo. Las concentraciones determinadas en los extractos fueron: 9,5±0,2 mgEq. ac. clorogénico/mL de ác. fenólicos; 2,1±0,1 mgEq. cianidin-3-glu/mL de antocianinas; 0,046±0,008 mgEq. catequina/mL y actividad antioxidante 12,3±2,2 mgEq. trolox/mL. En las células tratadas se observaron alteraciones morfológicas típicas de muerte celular, características de la apoptosis, comparadas con los controles sin tratar. Se detectó citotoxicidad en las 3 líneas celulares y las CC50 y CC90 fueron: HepG2 93µg/mL y 351µg/mL; Hep3B 140µg/mL y 364µg/mL; Huh7 137µg/mL y 442µg/mL. Se observaron aumentos en los porcentajes de células muertas (apoptosis temprana y tardía) en la tinción y DNA fragmentado, con respecto a los controles. Conclusiones: Los extractos metanólicos de CL658 presentan actividad citotóxica en hepatocitos tumorales, dependiente de la concentración. La muerte celular se produciría por apoptosis.

FARMACOEPIDEMIOLOGÍA 2

469. (59) LA AUTOMEDICACIÓN EN ESTUDIANTES DE 2° AÑO DE LA CARRERA DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Hartman I.; Dos Santos L.; Rocha M.; Morales S.
Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste.

Introducción: la automedicación puede definirse como la decisión más o menos autónoma de utilizar determinados fármacos sin la intervención directa o inmediata de un médico o profesional de la salud autorizado, no haciendo diferencias entre los medicamentos de venta bajo receta y los de venta libre. **Objetivos:** se trazaron como objetivos: cuantificar la automedicación; identificar los cuadros clínicos que la motivan y reconocer los grupos farmacológicos más frecuentemente utilizados. **Diseño del estudio:** se realizó un estudio descriptivo de corte transversal durante el ciclo lectivo 2012. **Metodología:** fueron incluidos estudiantes de 2° año de la Carrera de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste. Los datos fueron recogidos a través de un cuestionario impreso. Los medicamentos fueron clasificados en monodrogas o asociaciones farmacológicas a dosis fijas y posteriormente codificados de acuerdo al primer nivel de la clasificación Anatómo Terapéutica Química (ATC) de los Medicamentos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). **Resultados:** fueron encuestados 65 estudiantes, de 19 a 23 años, 52.30% de sexo femenino. Del total de los encuestados, 52.80% recurrieron a la automedicación dentro del último año, siendo los cuadros clínicos generadores: cefalea 81.15%; dolor abdominal 49.23%; fiebre 46.15%; dismenorrea 32.30%; síndrome gripal 35.38%; odinofagia 10.76% y en menor porcentaje acidez, mialgias, náusea y vómitos. Fueron utilizadas 9 monofármacos y 4 asociaciones farmacológicas a dosis fijas, correspondiendo al grupo M 74,10%; al R 11.60%; al A 9.82% y al J 4.46% siendo los principios activos más utilizados Ibuprofeno y Paracetamol. **Conclusiones:** En la población

estudiada el porcentaje de automedicación fue elevado, se debió principalmente al padecimiento de dolores de diferentes naturaleza y se utilizó en su mayoría fármacos del grupo M de la clasificación ATC-OMS. Trabajo subsidiado por la SGCYT-Universidad Nacional del Nordeste PI-171068.

470. (284) ERRORES DE MEDICACIÓN (EM) NOTIFICADOS AL CENTRO REGIONAL DE FARMACOVIGILANCIA DE LA UNNE (CRF-UNNE) CORRIENTES- ARGENTINA

Morales S.; Rocha M.; Horna M.; Hartman I.; Dos Santos L.
Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste.

El EM puede causar graves daños al paciente, afecta también al profesional, que se halla bajo la constante amenaza de la industria y el juicio por mala praxis, y teniendo un fuerte impacto negativo en el sistema de salud. **Objetivo:** Determinar la frecuencia de EM de acuerdo a la severidad. Identificar los casos que provocaron daño para el paciente. **Diseño del estudio:** observacional, descriptivo, transversal. **Materiales y Métodos:** Se analizó la base de datos de EM del CRF de la UNNE, entre 1995-2012. Para asignar la severidad se utilizó la Clasificación según severidad del National Coordinating Council for Medication Reporting and Prevention de EEUU. Comprende 8 categorías: **A:** evento capaz de crear error; **B:** Error ocurrido, pero la medicación no llegó al paciente; **C:** Error ocurrido, que llegó al paciente, pero no causó daño; **D:** Error ocurrido, que resultó en la necesidad de aumentar el monitoreo del paciente pero sin daño; **E:** Error ocurrido, que resultó en la necesidad de tratamiento o intervención y causó daño transitorio; **F:** Error ocurrido, que resultó en hospitalización y/o prolongación y causó daño temporal; **G:** Error ocurrido, que resultó en daño permanente; **H:** Error ocurrido, que resultó en un evento cercano a la muerte: anafilaxia, paro cardíaco; **I:** Error que contribuyó o llevó a la muerte. **Resultados:** De un total de 1492 notificaciones de EM de medicación se observó: Categoría A: 103 (6.9%); B: 153 (10.2%); C: 1157 (77.5%); D: 22 (1.4%); E: 40 (2.6%); F: 5 (0.3%); H: 2 (0.1%); I: 4 (0.2%). **Conclusión:** El mayor número de casos correspondió a categorías que llegaron al paciente pero no causaron daño. Si bien las categorías de mayor relevancia de acuerdo a su severidad numéricamente no fueron significativas, se considera que el desenlace fatal tiene un gran impacto ético y social como también las condiciones asociadas que conllevan estos errores para el sistema de salud. Proyecto acreditado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica-UNNE. PI: I-006-2010.

471. (832) ENSAYOS PRECLÍNICOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES VHH PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS GRUPO A

Maffey L.; Vega C.; Garaicoechea L.^{1,2}; Parreo V.^{1,2}
Instituto de Virología, INTA-Castelar¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas².

En Argentina, se reportan anualmente 120.000 casos de diarrea y 150 muertes asociadas a Rotavirus grupo A (RVA) en niños menores de 5 años. Dado que no existe un tratamiento específico para el virus, resulta fundamental desarrollar nuevas estrategias de inmunidad pasiva, como los fármacos basados en anticuerpos recombinantes. Los VHH, anticuerpos recombinantes derivados de IgG de llama, son ideales por su pequeño tamaño, bajo costo y escalabilidad. El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia de dos clones de anticuerpos VHH anti-RVA (3B2 y 2KD1) como tratamiento para esta patología. Se realizó un ensayo con 6 grupos de ratones BALB-c lactantes previamente infectados con RVA murino (RVAM). A cada grupo se le administró un tratamiento oral diario con distintas concentraciones de VHH, durante 4 días. Grupo 1: no tratado, Grupo 2: 2KD1 (100ug), Grupo 3: 3B2 (100ug), Grupo 4: 3B2+2KD1 (100ug c/u), Grupo 5 y Grupo 6: 3B2+2KD1 (80ug c/u). Se evaluó la excreción viral en heces a las 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación (hpi). A las 96 hpi se sacrificaron los ratones de los grupos 1-5 y se midió excreción viral en macerado intestinal por ELISA y UFF y presencia de VHH en suero por ELISA. El 100% de los ratones tratados con VHH fueron negativos para RVAM en macerado intestinal a las 96 hpi

frente a un 16,67% en el control no tratado. Los grupos 2, 3, y 5 presentaron un único pico de excreción viral en heces a las 48 hpi, mientras que los no tratados (Grupo 1) a las 72 y 96 hpi. Los ratones del grupo 4 (2KD1-3B2 100ug) no excretaron virus. Los ratones del grupo 6 fueron sacrificados secuencialmente cada 24 horas y se midieron los mismos parámetros. En este caso, se observó un pico de excreción viral en intestino a las 24 hpi y un pico en heces a las 48 hpi. En ningún grupo se detectó translocación de VHH al suero. Estos resultados muestran la potencialidad de los anticuerpos VHH en el tratamiento de RVA y plantean la necesidad de más estudios preclínicos.

FARMACOLOGÍA MOLECULAR 2

472. (305) ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DE VEGF EN EXPLANTS DE PIE EQUINO INCUBADOS CON VENENO DE BOTHROPS ALTERNATUS

Dubiel C.¹; Stoyanoff T.²; Aguirre M.²; Brandam N.²; Acosta O.¹; Maruak S.¹; Bustillo S.³; Teibler G.¹
Facultad de Ciencias Veterinarias¹; Facultad de Ciencias Médicas²; Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura³, Universidad Nacional del Nordeste.

El factor de crecimiento endotelial (VEGF) tiene diversos roles fisiológicos e interviene en numerosos procesos patológicos. Trabajos anteriores han demostrado la acción de las metaloproteinasas presentes en el veneno con relación a la degradación de los componentes de la membrana basal vascular y pérdida de la expresión inmunohistoquímica del receptor de VEGF (VEGFR-2). Los accidentes ofídicos ocurridos en los equinos, generalmente son producidos en los miembros y comprometen la zona de la corona, lo que favorece la acción directa del veneno sobre las láminas dérmicas-epidérmicas del pie equino. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la expresión de VEGF a nivel de los tejidos que forman la unión dermo - epidérmica del pie equino frente a la acción del veneno de *Bothrops alternatus*. Se utilizaron muestras de tejido dermo-epidérmico (explants) de pie equino, que fueron incubados con medio de cultivo D-MEM para los controles y conteniendo 10 y 100 µg de veneno entero en estufa de cultivo, durante 48 hs. Posteriormente se coloreó mediante técnica de inmunohistoquímica para inmunomarcación de VEGF. Los cortes se analizaron mediante microscopio Zeiss Primo Star, obteniéndose microfotografías mediante cámara Axio Cam ERc 5c en aumento de 40x. Las fotografías fueron analizadas mediante el programa Image pro plus[®] Media Cybernetics, realizándose el conteo de puntos de color en el rango de marrón correspondiente a la inmunomarcación. Los cortes histológicos de los explants pertenecientes al grupo control expresaron inmunomarcación en algunas células basales epidermales, predominantemente nuclear, no mostrando inmunomarcación en la porción dérmica de la unión. Los tejidos incubados con 10 y 100 µg/ml mostraron expresión nuclear y citoplasmática, además, reveló la expresión a nivel de los vasos sanguíneos y células de la matriz extracelular. Cuantitativamente, el análisis reveló que el porcentaje de tejido inmunomarcado fue del 20% en promedio para las muestras control y del 65% para los explants incubados con veneno. La mayor intensidad en marcación se presentó en los explants incubados con 10 µg/ml de veneno. Lo observado permite concluir que el veneno de *B. alternatus* altera la expresión de VEGF a nivel de la unión dermo epidérmica del pie equino.

473. (501) ACTIVATED AMPK IS CRUCIAL TO ACHIEVING RESILIENT HYPOMETABOLIC STATE DURING DORMANCY IN THE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS LARVAL STAGES

Loos J.; Villamonte D.; Cumino A.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar Del Plata.

Molecular pathways which are activated to induce the hypometabolism include stimulation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) in nematodes and insects. The inverse relationship

between TOR and AMPK activity is critical for long term survival when nutrients are limiting. It is unknown in *Echinococcus granulosus* larval stages, causative agent of the human hydatidosis. Previously, we identified and analyzed encoding genes for α , β and γ subunits of Eg-AMPK and carried out transcriptional expression studies of these prototypical subunits in the parasite. Furthermore, we demonstrated that an AMPK agonist, the metformin, reduced the vitality of protoscolexes and metacestodes in a dose-dependent manner; decreased the transcriptional expression level of *pepck*, *g6p* and *mdh*, increased the type II fermentation and induced autophagy, indicating that a prolonged exposure to the drug impairs the energy asset of larval stages. In this work, we showed that metformin effects resulted in a mitochondrial membrane depolarization as shown by JC-1 stain, indicating a raise in the AMP levels and the allosteric activation of AMPK. Also, AMPK was highly activated in control protoscolexes and was confirmed its sensibility to metformin by two-fold increases in the amount of active phosphorylated AMPK (Eg-AMPK α -P^{Thr176}) assessed by immunoblotting. The phosphorylation of Eg-AMPK α implicates upstream kinases, LKB1 and CaMKK, both identified by their conserved structures in the cestode. Additionally, we identified highly conserved C-terminal hydrophobic amino acids that function as a nuclear export sequence (NES) in the AMPK α and its nuclear expression in control protoscolexes by confocal microscopy was verified. Due to the recent description of FoxO proteins as transcriptional regulators targeted by AMPK linked with signaling during hypometabolism states, we identified the only one FoxO ortholog in *E. granulosus* genome in accordance to the occurrence in others invertebrates.

474. (642) PAPEL DE MRP4 EN LA PROLIFERACIÓN Y PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN MODELOS DE ADENOCARCINOMAS DUCTALES PANCREÁTICOS

Carozzo A.¹; Diez F.¹; Shayo C.²; Fernandez N.¹; Davio C.¹
Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Patología Molecular, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET².

Los adenocarcinomas ductales pancreáticos (PDAC) presentan con alta frecuencia una expresión elevada de *Gαs* y de sustratos de PKA fosforilados. Esto sugiere que en este tipo de tumores es frecuente la desregulación de la vía del AMPc, agente involucrado en el crecimiento y la diferenciación celular. En líneas celulares de PDAC (BxPC3, HPAF y PANC1) describimos que la exclusión de AMPc es mediada por MRP4 y observamos una correlación entre el grado de expresión de MRP4 y la malignidad de las mismas. Dada su elevada tasa de mortalidad y a fin de establecer un posible blanco terapéutico, nos propusimos evaluar el efecto de la inhibición de MRP4 sobre la biología tumoral de PDAC. El tratamiento con Probenecid y MK571 (inhibidores inespecíficos de MRPs) condujo a una disminución significativa en la proliferación de las 3 líneas ensayadas. Mediante la evaluación de la viabilidad celular con azul tripán y del ciclo celular por citometría de flujo observamos que esta disminución es consecuencia del arresto en la fase G0/G1 y no producto de un efecto citotóxico de los tratamientos. El silenciamiento específico de MRP4 en PANC1 mediante RNAi produjo una disminución de la proliferación celular del 45±4% a las 72h junto a un aumento del 20±2% de la población en fase G0/G1. Para discriminar si este efecto es consecuencia del incremento en los niveles de AMPci o a la falta de AMPce, tratamos las células con 10µM de AMPc y observamos que dicho tratamiento restaura parcialmente la capacidad proliferativa y el arresto celular producto de la inhibición farmacológica y el silenciamiento de MRP4. Estos resultados sugieren que la exclusión de AMPc al espacio extracelular es crítica para la biología tumoral de PDAC y que este mensajero podría estar actuando en el medio extracelular como un factor autócrino/parácrino estimulando la proliferación. En base a estas observaciones proponemos a MRP4 como potencial blanco terapéutico para tratamiento de PDAC.

475. (654) ESTUDIO DEL MECANISMO DE APOPTOSIS DE UN NUEVO INHIBIDOR DE LA GTPASA RAC1 SOBRE MODELOS DE LEUCEMIA AGUDA HUMANA

Echeverría E.¹; Cabrera M.¹; Lorenzano Menna P.²; Fernández N.¹

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires².

Rac 1 pertenece a la familia de proteínas pequeñas de unión a GTP cuya sobreexpresión y sobreactivación se ha visto asociada a la migración y proliferación de células leucémicas. Estudios previos del laboratorio mostraron al inhibidor de Rac 1, ZINC69391 como un compuesto con actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en modelos de leucemias agudas humanas. El objetivo del presente trabajo es estudiar el mecanismo y las vías involucradas en la inducción de apoptosis promovida por ZINC69391, sobre distintos modelos de células leucémicas. Mediante ensayos de citometría de flujo utilizando la sonda DIOC₆, observamos una pérdida del 35±3% en el potencial de membrana mitocondrial en células U937 tratadas durante 3 h con el inhibidor con respecto al control (p<0,05). Por otro lado, mediante ensayos de western blot observamos un incremento en los niveles de la proteína proapoptótica Bax, siendo máximos entre las 2 y las 6 h de tratamiento dependiendo del sistema, lo que podría estar asociado a los efectos mitocondriales del inhibidor. Consistentemente, el tratamiento con ZINC69391 condujo a un incremento en la actividad de caspasa 9 de 5±1 veces con respecto a las células sin tratar, mientras que no se observa una activación de caspasa 8 aún a las 8 horas de tratamiento. A tiempos posteriores observamos la aparición de caspasa3 y PARP clivados. Estos resultados indican que el inhibidor de Rac1, ZINC69391, promueve muerte celular programada en modelos de leucemias agudas humanas por un mecanismo que depende de la inducción de Bax, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasa 9 sugiriendo la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

476. (673) EFECTO DEL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA (GNT) SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ABC EN CÉLULAS HEPG2. IMPLICANCIA TOXICOLÓGICA

Rigalli J.; Ciriaci N.; Villanueva S.; Mottino A.; Catania V.; Ruiz M.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

Los transportadores apicales P-glicoproteína (P-gp) y la proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2) y el transportador basolateral MRP3 son bombas de eflujo de una amplia gama de endo- y xenobióticos (incluyendo fármacos). Su expresión y actividad es regulable por compuestos dietarios, hormonas, fármacos, etc. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de GNT sobre la expresión de P-gp, MRP2 y MRP3 en la línea celular derivada de hepatoma humano HepG2. Las células se incubaron con GNT (concentraciones asociadas a la ingesta de soja: 0,1; 1 y 10 µM) o vehículo (C, controles) por 48 hs. Los niveles proteicos de los transportadores se evaluaron por *western blotting*. A las concentraciones de 1 y 10 µM se observó un aumento en la expresión proteica de P-gp (200% y 300%) y MRP2 (100% y 200%) respectivamente, en comparación con el control (n=3, p<0,05). GNT no modificó los niveles de MRP3 a ninguna de las concentraciones estudiadas. Luego se evaluó la prevención de la citotoxicidad producida por paraquat (PQ, sustrato de P-gp) y por 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, cuyo metabolito dinitrofenil glutation es sustrato de MRP2) a las concentraciones de GNT que produjeron inducción de P-gp y MRP2. Las células se incubaron con GNT (1 y 10 µM, 48 hs) luego se reemplazó el medio de cultivo por uno conteniendo diferentes concentraciones de PQ (0-2000 µM) o de CDNB (0-100 µM). Se determinó la viabilidad celular por ensayo de MTT. Se calculó la IC₅₀ para cada compuesto. Los resultados (µM; n=3-4, p<0,05) mostraron un aumento de la IC₅₀ para ambos citotóxicos luego del tratamiento

con GNT 1 y 10 µM (C: 84±9, GNT_{1µM}: 112±2, GNT_{10µM}: 130±5, para PQ y C: 24±2, GNT_{1µM}: 29±1, GNT_{10µM}: 37±4, para CDNB). Conclusión: GNT induce la expresión de las proteínas transportadoras apicales P-gp y MRP2, pudiendo ser la causa de una mayor protección de las células frente a citotóxicos sustratos de estas proteínas transportadoras.

FARMACOLOGÍA CLÍNICA 2

477. (30) FARMACOLOGÍA CLÍNICA DE MELAFALAN Y TOPOTECAN LUEGO DE LA INFUSIÓN INTRA-ARTERIAL OFTÁLMICA DE PACIENTES CON RETINOBLASTOMA

Taich P.¹; Buitrago E.¹; Ceciliano A.²; Villasante F.²; Fandio A.¹; Barriga A.¹; Chantada G.¹; Schaiquevich P.¹

Hospital de Pediatría "Prof. Juan P. Garrahan"; Clínica y Maternidad Suizo-Argentina²

La infusión súper-selectiva de quimioterapia intra-arterial oftálmica (IAO) revolucionó el tratamiento de pacientes con retinoblastoma intraocular. Desde el año 2010, nuestro grupo implementó la técnica en Argentina, habiéndose realizado hasta el momento más de 300 infusiones. El melfalan (MEL) es la droga más ampliamente utilizada por esta vía de administración y con actividad sinérgica con topotecan (TPT). Los objetivos del presente estudio fueron: caracterizar la farmacocinética (PK) en plasma de MEL y de TPT luego de la administración IAO; evaluar si la secuencia de infusión afecta la PK de MEL; evaluar los eventos adversos y estudiar la correlación entre la PK y la potencial toxicidad sistémica. El protocolo fue aprobado por el comité de ética institucional y los padres/tutores de los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado. Las muestras plasmáticas de 21 pacientes se cuantificaron por HPLC-fluorescencia. Las drogas MEL y TPT se infundieron IAO en orden indistinto en cada ciclo. Los datos se analizaron por PK poblacional y se compararon con datos históricos propios de pacientes infundidos sólo con MEL. Se evaluó la toxicidad al tratamiento luego de 66 ciclos en 26 pacientes administrados IAO con MEL y TPT. La mediana (rango) de la dosis de MEL fue 0,30 (0,16-0,44) mg/kg. El clearance poblacional (CL, s.e) de MEL y TPT administrados concomitantes fue de 0,44 L/h/kg (0,02) y 0,67 L/h/kg (0,07), respectivamente. El CL de MEL no se afectó por la administración concomitante de TPT ni por la secuencia de administración (p>0,05). La incidencia de neutropenia severa (grado 3/4) fue de 16,7%, similar a la de MEL como única droga (12,1%) reportada previamente. En el estudio demostramos que la secuencia de infusión y la administración concomitante de TPT no afectan la PK sistémica de MEL. La toxicidad de la administración conjunta de MEL y TPT fue manejable y similar a estudios previos de MEL como agente único.

478. (199) PRESCRIPCIÓN EN CASCADA. NUEVOS DESAFÍOS PARA LA FARMACOVIGILANCIA (FVG)

Ponte M.¹; Serra H.²

Hospital General de Agudos "Dr Cosme Argerich"; Cátedra de Farmacología, Medicina, Universidad Católica Argentina²

Prescripción en Cascada (PC) refiere el uso de una droga para tratar una iatrogenia medicamentosa, la cual pudo haberse prevenido si el 1er fármaco se hubiese usado correctamente. El objetivo de este trabajo es proponer un método para evaluar este problema. Se estudió la base de datos del Comité de FVG del Hospital Argerich dependiente de la red de la C.A.B.A. para obtener casos representativos. El trabajo fue autorizado por el Comité de Docencia e Investigación del hospital. El Score para determinar la PC (SPC) fue: Existencia de una droga que generó una Reacción Adversa Medicamentosa (RAM) sea esperada o no conocida: Dudosa: 0, si: +1, si pero mal interpretada: +2. Conducta seguida: Se suprime su administración: 0, se rota por otra droga del mismo grupo: +1, continua con la misma: +2. Uso de una 2da droga para la tratar la RAM: No: 0, si: +2. Resultado global del tratamiento: Mejora: 0, empeora o no cambia: +1, aparece una nueva RAM: +2, esta última se trata con una 3ra droga: +3. Si

SPC >4 se presume PC. La causalidad de la RAM se verificó por el Score de Naranjo (OMS) y su prevención potencial mediante un algoritmo ad hoc. Se describen 9 pacientes de ambos sexos, edad entre 18 y 72 años, con diversas patologías de base y SPC >4. En 7/9 casos (78%) el evento pudo ser prevenible. No hay referencias bibliográficas nacionales o regionales sobre el tóxico PC, por lo que no se pudieron efectuar comparaciones locales respecto de las RAM observadas o de las drogas participantes. Lo hallado difiere de las pocas referencias internacionales en los grupos de drogas involucrados. Se concluye que el tratamiento de una RAM muchas veces se instaura sin un conocimiento farmacológico adecuado. La polimedición derivada es un riesgo sanitario que eleva los costos en salud. Creemos que es absolutamente necesaria la formación continua del profesional de salud en farmacología a fin de evitar estos errores cada vez más comunes.

479. (339) CORRELACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO NAT2 EN UNA POBLACIÓN ARGENTINA

Keller G.; Gómez M.; Fabián L.; Di Girolamo G.
Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires.

Justificación: la tasa de depuración metabólica de la isoniazida puede ser hasta 10 veces más rápida en los acetiladores rápidos respecto de los lentos. La importante heterogeneidad genética conocer el perfil acetilador de la población argentina permitió hacer más racional y seguro el uso de esta droga de primera línea y evitar riesgos de intoxicación o falta de eficacia en los niños. Objetivos: Evaluar la distribución del cociente metabólico molar MR y su logaritmo según la edad de los individuos incluidos. Evaluar los valores de cociente según los dos genotipos establecidos (rápido y lento), y encontrar el punto de corte de metabólico molar MR que discrimine entre genotipo rápido y lento. Metodología: Se determinó el genotipo por técnica de Blum y fenotipo a través de la estratificación del cociente metabólico molar de las concentraciones de acetil-isoniazida/isoniazida medidas por HPLC. Resultados: Se incluyeron 88 niños de entre 4 meses y 14 años. Se encontró genotipo acetilador rápido en el 75% y lento en el 25%. El fenotipo acetilador fue rápido en un 96,59%, intermedio en un 1,14% y lento en un 2,27%. La correlación de Pearson muestra la presencia de una asociación positiva entre edad y cociente MR. A través del empleo de curvas ROC, se estableció el valor de corte para MR que mejor discrimina entre genotipos rápido y lento, estableciéndose dicho valor (cut-off point) en 1.82. Conclusiones: Se encontró una elevada proporción de metabolizadores rápidos a comparación de las extrapolaciones realizadas de otras poblaciones. Se corroboró la presunción de que el fenotipo acetilador madura con la edad, presentando un cambio importante alrededor de los 4 años. No se encontraron situaciones de riesgo de falta de eficacia o toxicidad relacionadas a concentraciones sub o supra-terapéuticas. Se estableció el valor de cut-off de MR en 1.82.

480. (512) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TOBRAMICINA INHALADA EN PACIENTES PORTADORES DE FIBROSIS QUÍSTICA CRÓNICAMENTE INFECTADOS CON PSEUDOMONA AERUGINOSA

Di Girolamo G.¹; Baistrocchi R.²; Castaños C.³
Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina;
Universidad de Buenos Aires¹; Instituto Universitario de Ciencias de La Salud - Fundación H. A. Barceló² Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires³.

Introducción: la fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética de muy baja incidencia. Suele presentar infección respiratoria crónica por pseudomona aeruginosa (PA) cuya prevalencia en el tracto respiratorio aumenta entre 10%-30%, entre los 0 y los 5 años, a más del 80% en mayores de 18 años. La tobramicina inhalada es uno de los tratamientos de sostén actualmente en uso en los pacientes con FQ infectados en forma crónica con PA. El objetivo fue determinar las modificaciones de la función pulmonar y la incidencia de exacerbaciones. Pacientes y métodos: estudio retrospectivo efectuado en historias clínicas del Hospital

de Pediatría "Dr Juan P. Garrahan" de pacientes con FQ tratados alternadamente mensualmente con tobramicina inhalada genérica y lavado desde el inicio del tratamiento durante 6 meses. Se realizaron controles pretratamiento, 30, 90 y 180 días luego de 1, 2 y 3 ciclos de tobramicina. Se evaluaron la CVF; VEF₁ y FEF₂₅₋₇₅ como porcentajes del valor teórico y se establecieron las tasas de variación (Δ) entre los valores a los 6 meses y los basales, considerándose como criterio de mejoría clínica un incremento del 8%. Resultados: se evaluaron 13 pacientes, que presentaron un aumento significativo del peso ($p < 0.004$) y la talla ($P < 0,0001$). La CVF teórica aumentó en $24\% \pm 5\%$ ($P < 0,001$) y de la Δ CVF un 16% ($P < 0,001$) a los 6 meses respecto del basal. El Δ VEF₁ fue del 15% ($P < 0,001$). El Δ FEF₂₅₋₇₅ no alcanzó significación estadística al 6to mes. El promedio de exacerbaciones en los meses previos al inicio del tratamiento fue $2,3 \pm 0,3$ casos, respecto de $1 \pm 0,7$ al finalizar el seguimiento de 6 meses esta diferencia fue significativa ($P = 0,001$). Conclusión: la administración profiláctica de tobramicina inhalatoria genérica mejoró la función pulmonar y redujo el número de exacerbaciones respiratorias en pacientes portadores de FQ.

481. (686) POSIBLE INTERACCIÓN ENTRE TRATAMIENTO CRÓNICO CON ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES Y ANESTESIA CON PROPOFOL EN CANINOS

Montoya L.¹; Monfrinotti A.¹; Rovati O.²; Maldonado F.¹; Albarellos G.¹; Rebuerto M.¹; Tarragona L.^{1,2}
Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias¹; Cátedra de Anestesiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires².

El propofol es un hipnótico utilizado en caninos durante protocolos anestésicos y su empleo en pacientes tratados con regímenes crónicos podría llevar a la presencia de interacciones farmacológicas. El objetivo de este estudio fue evaluar las posibles modificaciones en la anestesia con propofol en caninos tratados por 60 días con firocoxib o meloxicam. Seis caninos mestizos adultos fueron anestesiados con propofol luego de un tratamiento oral por 60 días con: (A) firocoxib (Previcox, 5 mg/kg) o (B) meloxicam (Meloxivet, 0,1 mg/kg) y C: sin tratamiento previo. El protocolo con propofol incluyó bolo inicial de 4 mg/kg seguido de infusión continua de 0.5 mg/kg/min por 20 minutos. Todos los animales fueron intubados y mantenidos con fluidos a 5 ml/kg. Previo y durante la infusión se monitorearon los parámetros hemodinámicos y neurológicos a partir de la evaluación de los reflejos palpebral, corneal, pupilar, tusígeno, patelar, retirada y anal. Los valores hallados fueron sumados de forma tal de llegar a describir un score total para cada tiempo. Se estudió el tiempo de recuperación (TR) finalizada la infusión, basándose en tiempos de extubación (TE), adopción de decúbito esternal, incorporación de cabeza y capacidad de deambular. Las diferencias para cada variable en los distintos tiempos entre A, B y C fueron analizadas mediante ANOVA para medidas repetidas seguido de un pos-test de Tukey's ($p < 0.05$). El grupo A presentó menor score total, hallándose diferencias estadísticamente significativas con el grupo C. El grupo A presentó mayores tiempos dentro de la recuperación, hallándose diferencias estadísticas para TE. La anestesia con propofol en pacientes tratados previamente con firocoxib, demostró diferencias con respecto a pacientes tratados con meloxicam y sin tratamiento previo. El firocoxib produciría un estado de depresión mayor durante la anestesia y una recuperación más prolongada. Posteriores estudios deberían concretarse para poder explicar tal interacción.

482. (717) PARTICIPACIÓN DEL XAMOTEROL Y DEL ANTI-CUERPO ANTI- β 1 ADRENÉRGICO EN LA PRODUCCIÓN DE NITRITOS EN UN MODELO DE HIPOXIA EN LA AURÍCULA AISLADA DE RATA

Ganzinelli S.^{1,2}; Reina S.^{1,2}; Borda E.^{1,2}
Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)².

El preacondicionamiento cardíaco es un mecanismo protector endógeno que se pone en marcha en los casos de isquemia de

miocardio. Se postula que el rol central de esta medida de emergencia cardíaca estaría dado por la activación de la óxido nítrico sintasa auricular. El objetivo de este trabajo es analizar el papel farmacológico del xamoterol (xam) y del autoanticuerpo anti- β_1 adrenérgico obtenido del suero de pacientes con enfermedad periodontal (anti- β_1 IgGp) en un modelo de hipoxia-reperusión de la aurícula aislada de la rata, como así también, la imagen histopatológica que se produce a nivel del miocardio. Utilizando aurículas aisladas de rata macho de la cepa Wistar adultas, se midió en el tejido y sobrenadante la producción de nitratos (μM) por ensayos de ELISA en presencia y en ausencia de xam y anti- β_1 IgGp en condiciones basales (25 min), en condiciones de hipoxia (50 min) y de reperusión (50 min). Los resultados se detallan en la siguiente tabla:

Tratamiento	Control	Xamoterol	anti - β_1 IgGp
Basal	95 \pm 8	150 \pm 9*	160 \pm 8*
Hipoxia	90 \pm 8	98 \pm 8	95 \pm 8
Reperfusion	300 \pm 29	275 \pm 25	200 \pm 18*

(Valores expresados en μM , media \pm ESM, n=6. *p>0.0001).

La imagen histopatológica muestra características de infarto agudo de miocardio con infiltrado neutrofílico, junto con áreas de necrosis, edema intersticial difuso y miocitos pálidos y la disminución de estrías. Entre los patrones histológicos dominantes se identificaron áreas contiguas de miocardio viable, áreas confluentes de necrosis rodeadas de miocardio viable y edema intersticial difuso. Estos resultados nos permitirían inferir que el óxido nítrico sería un agente participante obligado del precondicionamiento cardíaco en la fase aguda temprana de una isquemia miocárdica.

483. (784) ALTERACIÓN DE LA BIODISTRIBUCIÓN DEL ^{99m}Tc-MDP. A PROPÓSITO DE UN CASO

Portillo M.; Tesan F.; Leonardi N.; Boccio J.; Zubillaga M.; Salgueiro M.

Laboratorio de Radioistopos, Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El ^{99m}Tc-MDP es un radiofármaco habitualmente utilizado en la clínica para el rastreo de patologías óseas de diverso origen. Su farmacocinética depende esencialmente de la tasa de captación ósea, de acuerdo al flujo sanguíneo y a la extracción desde el espacio vascular hacia el hueso, al cual se fija por adsorción química, y de la tasa de eliminación renal. Dentro de los controles de calidad de liberación del producto, se encuentra codificada la biodistribución, a través de la disección de animales. Sin embargo, la migración de esta técnica a la imagenología resultaría de utilidad para el fortalecimiento de los principios de las 3Rs con animales de experimentación. El caso que reportamos es el hallazgo incidental de insuficiencia renal durante un estudio de biodistribución de ^{99m}Tc-MDP mediante cámara gamma. Se encontraron anomalías en la evaluación visual por la toma de imágenes en la cámara gamma. El individuo del grupo control, presentó captación renal de ^{99m}Tc-MDP a 1 h post-administración a expensas del riñón derecho mientras que el riñón izquierdo se hallaba hipocaptante. La posibilidad de identificación mediante la imagenología de verdaderos outliers durante la realización de los protocolos de ensayo de biodistribución respalda la decisión de la eliminación de los datos de un individuo del grupo por no cumplir con los criterios de inclusión. Este resultado no hubiera podido ser analizado en su contexto si solo se hubiera realizado el ensayo de disección para biodistribución. La complementariedad de la imagenología y las técnicas ex vivo queda demostrada para la validación de los datos obtenidos en ambos sentidos.

FARMACOTERAPÉUTICA 2

484. (108) TRATAMIENTO COMBINADO DE MORFINA Y ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 PRODUCE SINERGISMO

ANALGÉSICO CON REDUCCIÓN DE LOS EFECTOS ADVERSOS EN RATAS

Escudero G.; Toledo M.; Maresca N.; Laino C.

Instituto de Biotecnología, CENIT, Universidad Nacional de La Rioja.

Los opiáceos, como la morfina, han desarrollado un papel fundamental en el alivio del dolor tanto en la medicina antigua como en la moderna. Sin embargo, su uso clínico puede estar limitado por los efectos secundarios no deseados tales como la tolerancia del efecto analgésico, disminución de peso y constipación. Recientes evidencias han demostrado que algunos ácidos grasos omega-3 (AG ω -3) pueden reducir el dolor. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto analgésico, la variación de peso y la constipación que produce morfina en tratamientos combinados con los AG ω -3 en ratas. Los animales fueron tratados por 16 días con AG ω -3 y/o con morfina en tratamiento agudo y crónico por 4 días, utilizando la Prueba de la Placa Caliente para evaluar el efecto analgésico. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento crónico con los AG-3, aumentó significativamente la latencia de la respuesta analgésica en comparación con el grupo control. Morfina agudo después del tratamiento con AG ω -3 produjo un efecto sinérgico analgésico, mayor que los tratamientos individuales. Además, el tratamiento combinado de morfina crónica con AG ω -3, disminuyó el desarrollo de tolerancia del efecto analgésico, y también la pérdida de peso y la constipación que produce morfina. Nuestros resultados sugieren que el efecto analgésico aditivo del tratamiento combinado de morfina y AG ω -3, la disminución de la tolerancia y de los efectos adversos de este opioide por este cotratamiento, podrían representar una nueva estrategia de tratamiento del dolor severo agudo y crónico para reducir la aparición de los efectos adversos que se desarrollan con el uso de morfina.

485. (143) VALIDACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE INCONTINENCIA URINARIA PARA EL ESTUDIO TERAPÉUTICO CON FÁRMACOS CONVENCIONALES Y CON IMPLANTE DE MIOBLASTOS

Sappia D.¹; Raffo G.²; Lavigne L.³; Piaggio L.⁴

Departamento de Clínica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires¹; Servicio de Urología Sanatorio Tandil²; Fundación Craveri SAIC³; Departamento de Cirugía, Universidad Nacional del Sur de Bahía Blanca⁴.

Es bien conocida la alta incidencia de la incontinencia de orina de esfuerzo (IOE), así como la inmensa gama de tratamientos con resultados poco satisfactorios. El objetivo de nuestro trabajo es crear un modelo animal confiable y reproducible de incontinencia de orina, que permita evaluar la eficacia de diferentes fármacos e inclusive el tratamiento con mioblastos (células musculares derivadas de células madre). Estudio 1: 11 conejos fueron sometidos a 34 determinaciones urodinámicas (UD) para conocer las presiones de micción fisiológicas. Estudio 2: 7 conejos fueron utilizados para evaluar el Punto de Presión de Pérdida (LPP) mediante compresión abdominal, a los fines de reproducir el mecanismo de IOE. Dos conejos fueron utilizados como control para próximas evaluaciones UD. A los 5 restantes se los sometió a una esfinterotomía endoscópica. Los 5 conejos esfinterotomizados fueron reevaluados urodinámicamente, 2 animales a las 3 semanas, 2 animales a las 6 semanas y el restante a las 10 semanas. Luego de la UD se realizó la evaluación histológica de la región operada. En los animales del Estudio 1 los volúmenes de llenado se ubicaron entre los 10 y 30 mL. de fisiológico. En el Estudio 2, los 2 conejos control (no sometidos a esfinterotomía) evaluados con UD demostraron LPP estable con valores promedio de 19.25 cm y 24.5 cm de agua que coincide con la evaluación preesfinterotomía de los 5 conejos restantes. Las determinaciones de LPP realizadas a las 3 semanas de esfinterotomizados mostraron valores entre 7.25 y 12.3 cm de agua, a las 6 semanas 4.60 y 11 cm de agua y a las 10 semanas se obtuvieron valores entre 7.3 y 15.2 cm de agua, mostrando en forma global una reducción aproximada del 50% del punto de presión de pérdida. Conclusión. La creación de un

modelo animal mediante la esfinterotomía endoscópica en conejos, resultó en una metodología confiable y reproducible para el estudio de la IOE, y para la evaluación de tratamientos para a corregirla.

486. (380) DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA COMO SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE FARMACOS PARA SU USO POTENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE GLAUCOMA

Boiero C.^{1,2}; Tartara I.^{1,2}; Allemanni D.^{1,2}; Llabot J.^{1,2}

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba¹.

La aplicación tópica sobre la superficie del ojo es una ruta común de administración de medicamentos, sin embargo la fisiología del ojo en sí hace que sea difícil de lograr concentraciones eficaces de fármaco durante períodos de tiempo prolongados. Es por esto que el desarrollo de nuevos Sistemas Portadores de Fármacos Oftálmicos (SPFOs) que puedan superar estas barreras supone un gran avance en la terapéutica oftálmica. Los sistemas nanométricos (NPs) han surgido como vehículos adecuados para la administración oftálmica de fármacos ya que en muchos casos se ha observado un aumento significativo de la biodisponibilidad del mismo. Son numerosas las sustancias (polímeros sintéticos o naturales) que pueden ser utilizadas como materia prima para la preparación de Nps. En este trabajo en particular se utilizó Albumina Sérica Humana (HSA) para la obtención de NPs para la administración tópica de Maleato de Timolol (TM) para el tratamiento de glaucoma. Las NPs fueron obtenidas por el método de desolvatación (simple y escalable) y caracterizadas en cuanto a tamaño de partícula, índice de polidispersidad (light scattering), potencial zeta, rendimiento del proceso de fabricación (gravimetría, HPLC y UV), eficacia de encapsulación (HPLC) y eficacia *in vivo* (disminución de presión intraocular, PIO, en conejos normotensos). Los sistemas formulados (NPs) presentan un tamaño (226,57±18,04) e índice de polidispersidad adecuados (0.158±0.05) con potencial zeta positivo (+16.05±1.65) y estables en cuanto a variación de tamaño. Se pudo observar que el rendimiento del proceso es de aproximadamente un 90% y la eficacia de encapsulación de TM de 30%. Estudios en conejos mostraron una disminución del 25% de la PIO durante las primeras dos horas con una tendencia que se mantiene luego de 8hs. Si bien los resultados obtenidos son preliminares, indican que las NPs de HSA obtenidas son candidatos promisorios para la administración tópica de TM para el tratamiento de glaucoma.

487. (634) ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DE ALBENDAZOLE Y TIMOL SOBRE PROTOESCÓLICES Y QUISTES DE ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Albani C.^{1,2}; Elissondo M.^{1,2}

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad Nacional de Mar del Plata¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina².

El estadio larval del parásito *Echinococcus multilocularis* es el agente causal de la equinococosis alveolar (EA), la cual se considera como la enfermedad causada por helmintos más letal para el hombre. La EA se caracteriza por tener un crecimiento infiltrante tipo tumoral que afecta mayormente al hígado de los hospedadores intermedios. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto *in vitro* del albendazole y del timol solos o combinados sobre protoescólices y quistes de *E. multilocularis* y comparar su efectividad de acuerdo al tiempo de exposición y concentraciones usadas. Los protoescólices y/o quistes fueron tratados con 1 µg/ml o 10 µg/ml de albendazole o timol solos o combinados. En el caso de los protoescólices se evaluó la vitalidad cada 6 días. Los cambios se registraron periódicamente utilizando microscopía óptica y de barrido. El mayor efecto escolicida fue obtenido con la combinación albendazole 10 µg/ml + timol 10 µg/ml, tanto para protoescólices como para quistes. Al día 6 post-inoculación se observó: (a) en protoescólices una reducción en la vitalidad del

15% acompañada por alteraciones del tegumento (vesiculización, desorganización rostral y pérdida de microtriquias) y contracción del soma; y (b) en quistes el desprendimiento de la capa germinativa y una disminución en el número de células. La combinación de albendazole y timol mostró una eficacia superior en comparación con las drogas por separado tanto sobre protoescólices como quistes de *E. multilocularis*. En trabajos posteriores se estudiará la eficacia de la combinación de fármacos sobre un modelo animal para evaluar su potencial aplicación para el tratamiento de la EA en humanos.

488. (737) EFECTO IN VITRO DE 5- FLUOROURACILO Y PACLITAXEL SOBRE QUISTES DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Pensel P.^{1,2}; Ullio Gamboa G.³; Benoit J-P.⁴; Elissondo C.^{1,2}

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; Laboratorio de Farmacotecnia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. UNP³; Inserm U1066. Ingenierie De La Vectorisation Particulaire. Immeuble Ibt. Angers. France⁴.

El único fármaco aprobado para la quimioterapia de la hidatidosis humana es el albendazole cuya eficacia no supera el 50%. Debido a las dificultades para lograr el éxito del tratamiento se ha visto la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. El crecimiento del quiste hidatídico en el hospedador intermedio presenta características similares al de los tumores tales como la proliferación y expansión ilimitada. Por otro lado, 5-fluorouracilo (5-FU) y paclitaxel (PTX) son fármacos ampliamente utilizados en terapias anticancerígenas. En trabajos previos se determinó la eficacia *in vitro* de 5-FU y PTX sobre protoescólices de *Echinococcus granulosus*. 5-FU mostró mayor eficacia protoescolicida que PTX. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de 5-FU y PTX sobre quistes de *E. granulosus*. Quistes obtenidos de ratones CF1, fueron incubados *in vitro* con 5-FU (10 y 5 µg/ml) y PTX (25 y 10 µg/ml). Los quistes fueron observados diariamente con toma de muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB) y transmisión (MET). Como criterio de daño se consideró, la pérdida de turgencia y el colapso de la capa germinativa. El tiempo de aparición de las alteraciones producidas por PTX 25 y 10 µg/ml fue similar al observado con 5-FU 10 y 5 µg/ml, respectivamente. Los estudios ultraestructurales revelaron la presencia de alteraciones en la capa germinativa de quistes tratados. Sin embargo, 5-FU produjo mayor extensión de daño en la capa germinativa que PTX. Debido a los resultados obtenidos con 5-FU sobre protoescólices y quistes, en futuros trabajos se estudiará la eficacia *in vivo* de la droga sobre un modelo murino.

489. (809) OPTIMIZACIÓN DE LA FARMACOTERAPIA DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR CON EL ANTITUMORAL DOXORRUBICINA EMPLEANDO COPOLÍMEROS DE POLI(ÓXIDO DE ETILENO) Y POLI(ÓXIDO DE PROPILENO); ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS

Cuestas M.¹; Castronuovo C.¹; Gentile E.¹; Gómez N.²; Castillo A.¹; Delfino C.¹; Davio C.²; Oubia J.¹; Mathet V.¹ IMPAM, UBA-CONICET¹; Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Introducción. La capacidad de las células tumorales de adquirir resistencia a antineoplásicos está frecuentemente mediada por la sobreexpresión de proteínas de la superfamilia ABC que son bombas transmembrana activas implicadas en la extrusión de diversas drogas. BCRP es un miembro de la subfamilia ABCG cuya sobreexpresión está asociada a la resistencia a múltiples fármacos como el antitumoral doxorubicina (DOXO). Una de las estrategias para mejorar la eficacia de la terapia antineoplásica es la formulación de fármacos donde el compuesto activo esté acompañado de copolímeros de PEO-PPO, debido a su potencial

rol como agentes que revierten la resistencia a múltiples drogas. **Objetivo.** Estudiar el efecto de diferentes copolímeros de PEO-PPO sobre los niveles de expresión de BCRP en dos líneas celulares de hepatoma humano. **Diseño del Estudio.** Las líneas celulares PLC/PRF/5 y SKHep1 se incubaron con los copolímeros T904, T304, T1107 y F127 a diversas concentraciones (1- 0,01%). Al cabo de 24 y 72 h, se evaluó el efecto de dichos copolímeros: (i) sobre la expresión de BCRP por *Western Blot* y qPCR; (ii) sobre la capacidad de inducir apoptosis y de afectar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante citometría de flujo; y (iii) sobre la capacidad de los mismos de revertir la resistencia a DOXO. **Resultados.** En ambas líneas celulares la mayoría de los copolímeros ensayados aumentó la acumulación intracelular de DOXO y redujo la expresión de BCRP. También se observó que dichos copolímeros afectan el $\Delta\Psi_m$ y presentan efectos proapoptóticos, sugiriendo un posible rol sinérgico con el antitumoral DOXO. **Conclusiones.** Los copolímeros estudiados contribuyen a la quimiosensibilización de líneas celulares de estirpe hepatocitaria provenientes de hepatoma humano, mediante la disminución en la expresión de BCRP y la disminución de la síntesis del ATP necesario para la actividad funcional de dicha bomba, como consecuencia del efecto de los polímeros sobre el $\Delta\Psi_m$.

TOXICOLOGÍA 2

490. (23) IMPACTO BIOLÓGICO DE LAS PARTÍCULAS AÉREAS URBANAS DE BUENOS AIRES (UAP-BA) SOBRE EL SISTEMA CARDIORRESPIRATORIO EN ANIMALES ENVEJECIDOS

Orona N.^{1,3}; Tiscornia G.¹; Ferraro S.^{1,3}; Astort F.¹; Tasat D.^{1,2}

Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente, Universidad Nacional de Gral San Martín, ¹; Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²; Comisión de Investigaciones Científicas³.

Datos epidemiológicos muestran asociación entre la exposición al material particulado (MP) aéreo e incrementos en la morbilidad por enfermedades cardiopulmonares. Sin embargo, el MP no afecta de igual manera a toda la población identificándose a los mayores de 65 años, como una de las subpoblaciones de mayor riesgo. En este trabajo se analizó *in vivo*, empleando un modelo experimental de animales envejecidos, la acción de dos partículas ambientales: Partículas Aéreas Urbanas de Buenos Aires (UAP-BA) y ROFA (Residual Oil Fly Ash). Ratonés Balb/c envejecidos (9 meses de edad) se expusieron mediante instilación intranasal a 1 mg/kg de BW de ambos MPs. A distintos tiempos post-instilación (3, 24 y 48 hs) se evaluaron en animales controles y expuestos: 1) el recuento celular total y diferencial en lavado bronqueoalveolar (BAL), 2) la liberación de IL-6 en suero y 3) la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en homogenatos de corazón y pulmón. UAP-BA y ROFA para todos los tiempos ensayados, incrementaron significativamente en el BAL el número de células totales particularmente, el número de polimorfonucleares. Ambos MPs estimularon a las 3 hs la liberación de IL-6 y sólo ROFA mantuvo estos niveles hasta las 24hs (C: 6.28 ± 1.73 vs UAP-BA₃: 78.46 ± 38.41 , ROFA₃: 117.69 ± 28.43 , UAP-BA₂₄: 7.18 ± 2.91 , ROFA₂₄: 71.54 ± 4.44 , UAP-BA₄₈: 13.27 ± 2.44 , ROFA₄₈: 13.07 ± 2.34 pg/ml, $p < 0.01$). La actividad de la SOD en pulmón no se alteró, en cambio en corazón ambos MPs provocaron una disminución de su actividad a las 3 y 24 hs (C: 6.52 ± 0.30 vs. UAP-BA₃: 3.98 ± 1.28 , ROFA₃: 3.79 ± 0.56 , UAP-BA₂₄: 2.82 ± 0.99 , ROFA₂₄: 3.81 ± 0.86 Usod/mg prot, $p < 0.01$). En conclusión, estos resultados muestran que el MP aéreo altera la funcionalidad cardiopulmonar en animales envejecidos, sugiriendo que en megaciudades como Buenos Aires, donde los niveles de MP son altos, la población de adultos mayores podría manifestar alteraciones fisiológicas en el sistema cardiorrespiratorio.

491. (118) EXPRESIÓN ALTERADA DE ENZIMAS CLAVES EN LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA EN EL ÚTERO DE RATAS CON TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO Y EXPUESTAS PERINATALMENTE A BISFENOL A

Vigezzi L.¹; Bosquiazzo V.^{1,2}; Ramos J.^{1,2}; Muñoz-De-Toro M.¹; Luque E.¹

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral².

Previamente demostramos que la exposición perinatal (gestación+lactancia) a Bisfenol A (BPA) alteró la histomorfología y la expresión de moléculas implicadas en la diferenciación funcional uterina en ratas adultas tratadas con estrógenos. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión de enzimas involucradas en mecanismos de control epigenético en el útero de ratas adultas con terapia hormonal de reemplazo con 17 β -estradiol (E2) y que habían sido expuestas perinatalmente a BPA. Ratas preñadas (*Wistar*) fueron expuestas a través del agua de bebida al vehículo (control), BPA0.5 o 50 ug/Kg/día desde el día 9 de gestación hasta el destete. A los 12 meses de edad las crías hembra fueron ovariectomizadas y tratadas vía sc con E2 durante 3 meses. Se diseccionaron los cuernos uterinos y se conservaron a -80°C. Se estudió la expresión del ARNm de las DNA-metiltransferasas (Dnmt) 3a y 3b, de las histona-deacetilasas (Hdac) clase I: Hdac1, 2 y 3, y de la histona metiltransferasa EZH-2 mediante RT-PCR en tiempo real. La expresión de las enzimas estudiadas difirió según la dosis de BPA administrada perinatalmente. En los animales expuestos a BPA50 la expresión de Dnmt3a y 3b aumentó con respecto al control (Dnmt3a: control 1 vs. BPA50 2,32; Dnmt3b: control 1 vs. BPA50 1,76; $p < 0,05$). La expresión de Hdac1 y EZH-2 aumentó en los animales expuestos a BPA0.5 (Hdac1: control 1 vs. BPA0.5 1,4; EZH-2: control 1 vs. BPA0.5 1,46; $p < 0,05$). Los resultados demuestran que el BPA ejerce sus efectos adversos en el útero por diferentes vías de acción, según la dosis de exposición. La expresión alterada de enzimas claves en la regulación epigenética podría afectar la expresión de genes involucrados en la diferenciación funcional del útero, favoreciendo la mayor incidencia de anomalías uterinas observadas en respuesta a una terapia hormonal de reemplazo.

492. (175) IDENTIFICACION DEL HONGO PRODUCTOR DE SWAINSONINA DESDE LAS HOJAS DE LA PLANTA IPOMOEA CARNEA

Pistán M.; Lozina L.; García E.; Rios E.; Teibler G.; Acosta O.; Cholic L.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste.

Ipomoea carnea var *fistulosa* (convolvulacea), es una planta toxica principalmente para los rumiantes, se halla en el nordeste de Argentina. La intoxicación ocasiona una enfermedad de almacenamiento lisosomal que se caracteriza por vacuolización citoplasmática en la mayoría de las células del organismo. Los tóxicos aislados de la planta son swainsonina y varios subtipos de calisteginas. Alteraciones gastrointestinales, del sistema inmune y daños en SNC, son algunos de los síntomas hallados en los animales intoxicados. Swainsonina, contrariamente de lo que sucede con las calisteginas, es producida por un hongo simbiote presente en la planta. El objetivo de este trabajo es identificar el hongo productor de swainsonina desde las hojas de *Ipomoea carnea*. Se recolectaron hojas de la planta I. carnea de la provincia de Corrientes, Argentina; previamente identificada taxonómicamente por IBONE-CONICET. Muestras de la superficie de las hojas fueron tenidas con una proporción 2:1 de una solución constituida por 1% de azul de anilina acuosa y 85% de ácido láctico, durante 1 minuto, luego la hoja fue lavada y se dejó secar. A continuación, se tomó una impronta con una cinta adhesiva transparente y se montó en portaobjetos para su observación mediante MO. Por otra parte, hojas de la planta fueron procesadas para su observación en MET. A la inspección macroscópica, las superficies adaxiales de varias hojas recolectadas revelaron micelios de color blanquecinos en toda su superficie. Confirmamos su presencia mediante MO, en donde se observó una especie de redes formadas por hifas, las cuales se tiñeron de color azul. A través de MET se

pudo observar la morfología de las hifas del micelio conjuntamente con glándulas de secreción y esporas en sus inmediaciones. En concordancia, con Cook et al, 2013; el hongo simbiote de I. carnea procedente de Brasil es un Ascomycete perteneciente al orden Chaetothiriales, por lo que podríamos inferir que se trata del mismo hongo.

493. (240) EFECTO DE LA INTOXICACIÓN AGUDA POR PARACETAMOL (AP) SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS PRINCIPALES TRANSPORTADORES ABC CEREBRALES EN RATONES

Ghanem C.¹; Manautou J.²

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-CONICET¹; Department of Pharmaceutical Sciences, University of Connecticut, USA².

Se han descrito modificaciones de la expresión de los principales transportadores ABC en hígado durante la intoxicación aguda por AP, sin embargo nunca se ha estudiado su efecto sobre los transportadores a nivel de la barrera hematoencefálica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la intoxicación aguda por AP modifica los niveles de expresión de los principales transportadores ABC. **Métodos:** Se usaron ratones C57BL6 machos divididos en 2 grupos. AP: recibieron una dosis única de AP (400mg/Kg, i.p). Control (C): recibieron solo vehículo. A las 24 h se estudió la expresión proteica de Mrp1-Mrp5; Bcrp y P-g en homogenado total de cerebro por Western blot y su RNAm por real time PCR. **Resultados:** La expresión proteica de P-gp; Mrp2 y Mrp4 se incrementó significativamente ($P < 0.05$) en los animales AP; un 195; 293 y 38% más que en C. La expresión de Bcrp; Mrp1 y Mrp5 no se modificó y Mrp3 fue no detectable en ambos grupos. Mientras que la expresión del RNAm para P-gp y Mrp4 se incrementó en el grupo AP con respecto a C (48 y 85% respectivamente; $P < 0.05$), la expresión de Mrp2 disminuyó con respecto a C (60%; $P < 0.05$). Mientras que Bcrp; Mrp1; Mrp3, Mrp5 no mostraron cambios significativos. **Conclusiones:** La intoxicación aguda con paracetamol induce selectivamente la expresión de ciertos transportadores ABC, los resultados de la expresión sus respectivos RNAm indicarían que mientras para algunos la regulación es transcripcional y para otros parece ser post-transcripcional.

494. (344) EL HEXACLOROBENCENO INDUCE SECRECIÓN DE VEGF, MIGRACIÓN Y FORMACIÓN DE TÚBULOS EN LA LÍNEA CELULAR ENDOTELIAL HUMANA HMEC-1

Pontillo C.¹; Español A.²; Chiappini F.¹; Miret N.¹; Cocca C.³; Kleiman D.¹; Sales M.²; Randi A.¹

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado, clasificado como probable carcinógeno humano. Es un compuesto "tipo-dioxina" y un ligando débil del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (RHA), un factor de transcripción con creciente importancia en el desarrollo vascular y tumoral. Demostramos que el HCB promueve la progresión tumoral en cáncer de mama, incrementando el volumen y capacidad metastásica de tumores experimentales en ratones. La angiogénesis es un proceso fundamental en la progresión tumoral. Se demostró que tanto el RHA como la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) regulan la secreción de VEGF en la línea celular endotelial humana HMEC-1. Nuestro objetivo fue estudiar la acción del HCB en: a) proliferación; b) migración; c) tubulogénesis; d) expresión del RHA, COX2, VEGFR2 y secreción de VEGF en HMEC-1. En ensayos de MTT observamos que el tratamiento con HCB por 24 ó 48 h no altera la viabilidad ni la proliferación celular. El HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) aumenta la migración evaluada mediante ensayos de herida a las 18 h (50; 47; 56 y 58%, $p < 0,05$). En ensayos de tubulogénesis la exposición al HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) incrementa la longitud de túbulos

totales formados (80, 80, 100 y 110%, $p < 0,01$) y los puntos de ramificación (82, 80, 108 y 100% $p < 0,01$). Al analizar los niveles proteicos por inmunoblot, demostramos que el tratamiento con el pesticida por 24 h aumenta la expresión del RHA en dosis de 0,05; 0,5 y 5 μM de HCB (100, 125 y 140%, $p < 0,01$); e incrementa la de COX-2 (50%, $p < 0,05$) y la secreción de VEGF (75, 100, 80 y 65%, $p < 0,01$) en todas las dosis ensayadas. A su vez, observamos un aumento en los niveles de VEGFR2 en dosis de 0,5 μM HCB (25%, $p < 0,05$). En conclusión, nuestro trabajo sugiere que el HCB podría favorecer el proceso angiogénico al estimular de forma autócrina (vía VEGF) la migración y formación de túbulos de las células endoteliales. Este efecto podría contribuir a la progresión tumoral promovida por el pesticida en cáncer de mama.

495. (362) ISOENZIMAS DEL COMPLEJO CROTOXINA COMO POTENCIAL INMUNÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE SUERO ANTIOFÍDICO

Fusco L.¹; Huanchuire-Vega S.²; Ponce Soto L.²; Acosta O.¹; Rodríguez J.³; Leiva L.³

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE)¹; Departamento de Bioquímica, Instituto de Biología, Universidad Estadual de Campinas, Sp. Brasil.²; Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. UNNE³.

Trabajos previos demostraron la aplicabilidad de un plan alternativo para la producción de suero anti crotalico basado en la pre-inmunización con fosfolipasa A₂. La PLA₂ es el componente principal de la crotovina, responsable de la letalidad pero que, aislada, es sensiblemente menos tóxica. Su acción se basa en el bloqueo de la transmisión a nivel de la placa neuromuscular, siendo potenciada por un polipéptido, crotapotín. En el presente trabajo se aislaron isoformas de la PLA₂ y crotapotín por cromatografía (RP-HPLC), como así también se secuenciaron las isoformas enzimáticas. A partir de las mismas se evaluó el efecto farmacológico de cada una de las isoformas y su combinación con los diferentes crotapotínes, a fin de hallar la entidad molecular menos tóxica y, por ende, un mejor inmunógeno. A partir de un pool de veneno de *Crotalus durissus terrificus* se se purificaron, en dos pasos cromatográficos, tamiz molecular y fase reversa, 4 isoformas de la PLA₂ (P9a, P9b, P10a, P10b) y 3 del crotapotín (Ct1, Ct2, Ct3). A la vez se secuenciaron las primeras, mediante espectrometría de masa en tándem. Se ensayaron las actividades neurotóxicas en preparados de músculo biventer de pollo de las diferentes isoenzimas y combinaciones de ellas con las isoformas de crotapotín. Las PLA₂ aisladas exhibieron diferente hidrofobicidad, de allí que su elución en la RP-HPLC se resolvió en 4 picos diferenciables, y en sus secuencias primarias, que aunque mínimas (<10%), son responsables de sus diferencias en las propiedades farmacológicas. Así de las 4 isoenzimas aisladas, P9a resultó ser la menos neurotóxica (10% de daño). Por otro lado, la combinación de cualquiera de los crotapotín con cada una de estas, incrementala neurotoxicidad. Los resultados hallados sugieren que la isoforma P9a aislada, al ser menos neurotóxica, se presentaría como un mejor inmunógeno para su empleo en planes alternativos de inmunización, contribuyendo así a un mejor bienestar en el animal productor.

496. (433) CLORPIRIFOS DISMINUYE LA ACTIVIDAD DE CITOCROMO C OXIDASA EN LA LÍNEA CELULAR TROFOBLÁSTICA JEG-3

Rivero Osimani V.^{1,2}; Espinoza M.³; Guiaz N.^{1,3}; Magnarelli G.^{1,2}

IDEPA-CONICET¹; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue²; Facultad de Ciencias del Ambiente y de la Salud, Universidad Nacional del Comahue³.

Las mitocondrias son el sitio primario de generación de energía por lo que representan un blanco probable de contaminantes ambientales, entre los que se incluyen a los plaguicidas. En la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, se aplican números plaguicidas entre los que predominan los insecticidas organofosforados (OF) como clorpirifos (Cp). En nuestro laboratorio, se

demostró que en las mitocondrias de sinciciotrofoblasto de placentas expuestas a OF se incrementa la actividad de los complejos II + III y IV. El objetivo de este estudio fue evaluar si Cp modula la función mitocondrial de la línea celular trofoblástica JEG-3 y si dicha modulación depende de la bioactivación (formación del oxon) de este compuesto. Se cultivaron las células durante 4, 12 y 24 hs, en presencia de Cp 0,1 y 10 μ M, inductor de daño (H_2O_2) y DMSO (control diluyente). Se obtuvieron las mitocondrias, por centrifugación diferencial. Cp 0,1 y 10 μ M, así como H_2O_2 indujeron una disminución significativa de la actividad del complejo IV a las 4 hs respecto el control ($p < 0,05$). Este efecto inhibitorio se pierde a tiempos posteriores de exposición. La bioactivación de Cp en las células se evaluó mediante la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) blanco primario del oxocompuesto. A las 4 hs no se observaron cambios en la actividad de AChE a las concentraciones ensayadas. Sin embargo, a las 12 hs de exposición se encontró inhibida a 10 μ M respecto al control (74%; $p < 0,05$). Mientras que a las 24 hs de incubación todas las concentraciones ensayadas mostraron una disminución significativa en la actividad de AChE ($p < 0,05$). Estos resultados indican que la exposición a Cp a 4 hs y a concentraciones subinhibitorias de AChE induce disfunción de la cadena respiratoria en trofoblastos que resultaría independiente de la bioactivación de Cp. La reversión de este efecto a tiempos mayores sugiere la participación de mecanismos de reparación. Agradecimientos: Subsidios: UNCo, Beca FONCyT, Beca CONICET.

- 497. (520) ANÁLISIS DE BIOCOMPUESTOS ACTIVOS CONTRA LA ARSENICOSIS POR TÉCNICAS DE SR- μ XRF Y EDXRF**
Sotomayor V.¹; Lamela P.¹; Queralt I.²; Pérez R.³; Bongiovanni G.^{1,4};
IDEPA- CONICET, Universidad Nacional del Comahue¹ ICTJA-CSIC, España²; IFEG, CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina³; Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Argentina⁴.

El arsénico (As) inorgánico es un elemento natural clasificado por la EPA (Environmental Protection Agency) como carcinógeno humano, y se encuentra asociado a otras enfermedades como el HACRE (Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico) en Latinoamérica o BFD (Black Foot Disease) en países de Asia. Por su amplia distribución, la ingesta crónica de agua contaminada con As se ha convertido en un problema de salud pública global, con más de 160 millones de personas expuestas. Aunque el mecanismo carcinogénico no ha sido totalmente dilucidado, es aceptado que el estrés oxidativo producido por el As es el principal responsable de su toxicidad. Considerando que no se degrada, se bioacumula y que su remoción es cara y difícil, es fundamental contrarrestar el efecto negativo consecuencia de la ingesta involuntaria. En respuesta a esta problemática, analizamos bioactividad antioxidante en plantas nativas de Argentina a fin de encontrar biocompuestos activos contra los efectos de la arsenicosis. Utilizando un modelo *in vitro* desarrollado por este grupo de investigación se determinó capacidad antioxidante y se seleccionaron extractos de piñones de Pehuén (*Araucaria araucana* (Mol.) K.Koch). La composición elemental de los piñones fue analizada por dos técnicas espectroscópicas de análisis multimedial: micro-Fluorescencia de Rayos-X utilizando radiación de Sincrotrón (SR- μ XRF) y Fluorescencia de Rayos-X por Energía Dispersiva (EDXRF) y los flavonoides por espectroscopía. Los resultados mostraron que la capacidad antioxidante en extractos de piñones de Pehuén, se correlaciona con una alta proporción de flavonas y flavonoles, elementos antioxidantes como el Zn y Cu y oligoelementos como Mg, P, S, K, Ca y Fe. Concluimos que los extractos de piñones poseen actividad farmacológica potencial que seguirá siendo estudiada.

- 498. (528) ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL VANADIO SOBRE EL OVARIO DE RATAS ADULTAS EXPUESTAS PERINATALMENTE AL METAVANADATO DE SODIO (NAVO3)**
Madariaga M.¹; Farr C.¹; Zubillaga E.¹; Cholich V.²
Área Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario¹; Área Toxi-

ología - LATOEX - Facultad Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe².

El vanadio (V) se encuentra en 68 minerales y es utilizado en metalurgia y como agente farmacológico. La principal fuente de exposición al V es la contaminación atmosférica por la quema de combustibles. En ratas gestantes expuestas al V se lo encontró en la placenta y en los fetos, y se demostró que luego es transferido a las crías a través de la leche. Dado que no existen antecedentes suficientes sobre la toxicidad reproductiva del V en ratas hembra, el objetivo fue realizar estudios histológicos y morfométricos, y un análisis de los receptores de estrógeno en los ovarios de ratas expuestas perinatalmente al $NaVO_3$. Ratas vírgenes Wistar de 90 días fueron puestas a preñar. Se dividieron en tres grupos: control (C), control NaCl (N, solución de 5 mg/ml) y tratado (T, solución de 0,2 mg/ml de $NaVO_3$ + 5 mg/ml NaCl). Los grupos N y T se expusieron desde el día gestacional 16 (DG16) hasta el posnatal 23 (DPN23) a través de la bebida. Las crías fueron destetadas, separadas por sexo y las hembras fueron sacrificadas el DPN90, extrayéndose los ovarios y registrando sus pesos. Los ovarios izquierdos fueron fijados, incluidos en parafina, seriados y teñidos con HE para los estudios histológico y morfométrico. Los derechos se utilizaron para estudiar los niveles de expresión del receptor estrogénico β (RE- β) por western blot. No se encontraron diferencias significativas en los pesos absolutos y relativos de los ovarios ni en el número de cuerpos lúteos, folículos primarios y secundarios del grupo T con respecto a los grupos C y N. Tampoco se observaron alteraciones histopatológicas de estos órganos. Sin embargo, se observó un aumento de 5,8 veces en el nivel de expresión de RE- β en el grupo T con respecto a C. De estos resultados se puede concluir que la exposición al $NaVO_3$ no tendría una acción directa sobre los ovarios, pero podría estar alterando el metabolismo de las hormonas ováricas (estradiol) y/o hipofisarias (LH y FSH).

- 499. (572) EL PRE-TRATAMIENTO CON ERITROPOYETINA (EPO) AUMENTA EL DAÑO RENAL INDUCIDO POR CLORURO MERCÚRICO EN RATAS**
Hazelhoff M.¹; Trebucovich M.¹; Chevalier A.²; Torres A.¹
Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, CONICET¹; GHION Laboratorios Químicos SRL, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Mar Del Plata².

Está descrito en distintos modelos de insuficiencia renal aguda que la Epo tiene efecto protector renal debido a su acción antioxidante, antiapoptótica y antiinflamatoria. Los iones mercurícos (Hg^{+2}) ingresan a las células renales principalmente a través del transportador de aniones orgánicos 1 (Oat1). Dentro de las células, el Hg^{+2} induce estrés oxidativo, lipoperoxidación y acumulación de componentes inflamatorios conduciendo a la muerte celular. Se evaluó el efecto de Epo sobre el daño renal inducido por cloruro mercuríco ($HgCl_2$) en ratas Wistar macho adultas. Grupos experimentales ($n=4$ para cada grupo): ratas controles (C), tratadas con Epo 48 h antes (3000 UI/kg p.c. i.p) (Epo); tratadas con $HgCl_2$ 18 h antes (4,0 mg/kg p.c., i.p.) (Hg) y con ambos tratamientos (EpoHg). Se determinaron: nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina plasmática (Crp) por espectrofotometría; niveles de Hg en orina (Hg_o) por espectrometría de absorción atómica con vapor frío y expresión renal de Oat1 por inmunoblotting. Resultados: El pre-tratamiento con Epo elevó la expresión renal de Oat1 (Oat1 (%): C=100 \pm 3, Epo=131 \pm 9^a). BUN (mg/dL): C=21,5 \pm 1,4, Hg=52,3 \pm 9,3^{a,c,d}, Epo=10,3 \pm 0,9^{b,d}, EpoHg=91,7 \pm 3,3^{a,b,c}; Crp (mg/L): C=5,3 \pm 0,3, Hg=14,5 \pm 2,6^{a,c,d}, Epo=5,1 \pm 0,3^{b,d}, EpoHg=33,4 \pm 1,1^{a,b,c}; Hg_o (μ g/mL): Hg=3,9 \pm 0,6, EpoHg=7,3 \pm 0,7^b. $p < 0,05$: (a) vs controles, (b) vs Hg, (c) vs Epo, (d) vs EpoHg. La administración de Epo aumentó el daño renal inducido por $HgCl_2$. Esto podría deberse al incremento en la expresión renal de Oat1 inducida por Epo, lo que provocaría un mayor ingreso de Hg^{+2} a las células renales.

- 500. (586) EFECTO DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 EN LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR IN-**

DUCIDA POR EL PESTICIDA CLORPIRIFOS EN LÍNEAS CELULARES TUMORIGÉNICAS MAMARIASVentura C.¹; Miret N.²; Venturino A.³; Randi A.²; Rivera E.¹; Nuñez M.¹; Cocca C.¹*Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; LIBIQUIMA-IDEPA, Universidad Nacional del Comahue³.*

Hemos demostrado que el pesticida de uso común clorpirifos (CPF) 50 µM inhibe la proliferación e incrementa los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) en las células MCF-7 y MDA-MB-231. Hipótesis: el CPF inhibe la proliferación celular a través de la vía de las MAPKs mediada por estrés oxidativo. Objetivo: analizar el efecto del CPF sobre el sistema redox y su relación con MAPKs. Metodología: Evaluamos proliferación por recuento clonogénico; las ERO y las especies reactivas del nitrógeno (ERN) por citometría de flujo utilizando las sondas DCF-2DA y DAF-2DA; la peroxidación lipídica por cuantificación de TBARS; las actividades de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), Glutación Transferasa (GST) y niveles del glutatión reducido (GSH) por espectrofotometría; y la fosforilación de ERK1/2 por Western Blot. Resultados: Después de 24 h, el CPF 50 µM incrementó los niveles de ERN ($23,0 \pm 4,3\%$, $p < 0,05$) en MDA-MB-231 y las actividades CAT y GST en ambas líneas celulares (CAT: $36,6 \pm 9,2\%$ y $99,0 \pm 10,3\%$ para MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente, $p < 0,05$. GST: $156,9 \pm 40,4\%$ y $32,6 \pm 23,3\%$, para MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente, p : ns); disminuyó la actividad SOD en un $57,1 \pm 13,8\%$ ($p < 0,05$) e incrementó la peroxidación lipídica en las células MCF-7 ($50,4 \pm 9,7\%$, $p < 0,05$). El CPF no modificó los niveles de GSH. A los 15 min el pesticida incrementó la fosforilación de ERK1/2 en ambas líneas ($50,0 \pm 14,1\%$, $p < 0,05$ y $56,9 \pm 4,2\%$, $p < 0,01$ en MCF-7 y MDA-MB-231 respectivamente) junto con un rápido incremento de las ERO ($46,4 \pm 7,6\%$ en MCF-7 y $77,5 \pm 7,8\%$ en MDA-MB-231, $p < 0,05$). La inhibición de la proliferación producida por el CPF a las 24 h revirtió por el agregado exógeno de CAT y por el inhibidor de las MAPK, PD98059. Finalmente, el agregado de CAT a los cultivos revirtió la fosforilación de ERK1/2 inducida por el CPF. Conclusión: el CPF incrementa la generación de ERO y ERN conduciendo a la fosforilación de ERK1/2 y derivando en la inhibición de la proliferación.

501. (721) EMPLEO DE UN MODELO TRANSGÉNICO MURINO (OCT4-GFP) PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE PERTURBADORES ESTROGÉNICOS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES MASCULINASSantamaría C.¹; Pagotto R.²; Porro V.²; Harreguy M.²; Ramírez S.²; Goyeneche L.³; Fernández G.³; Crispo M.³; Abud J.¹; Bolzan B.¹; Luque E.¹; Bollati-Fogolin M.²; Rodríguez H.¹
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina¹; Unidad de Biología Celular²; Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación Animal, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay³.

El testículo es uno de los órganos más afectados por la exposición a perturbadores estrogénicos (PEs) durante su desarrollo, especialmente aquellos con actividad estrogénica (xenoestrógenos). El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar un modelo animal para el estudio de los efectos de estos PEs sobre el desarrollo de células germinales masculinas. En primer lugar, se rederivó una colonia del ratón transgénico Oct4-GFP, que expresa la GFP (*Green Fluorescence Protein*) bajo el promotor Oct4 sólo en la población de células germinales indiferenciadas, permitiendo identificar y aislar esta población de manera específica. Se determinó el patrón de expresión de Oct4-GFP en la etapa prepuberal y adulta: los testículos de crías Oct4-GFP de 3, 5, 7, 10, 14 y 80 días postnatal (dpn) fueron aislados y disgregados enzimáticamente, y las suspensiones celulares analizadas por citometría de flujo (CF) para determinar el porcentaje de células GFP+ (% de células germinales inmaduras) y la intensidad media

de fluorescencia (MFI) por GFP (nivel de expresión de Oct4). También se analizó el contenido de ADN de las fracciones celulares Oct4-GFP+ empleando la tinción con yoduro de propidio (PI). El día 3dpn mostró el mayor porcentaje de células en fase S, sugiriendo que este tipo celular se encuentra replicándose activamente en este momento. El mayor%GFP+ se estableció en el día 7dpn, siendo la edad seleccionada para la siguiente etapa. Para evaluar la acción estrogénica sobre los parámetros antes mencionados, se expuso a hembras preñadas al estrógeno sintético 17- β -etinilestradiol (EE2) o vehículo (control), desde el día 5 post coito al dpn7 por vía oral. La exposición perinatal a EE2 (5ug/kg.día) incrementó la MFI de la población testicular GFP+ a 7 dpn. Dado que la represión de Oct4 es necesaria para la diferenciación de espermatogonias, nuestros resultados avalan el uso de este modelo animal para el estudio de xenoestrógenos sobre la diferenciación de esta población

502. (740) LA α -NAFTOFLAVONA REVIERTE LA ACCIÓN TÓXICA SISTÉMICA Y GONADAL DEL 3-METILCOLANTRENORhon Calderón E.; Rubio N.; Artillo-Guida R.; Faletti A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET.

La α -naftoflavona (α NF) es un antagonista específico de receptores de hidrocarburos aromáticos (AhR). Previamente observamos que la administración diaria de α NF aumenta el número de folículos inmaduros e induce el desarrollo folicular de la rata estimulada con gonadotropinas. El objetivo de este trabajo fue estudiar si este antagonista es capaz de modificar la acción tóxica de un contaminante ambiental, el 3-metilcolantreno (3MC), sobre la función ovárica. Para ello utilizamos ratas inmaduras inyectadas diariamente con una combinación de 3MC (0.1-1mg/kg) y α NF (80mg/kg) por 20 días. Comparado con los controles (C), la administración de 3MC retrasó la apertura vaginal (C: 27 ± 1 ; 3MC: 42 ± 1 ; $p < 0.01$), expresada en días, y disminuyó la tasa ovulatoria (C: 8 ± 1 ; 3MC: 2 ± 1 ; $p < 0.01$), expresada en número de oocitos/rata, sin modificar el peso corporal ni el peso ovárico. Por inmunohistoquímica, se observó que el 3MC disminuyó 60% el número de folículos antrales ($p < 0.05$) sin alterar el número de folículos pequeños. Al estudiar la presencia de micronúcleos (MN) cada 1000 células en extendidos de médula ósea observamos 14 ± 3 MN en los animales tratados con 3MC y 0 MN en los C. La administración de α NF bloqueó los efectos locales y sistémicos del 3MC ya que estos animales i) presentaron mayor número de folículos antrales (FA) (3MC: 1.6 ± 0.6 ; 3MC+ α NF: 8 ± 2 ; C: 4.4 ± 0.6 $p < 0.01$ vs 3MC); y ii) exhibían sólo 2 ± 0.1 MN ($p < 0.001$). A su vez, los animales que recibieron α NF exhibían mayor número de folículos primordiales (FPO) (49 ± 3 , $p < 0.001$) y cuerpos lúteos (CL) (19 ± 4 ; $p < 0.05$) que los C (FPO: 26 ± 2 ; CL: 7 ± 1). Estos resultados nos indican que: i) la exposición diaria a 3MC inhibe la maduración sexual; ii) la acción tóxica del 3MC sobre el desarrollo folicular parece ser mediada por AhR; y que iii) el tratamiento con α NF revierte los efectos tóxicos del 3MC sobre la función ovárica y protege al organismo de un daño genético causado por este contaminante.

ENDOCRINOLOGÍA 3**503. (86) INHIBICIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS MEDIADA POR RECEPTORES H4 A HISTAMINA EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10**Abiuso M.¹; Pereyra E.; Besio Moreno M.¹; Medina V.²; Correa Torrado M.¹; Pignataro O.^{1,3}; Mondillo C.¹
Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³.

En trabajos previos describimos por primera vez un efecto bifásico de la histamina sobre la esteroidogénesis en células de

Leydig (CL), pudiendo dicha amina inhibir (a través de receptores H1) o estimular (a través de receptores H2) la síntesis de esteroides dependiendo de su concentración. Se ha sugerido recientemente la existencia de receptores H4 (H4R) testiculares, no habiéndose estudiado aún la expresión de dichos receptores en tipos celulares específicos de la gónada masculina. **Objetivo:** Investigar la expresión de H4R en CL, evaluando su posible participación en la regulación de la esteroidogénesis. **Métodos:** Se utilizó la línea de CL MA-10 como modelo experimental. La expresión de H4R se estudió por inmunocitoquímica. Se empleó Vuf 8430 (VUF) como agonista H4R. Los niveles de progesterona y AMPc se determinaron por RIA, en tanto que se empleó la técnica de Western Blot para estudiar variaciones en la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR). **Resultados:** Se detectó expresión de H4R en las CL MA-10. Si bien VUF no tuvo efecto sobre la esteroidogénesis basal, inhibió la esteroidogénesis estimulada por hCG y dbAMPc de manera concentración-dependiente (4-5 horas de incubación). VUF también inhibió la producción de AMPc inducida por hCG y forskolina, sin modificar los niveles basales del segundo mensajero. Se obtuvieron resultados similares en presencia de JNJ 28610244, otro agonista H4R. Finalmente, se observó un efecto inhibitorio de VUF sobre la expresión de StAR inducida por hCG o dbAMPc. **Conclusión:** Los resultados señalan que las CL MA-10 expresan H4R y que la activación de dicho receptor conduce a una inhibición del efecto esteroidogénico de hCG, sugiriendo la posible contribución de H4R a la regulación intratesticular de los niveles de andrógenos (Subsidios: CONICET, ANPCYT, UBA y Fundación Roemmers).

504. (87) CÉLULAS MADRE/PROGENITORAS EN HIPÓFISIS NORMALES Y PATOLÓGICAS DE RATÓN

Cristina C.¹; Luque G.²; Willems C.⁴; Ramírez M.²; Zubeldia Brenner L.²; Ornstein A.²; Pérez Millán M.²; Rubinstein M.³; Becu-Villalobos D.²; Vankelecom H.⁴

Centro de Bioinvestigaciones, Universidad del Noroeste de Buenos Aires¹; Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET²; Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Experimental (INGEBI)-CONICET³; University of Leuven - Ku Leuven, Bélgica⁴.

Las células madre tumorales (CSC) son importantes en el crecimiento, angiogénesis, invasión y resistencia a terapia y/o recurrencia de numerosos tumores. Nuestro objetivo es la caracterización de este tipo celular en hipófisis de ratones controles, y en un modelo de prolactinoma resistente a agonistas dopaminérgicos, el ratón con mutación nula del receptor dopaminérgico D2 sólo en lactotopos (lacD2RKO). En hipófisis de ratones hembra controles determinamos la presencia de SOX2, un factor de transcripción relacionado a CSC, particularmente en la zona marginal entre la hipófisis anterior e intermedia. Por estudios de estado de metilación (MSPq), demostramos que el promotor de Sox2 tenía una alta proporción de CpG demetilados, probablemente indicando alta actividad. Por otro lado, los ratones hembra lacD2RKO presentan gran hipertrofia hipofisaria, niveles muy elevados de prolactina en sangre, y aumento en la expresión de marcadores hipofisarios de angiogénesis (VEGF y CD31) y proliferación (PCNA). El factor SOX2, evaluado por inmunohistoquímica, se halló expresado en menos del 5% de los núcleos en hipófisis de hembras lacD2RKO, no pudiéndose cuantificar su expresión en la zona marginal. Se optimizó una técnica de citometría de flujo para la obtención de una población celular CD31-/CD45-/CD44+. Esta población estaría enriquecida en células progenitoras (CD44+), con exclusión de células progenitoras de endotelio y hematopoyéticas (CD31- y CD45-respectivamente). Encontramos que esta población correspondía al (0.7% + 0.3%) en las hiperplasias de las hembras lacD2RKO, comparado con 0.5% + 0.3 en hipófisis normales. Nuestros resultados demuestran la presencia de factores asociados a CSC en hipófisis de ratón, sin obtener diferencias significativas en la proporción de células CD31-/CD45-/CD44+ entre los prolactinomas resistentes del ratón lacD2RKO y los controles.

505. (132) EL ESTRADIOL (E2) AUMENTA LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA (AMH)

EN UNA LÍNEA DE CÉLULAS DE SERTOLI PREPUBERALES DE RATÓN (SMAT1)

Valeri C.¹; Berensztein E.^{2,3}; Schteingart H.¹; Rey R.^{1,3}
Centro Investigaciones Endocrinológicas Dr. César Bergadá (CEDIE)-CONICET-FEI-División Endocrinología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires¹; Laboratorio de Cultivo Celular, Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", Buenos Aires²; Departamento de Biología Celular, Histología, Embriología y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³.

La AMH constituye un marcador de la función testicular. Es sintetizada por las células de Sertoli, desde el inicio de la diferenciación testicular fetal y sus niveles van disminuyendo hacia la pubertad. Existe en el promotor de la AMH un hemi-palíndromo de elemento de respuesta a estrógenos (ERE). El testículo es capaz de producir estrógenos a partir de la aromatización de andrógenos, bajo el estímulo de la FSH. En pacientes con insensibilidad a los andrógenos, no gonadectomizados, se observa en la edad pubeal un aumento de la AMH concomitantemente con la FSH, la testosterona y el estradiol (E₂). Estas observaciones nos han llevado a hipotetizar que los estrógenos podrían ser mediadores del aumento de la AMH. El objetivo de este trabajo fue determinar si el E₂ regula la actividad del promotor de AMH en células SMAT1. Para evaluar la actividad del promotor de la AMH, se realizaron ensayos reporteros en células SMAT1 co-transfectadas con un fragmento de 3063 pb del promotor de AMH río arriba del gen de la luciferasa y plásmidos de expresión de los receptores de estrógenos alfa (RE α) y/o beta (RE β) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de E₂ por 24hs. Los resultados se expresan como % del control (Media \pm ES) y se analizaron con una prueba T para una muestra, considerándose significativo (*) cuando P<0,05. Resultados: En células transfectadas, el RE α fue capaz de aumentar la actividad transcripcional del promotor de AMH en presencia de E₂ (10⁻¹⁰ M: 183.8 \pm 23.2*; 10⁻⁹: 160.2 \pm 12.2*; 10⁻⁸: 162.4 \pm 12.8*; 10⁻⁷: 145.8 \pm 7.8*). El RE β aumentó la actividad transcripcional a concentraciones de E₂ de 10⁻⁷ M: 133.8 \pm 24.2*. La co-transfección con ambos receptores mostró resultados semejantes a los del RE α . Nuestros resultados demuestran que el E₂ en presencia de los REs estimula la actividad transcripcional del promotor de la AMH en células SMAT1.

506. (139) EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A (BPA) SOBRE LOS MECANISMOS NEUROENDOCRINOS QUE REGULAN LA INGESTA EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN GRASA

Stoker C.^{1,2}; Andreoli M.^{1,2}; Rojas M.²; Rossetti M.^{1,2}; Luque E.¹; Ramos J.^{1,2}

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Cátedra de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral².

El bisfenol A (BPA) es un compuesto utilizado en la polimerización de policarbonatos plásticos con actividad como perturbador endocrino. Recientemente se ha postulado su capacidad potencial de inducir obesidad. Nuestro objetivo fue determinar la influencia de la exposición perinatal a BPA sobre el peso corporal, parámetros metabólicos y señales hipotalámicas que regulan la ingesta. Ratas Wistar macho fueron expuestas a 50 μ g/kg/día de BPA o vehículo desde el día 9 de gestación hasta el destete. Luego fueron alimentadas con una dieta rica en grasa (DG) por 20 semanas (grupos BPA-DG y control-DG). Un grupo control fue alimentado con pellet (control-P). Se evaluaron: ingesta energética (IE), peso corporal (PC), test de tolerancia a la glucosa (TTG), peso de los parches adiposos (PPA) y expresión hipotalámica de los mRNA de neuropéptidos orexígenos (NPY y AgRP) y anorexígenos (POMC y CART), receptores de leptina e insulina (RL y RI). La IE se incrementó en los animales BPA-DG y control-DG respecto a control-P resultando en un aumento del PC y de los PPA (p<0,05). A su vez, la IE de BPA-DG fue superior a la de control-DG produ-

ciendo un aumento de los PPA ($p < 0,05$). El aumento en la IE de los animales alimentados con DG se relacionó a una respuesta orexigénica mediada por una disminución de la expresión de POMC y CART ($p < 0,05$). La expresión de AGRP no se modificó mientras que la de NPY y RI disminuyó en los animales alimentados con DG ($p < 0,05$). El RL aumentó en el grupo control-DG respecto de control-P ($p < 0,05$). La exposición a BPA-DG indujo diabetes lo cual se manifestó por la alteración del TTG y de la glucemia basal a diferencia del grupo control-DG que sólo evidenció alteración del TTG ($p < 0,05$). Nuestros resultados muestran que la alimentación con DG altera los mecanismos neuroendocrinos de regulación de la ingesta produciendo obesidad y que la exposición perinatal a BPA exacerba los efectos metabólicos de la DG, profundizando el cuadro de obesidad y generando diabetes.

507. (192) ACCIÓN DE TESTOSTERONA SOBRE LA ADHESIÓN DE MONOCITOS Y PLAQUETAS AL ENDOTELIO VASCULAR

Campelo A.^{1,2}; Sandoval M.^{1,3}; Massheimer V.^{1,2}

Cátedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; Unidad Básica Química, Departamento de Ciencias Básicas, UTN-FRBB³.

La adhesión de monocitos (Mo) y plaquetas (Pq) al endotelio vascular es clave en la génesis de la enfermedad vascular. Siendo el endotelio blanco de la acción de los andrógenos, estudiamos la acción de testosterona (T) sobre la adhesión al endotelio de Mo y Pq. Utilizando Mo y Pq obtenidos a partir de sangre periférica y cultivos de células endoteliales (CE) demostramos que el tratamiento de las CE con T (1nM) por 24hs no afecta la adhesión basal de monocitos al endotelio pero es capaz de revertir el efecto estimulante del lipopolisacárido bacteriano (LPS) (23;21;46;26 C;T;LPS;LPS+T Mo/campo $p < 0,01$). El tratamiento de los Mo con T produjo una disminución de la adhesión de los Mo, siendo el efecto antiadherente aún mayor al tratar tanto a Mo como a CE, efecto que también se observó en condiciones inflamatorias (14;4;26;13 C; T; LPS; LPS+T Mo/campo $p < 0,01$). Al evaluar la adhesión de Pq al endotelio se determinó que el tratamiento de las CE con T (1nM) 24hs no afecta la adhesión basal de Pq al endotelio en condiciones basales, pero es capaz de revertir el efecto estimulante de la adhesión producido por el LPS (73; 79; 121;85 C; T; LPS; LPS+T Pq/campo $p < 0,01$). Siendo la adhesión de Pq y Mo al endotelio mediada por la expresión en membrana de diversas moléculas de adhesión, se evaluó en CE el efecto de T sobre la expresión de P y E selectina (RT-PCR), participantes en la adhesión inicial, observando que T no afecta la expresión del ARNm de ninguna de estas moléculas. Al evaluar el efecto de T sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, involucradas en la adhesión firme de los MO, se vio una disminución en la expresión del ARNm de ambas moléculas (59% y 73% resp). Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión en Mo de las integrinas CD11c y CD11b, no observándose diferencias entre las condiciones control y T. Los resultados presentados muestran que en condiciones inflamatorias T tendría un efecto protector previniendo la adhesión de MO y Pq al endotelio vascular.

508. (201) REGULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA VÍA DEL NFκB EN CÉLULAS GH3

Eijo G.; Moreno M.; Jaita G.; Gottardo F.; Zárate S.; Magri M.; Candolfi M.; Ferraris J.; Ogando M.; Pisera D.; Seilicovich A.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La inhibición de la translocación nuclear del NFκB está involucrada en la acción sensibilizante de los estrógenos (E_2) al estímulo proapoptótico del TNF-α en células adenohipofisarias. En este trabajo estudiamos la acción del E_2 sobre la vía del NFκB en la línea tumoral de somatolactotropos GH3. Analizamos la translocación nuclear de NFκB/p105, p65 y p50 inducida por TNF-α y la expresión de Bcl-xL por Western blot. El E_2 aumentó la concentración nuclear de p105, p65 y p50 ($p < 0,05$) y la concentración total de Bcl-xL (C:

3.95 ± 0.25; E_2 : 6.25 ± 0.55, $p < 0,05$). El TNF-α aumentó la concentración nuclear de p65 en células GH3 incubadas con o sin E_2 pero aumentó la concentración nuclear de p50 sólo en ausencia de E_2 ($p < 0,05$). También determinamos el efecto del E_2 sobre la hipodiploidia (por citometría de flujo) de células GH3 incubadas con TNF-α. El E_2 no modificó la apoptosis inducida por TNF-α ($p < 0,01$). Para analizar el papel del NFκB en la supervivencia de células GH3 utilizamos un inhibidor de esta vía, el BAY 11-7082 (BAY). BAY disminuyó la viabilidad (por MTS) de células GH3 (C: 0.18 ± 0.02, BAY: 0.14 ± 0.01, $p < 0,01$) y aumentó el porcentaje de células TUNEL positivas (C: 0.7%, BAY: 9.3%, $p < 0,01$). El efecto apoptótico del TNF-α en presencia de BAY, a una concentración que no tiene acción *per se*, fue mayor que en ausencia de este inhibidor (C: 4.0 ± 1.1%, TNF-α: 11.8 ± 2.1%, BAY: 6.1 ± 0.4%, BAY+TNF-α: 18.2 ± 0.1%, $p < 0,05$). Estos resultados demuestran que el E_2 activa la vía del NFκB en células GH3 y que esta vía está implicada en la supervivencia de estas células, sugiriendo que el E_2 por activación del NFκB podría estar implicado en el desarrollo tumoral de la pituitaria. El mayor efecto apoptótico del TNF-α en células GH3, en condiciones de inhibición farmacológica de la vía del NFκB, sugiere que el uso de inhibidores de esta vía podría mejorar la eficacia del tratamiento de tumores hipofisarios.

509. (279) LA EXPOSICIÓN PRE Y POSTNATAL TEMPRANA A UNA DOSIS BAJA DE BISFENOL A MODIFICA LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-OVÁRICO EN RATAS HEMBRA PREPÚBERES. EFECTOS SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR

Gamez J.¹; Peñalba R.¹; Cardoso N.¹; Pandolfi M.³; Carbone S.¹; Ponzio O.¹; Scacchi P.²; Reynoso R.^{1,2}

Laboratorio de Endocrinología II Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina²; Laboratorio de Neuroendocrinología y Comportamiento, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³.

En trabajos previos hemos demostrado que la exposición durante la gestación y la lactancia a una dosis alta de bisfenol A (BPA) modifican la actividad del eje reproductor en ratas hembra pre púberes. Utilizando el mismo modelo expusimos a los animales a una dosis baja de BPA y analizamos los niveles séricos de gonadotropinas, estradiol y desarrollo folicular. Se administró BPA en el agua de bebida en una dosis aproximada de exposición de 3 µg/kg/día a ratas madre de la cepa Wistar y etanol 0.1% al grupo control. Las crías hembra fueron separadas de la madre a los 21 días de vida y sacrificadas a los 35 días. Se determinó: LH, FSH, estradiol (RIA, ng/ml, pg/ml) y se realizó estudio histológico de cortes ovario (coloración: tricrómico de Masson). Se cuantificaron folículos en crecimiento (folículos primarios, secundarios, antrales) y atrésicos en secciones al azar provenientes de cada ovario. Los niveles de LH y estradiol se incrementaron significativamente en los animales expuestos a BPA, mientras los de FSH no sufrieron cambios (LH 2,90±0,50 vs 5,60±0,20 $p < 0,01$, Estradiol 7,96±0,10 vs 11,23±0,08 $p < 0,001$, FSH 120±23 vs 119±17). El número de folículos en crecimiento, primarios, secundarios y atrésicos fue mayor en los animales expuestos (17±0.77 vs 27.5±1.84 $p < 0,05$; 3.25±0.25 vs 9.8±2.05 $p < 0,05$; 3.66±0.21 vs 7.8±1.02 $p < 0,01$; 4.2±0.58 vs 7.4±0.92 $p < 0,05$) mientras que el número de antrales disminuyó (9.6±0.74 vs 6.6±0.4 $p < 0,01$). BPA provocaría a nivel hipofisario un aumento de la liberación de LH, por un mecanismo análogo a la retroalimentación positiva provocada por el pico pre-ovulatorio de estradiol. Esto estimularía la teca interna a producir andrógenos los que se convertirían a estrógenos por acción de la aromatasa. En el ovario BPA alteraría el normal desarrollo folicular, causando un mayor reclutamiento de folículos primordiales e impidiendo la correcta maduración desde folículos pre-antrales a antrales, conduciendo a los mismos hacia la atresia folicular.

510. (374) LA EXPERIENCIA MATERNA COMO FACTOR MODULADOR DE LA ESTEROIDOGÉNESIS HIPOCÁMPICA EN LA ADULTEZ

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, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral; Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

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 (progesterona y estradiol). En este contexto, ¿podrán los efectos beneficiosos observados en las hembras multiparas estar mediados por una regulación de la esteroidogénesis hipocámpica? Para comenzar a responder esta pregunta, evaluamos la influencia de la experiencia reproductiva sobre la expresión de las enzimas esteroidogénicas en el hipocampo de la rata y los mecanismos regulatorios intervinientes. 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 hipocampos se disecaron y almacenaron a -80°C para posterior 1) extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real y 2) análisis de metilación utilizando enzimas de restricción sensibles a metilación y posterior PCR en tiempo real (MSRE-PCR). La experiencia reproductiva generó un aumento en los niveles de ARNm correspondientes a las enzimas P450_{scc}, P450_{arom}, P450_{11 β -2} y 5 α -reductasa (HM vs HV, $p < 0.05$) y una disminución en la metilación de uno de los sitios estudiados correspondientes al promotor de la enzima 5 α -reductasa (HM vs HV, $p < 0.05$). Estos resultados muestran que, la experiencia materna aumenta la expresión de las enzimas neuroesteroidogénicas en el hipocampo a través de mecanismos que implican el estado de metilación de los promotores. Según nuestra hipótesis, la misma podría atenuar la caída en los niveles de neuroesteroides asociada a edad, favoreciendo la plasticidad neuronal hipocámpica.

511. (434) ESTRÓGENOS CEREBRALES EN RATONES CARENTES DE UN RECEPTOR GABAB FUNCIONAL (KO): EFECTOS SOBRE GENES CLAVE DEL EJE REPRODUCTIVO

López P.¹; Di Giorgio N.¹; Bettler B.²; Libertun C.^{1,3}; Lux-Lantos V.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Universidad de Basilea, Suiza²; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³.

Hembras adultas (AD) KO tienen ciclos irregulares, pulsatilidad aumentada de GnRH e infertilidad. En AD KO la expresión de GnRH y la enzima de síntesis de GABA, GAD, están alteradas en el hipotálamo (H), principalmente el H anterior (HA). En cambio, en crías KO de 4 días (4D) estos 2 genes están alterados solamente en H medio basal (HMB). La expresión de Kiss1 también está alterada en HMB en 4D, pero es normal en H de AD. Los niveles de estrógenos (E) no justificaron las diferencias en la expresión de GAD, GnRH y Kiss1, sensibles a E. Para evaluar el posible rol de los E cerebrales en estos efectos estudiamos en ratones KO y WT, de ambos sexos (M y H), de 4D y AD, en HA y HMB: la expresión por qPCR de a) aromatas (Aro), b) tirosina hidroxilasa (TH) y receptor de progesterona (RPG) como otros genes sensibles a E, c) receptores de Ea (REa) y ciclofilina como control. 4D: Aro estaba aumentada en HA de KO (MWT=0.9±0.2; MKO=2.0±0.4, HWT=1.3±0.2 y HKO=2.3±0.7, KO vs WT: $p < 0.05$), sin cambios en HMB. TH y RPG no mostraron diferencias sexuales ni genotípicas en HA o HMB. AD: Aro mostró un diferencia sexual (machos > hembras) en HA y HMB, sin cambios por genotipo. TH en HA fue mayor en hembras que en machos WT, esta diferencia sexual se perdió en los KO (MWT=1.0±0.0; MKO=1.3±0.3, HWT=2.4±0.2 y HKO=1.7±0.1, MWT vs HWT: $p < 0,01$); en HMB, TH fue mayor en machos que en hembras, sin cambios por genotipo. RPG en HA muestra una diferencia sexual en WT (macho > hembra) ausente en KO, mientras que en HMB RPG es mayor en mostraron el mismo patrón en HA y HMB: WT que en KO. REa hembras>machos y KO>WT. Conclusiones: en los KO de 4D Aro está aumentada en HA pero no en HMB, por lo que probablemente

no sería la causa de la expresión disminuida de Kiss1; este aumento de Aro en HA tampoco modifica la expresión de TH o RPG. En los AD no hay diferencias por genotipo en la expresión de Aro, si bien encontramos diferencias genotípicas en la expresión de TH, RPG y REa. (CONICET-UBA-ANPCYT).

512. (468) IDENTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS DE LA VÍA ALTERNATIVA DE SÍNTESIS DE DHT EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA ADRENAL HUMANA DESDE LA INFANCIA TEMPRANA HASTA LA PUBERTAD TARDÍA

Baquedano M.^{1,2}; Madjinca S.¹; Rivarola M.^{1,2}; Belgorosky A.^{1,2}
Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"; Comisión de Investigaciones Científicas y Técnicos (CONICET), Buenos Aires².

La 17-Hidroxiprogesterona (17OHP) puede ser convertida a dehidrotestosterona (DHT) por la vía alternativa o "backdoor pathway" sin los intermediarios convencionales androstenediona y testosterona. En esta vía, la 17OHP es convertida a pdiol, el cual es un excelente sustrato para la actividad 17,20 liasa de la CYP17A1, generando androsterona. Existe reciente evidencia de que la vía alternativa es responsable de la síntesis de DHT en estados patológicos donde se acumula 17OHP adrenal, incluyendo las deficiencias de 21 α -hidroxilasa, 11 α -hidroxilasa y POR. Sin embargo, se desconoce el rol de esta ruta enzimática en la fisiología de la glándula adrenal humana. Se estudió la expresión de AKR1C1-4, SRD5A1-2 y RoDH (HSD17B6) mediante RT-PCR en tiempo real en tejido adrenal humano (TAH). Según se estableció previamente (Baquedano et al JCEM 92:2215-22, 2007), los TAH se dividieron en 3 grupos (Gr) etarios: Gr1, <3 meses (m), n=9, involución de la zona fetal; Gr2, 3m a 6 años, n=9, pre-adrenarca y Gr3, >6 a 20 años, n=8, adrenarca. Los niveles de ARNm (media \pm DS, unidades arbitrarias) de AKR1C1 (1.86 \pm 0.64) y AKR1C2 (1.89 \pm 0.50) en el Gr3 fueron similares a los del Gr2 pero más altos ($p < 0.05$) que en el Gr1 (1.14 \pm 0.39 y 1.13 \pm 0.32, respectivamente). El ARNm de AKR1C3 en Gr3 (3.06 \pm 0.78) fue más alto que en Gr1 (2.00 \pm 0.67) y Gr2 (1.24 \pm 0.54), $p < 0.05$. SRDA1 y RODH fueron amplificadas sin diferencias entre los grupos de edad. Los niveles de ARNm de SRDA2 y AKR1C4 fueron indetectables en los 3 Gr. Estos resultados indican que la glándula adrenal humana posnatal expresaría las enzimas para completar todos los pasos de la vía alternativa de síntesis de DHT. En conjunto, los datos son compatibles con un papel fisiológico de la vía alternativa como mecanismo de producción de andrógenos en la glándula adrenal humana. Se podría sugerir que la vía alternativa podría tener un papel en la zona fasciculata, pero no relacionado con el desarrollo de la zona reticular en la adrenarca.

513. (476) EFECTO DE UNA DIETA DE ALTA ENERGÍA Y DE LA METFORMINA SOBRE LA MASA CORPORAL Y EL METABOLISMO GLUCÍDICO. CONSECUENCIAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Prochnik A.¹; Mirarchi F.¹; González Murano M.¹; Bianchi M.³; Serra H.²; Wald M.¹

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET¹; Cátedra de Farmacología, Medicina, UCA²; Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET³.

El sobrepeso y la obesidad se han transformado en un problema de salud mundial en continuo crecimiento. Entre los trastornos metabólicos asociados a la obesidad está la diabetes tipo 2 (D2) y ambas patologías se asocian a estados de inmunosupresión. La metformina es una droga ampliamente utilizada para el tratamiento de la D2 en especial en pacientes con sobrepeso. En este trabajo se evaluaron los efectos de una dieta de alta energía, rica en grasas (DAE) y el tratamiento con metformina (met) en el desarrollo de obesidad y D2, y sus consecuencias sobre la respuesta inmune. Ratones hembras C57 alimentados a partir del mes de edad y durante 6 meses con una DAE presentaron un mayor aumento en la ingesta calórica y en el peso corporal que sus respectivos controles alimentados con una dieta convencional (DN). El tratamiento durante los 3 últimos meses con met

(dosis:250 mg/kg/día) redujo el incremento de peso sin modificar la ingesta calórica (peso(g) DAE:50±10, DAE+met:36±5, DN:27±2, DN+met:29±4; Ingesta (kcal/día) DAE:13±2, DAE+met:12±1, DN:10±1 DN+met:10±1, n=12, p<0.05). En todos los casos, el incremento de peso se correlacionó con el de contenido de grasa abdominal y subcutánea. Al estudiar la glucemia basal, la tolerancia a la glucosa y la insulinemia observamos que los ratones alimentados con DEA presentaron incrementos en la glucemia basal y la insulinemia (gluc (mg/dl) DN:122±5, DN+Met:121±12, DAE: 148±12, DAE+Met:126±1 ; ins (ng/ml) DAE:0,46 ± 0,14, AE+met:0,27 ± 0,06, DN:0,23 ± 0,03, DAE+Met:0,23±0,02 n=12, p<0.05), que fueron corregidas por la administración de met. La DAE produjo, además, una menor proliferación de linfocitos T, la cual no fue revertida por la met (DN: 100%; DAE: 61±4%; DAE+met: 53±8%, DN+Met: 72±32%, p<0.05). Se concluye que la alimentación con DAE produce alteraciones metabólicas e inmunológicas. La met puede corregir las modificaciones sobre el metabolismo energético pero no es capaz de normalizar la proliferación linfocitaria.

514. (515) ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION DEL RECEPTOR MAS ESPECIFICO PARA ANG-(1-7) EN TEJIDOS DE RATA Y RATON NORMALES

Burghi V.; Muñoz M.; Mazziota L.; Banegas R.; Rando M.; Dominici F.

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El receptor Mas es un receptor de membrana específico para la Angiotensina-(1-7). Pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, está constituido por 324 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 37 kDa y se encuentra distribuido ampliamente a nivel tisular. Para estudiar los efectos de la Ang-(1-7) es esencial evaluar la regulación de la expresión de su receptor en distintos estados patológicos como la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y la acromegalia. El objetivo de este estudio fue determinar la distribución, abundancia relativa y peso molecular (PM) del receptor Mas en diferentes tejidos de rata y ratón normales. Para ello, solubilizados de hígado, riñón, músculo esquelético y corazón de rata y ratón se sometieron a la técnica de Western Blotting, y se caracterizó la especificidad de las bandas obtenidas mediante una pre adsorción de los anticuerpos con péptidos bloqueantes comerciales. En el hígado y riñón de rata y ratón se observaron dos bandas, con PM aproximado de 40 kDa y 30 kDa siendo ésta última un duplete. En el hígado de ratón se observó, además, una banda con PM aproximado de 75 kDa. Las bandas correspondientes a 30 kDa y 75 kDa no se observaron al realizar la pre adsorción del anticuerpo (10 ug péptido/ 1 ug anticuerpo) indicando su especificidad. Tanto en el músculo esquelético de rata como en el de ratón se observó una banda con PM aproximado de 30 kDa que no se observó al pre adsorber el anticuerpo. En el corazón de rata y ratón se observó una banda con PM aproximado de 30 kDa mientras que en el corazón de ratón se observó además una banda de PM aproximado de 40 kDa. Estas bandas también estuvieron ausentes al realizar la pre adsorción del anticuerpo. Los distintos patrones de expresión para el receptor Mas indicarían que éste podría sufrir procesos de glicosilación, ubiquitinización o formación de homo y/o heterodímeros con otros receptores que actualmente estamos estudiando.

515. (617) EL RECEPTOR HER2 MODULA EL EFECTO ANTI-MITOGÉNICO DE TGFβ1 EN CÉLULAS TUMORALES ADENOHIPOFISARIAS

Petiti J.¹; Sosa L.¹; Sabatino E.¹; Gutiérrez S.¹; Vaca A.¹; García P.²; De Paul A.¹; Torres A.¹

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-Conicet, Universidad Nacional de Córdoba¹; Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba².

TGFβ1 induce arresto de células adenohipofisarias tumorales a través de la vía Smad2/3, la cual puede ser regulada por las señalizaciones MAPK y PI3K. Estas vías proliferativas son activa-

das por el receptor HER2, cuya sobre-expresión ha sido informada en tumores adenohipofisarios. Nuestro objetivo fue determinar si la respuesta anti-proliferativa del TGFβ1/Smad es modulada por HER2 a través de MAPK y PI3K. Cultivos de células GH3B6 y GH4C1 se trataron con TGFβ1 (4ng/ml, 30 min o 24h) sólo o con una pre-incubación de 1 h con los inhibidores: Trastuzumab (HER2, 400 µg/ml), LY294002 (PI3K 10µM) o PD98059 (MEK1/2; 50µM). Se analizó el ciclo celular por citometría de flujo. La interacción de Smad2/3 con ERK1/2 o Akt fue determinada por inmunoprecipitación y posterior Western Blot. La translocación subcelular de Smad2/3, ERK1/2, y Akt fue observada por microscopía confocal y electrónica. Estadística: ANOVA-Fisher. El TGFβ1 indujo arresto en la fase G0/G1, efecto que fue potenciado cuando ambas líneas celulares fueron pre-incubadas con los inhibidores de MEK1/2 y PI3K. En células GH4C1, la co-incubación de TGFβ1/ trastuzumab aumentó el efecto anti-proliferativo de ambos factores solos. En células GH3B6 no se observó respuesta al trastuzumab, en coincidencia con la baja expresión de EGFR detectada en esta línea celular comparada con células GH4C1. Los ensayos de inmunoprecipitación mostraron interacción de Smad2/3 con ERK1/2 o Akt. Estas asociaciones fueron incrementadas por TGFβ1, efecto que fue bloqueado luego de la pre-incubación con LY294002 o PD98059. Por microscopía confocal y electrónica se observó co-localización de Smad2/3 con ERK1/2 o Akt. Estos resultados demuestran que el efecto anti-mitogénico de TGFβ1 en células tumorales adenohipofisarias es contrabalanceado por las vías MAPK y PI3K. Además sugieren que el receptor HER2 regularía la proliferación tumoral adenohipofisaria y la señal TGFβ1/Smad2/3, convirtiéndolo en un atractivo blanco terapéutico.

516. (660) EFECTO DE LA ANDROGENIZACIÓN NEONATAL EN LA RATA HEMBRA SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA PREPUBERAL

Ongaro L.¹; Salvetti N.²; Ortega H.²; Giovambattista A.¹; Spinedi E.³

Laboratorio de Neuroendocrinología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)- CONICET-CICPBA¹; Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVet-Litoral)-CONICET, Universidad Nacional del Litoral²; Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata³.

La androgenización neonatal (AN) en la rata hembra induce poliquistosis ovárica y detención del ciclo estral a edad adulta. Este trabajo estudió el impacto de la AN sobre la función ovárica prepuberal. Ratas Sprague Dawley de 5 días de vida se inyectaron (sc) con 50 µL aceite de maíz estéril sólo (CT) o conteniendo 1,25 mg de propionato de testosterona (PT). Al día 30 de vida fueron sacrificadas, se recolectó sangre y se disecaron los ovarios (OV). En las muestras de plasma se determinó: leptina, insulina, 17-hidroxi-progesterona (17HOP4), testosterona (T) y estradiol (E₂). A partir de los OV se realizó: 1) la extracción de ARN para analizar la expresión enzimática (P450osc y P450c17) por Real Time-PCR; 2) la cuantificación del contenido de 17HOP4; y 3) el estudio histológico a partir de cortes del tejido incluido en parafina coloreados con hematoxilina-eosina. Finalmente, se analizó la funcionalidad de células de la granulosa (CG) *in vitro*. Para ello, ratas CT y PT fueron inyectadas (sc), entre los días 25-27 de vida, con 1 mg de dietilestilbestrol (DES) durante tres días consecutivos previos al sacrificio (28-30 días de edad). A partir de los OV se aislaron las CG para su cultivo por 48 hs sin o con hCG (0,05-0,5 UI/mL). Los resultados indicaron en los animales PT (p<0,05 vs. CT): 1) la disminución en las concentraciones circulante y ovárica de 17HOP4, 2) hiperleptinemia, 3) la menor expresión de P450osc y P450c17 y 4) una mayor relación de folículos primarios/terciarios. Las CG *in vitro* mostraron una secreción normal de E₂. Nuestros resultados sustentan que la AN induce disfunción ovárica a edad prepuberal, caracterizada por fallas en la maduración folicular y la deficiencia de enzimas esteroideogénicas, aunque las CG mantienen su capacidad de respuesta a la hCG. El estudio sugiere que la disminución de la capacidad reproductiva en este modelo afecta fundamentalmente la foliculogénesis, proceso agravado por la hiperleptinemia (PIP 0704-2007; FPREDM 062013).

517. (681) ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN MEN1 EN TRES GENERACIONES DE UNA FAMILIA

Viale M.; Serra M.; Fernández Gianotti T.; Miler E.; Kozak A.; Balzaretto M.; Stigliano A.; Garraza R.; Fainstein Day P. *Laboratorio de Endocrinología y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires.*

Introducción: La asociación de dos o más neoplasias endócrinas en un paciente: paratiroidea, entero-pancreática e hipofisaria, se denomina Neoplasia Endócrina Múltiple tipo1 (MEN1). Es una enfermedad poco frecuente de herencia autosómica dominante con un alto grado de penetrancia. El gen asociado codifica la síntesis de una proteína de 610 aminoácidos (AA), llamada menina que actúa inhibiendo del crecimiento tumoral. El diagnóstico genético está indicado en pacientes con dos o más asociaciones de tumores típicos, sus familiares directos y pacientes de corta edad con tumores típicos. **Objetivo:** Describir genéticamente a posibles portadores de mutaciones en el gen *MEN1* en una familia clínicamente afectada. **Sujetos:** Caso índice clásico (al menos dos de los tres tumores típicos), edad: 61 años y 9 familiares de primer grado. El consentimiento informado fue aprobado por el Comité de Ética de nuestra Institución. **Métodos:** El estudio molecular se realizó a partir de ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periférica. Los exones del 2 al 10 y las regiones intrónicas flanqueantes del gen *MEN1* fueron amplificados por PCR y luego secuenciadas automáticamente. **Resultados:** Encontramos en el caso índice y en 5 de los 9 familiares directos estudiados la mutación germinal c.249_252delGTCT en el exón 2, es una delección con corrimiento del marco de lectura, que genera una proteína de 117 AA. La pérdida de los sitios de señalización nuclear (NLS) en el extremo carboxi-terminal impedirá la translocación al núcleo celular. En todos los familiares portadores de la mutación se observaron diferentes tumores típicos confirmando la ausencia de correlación genotipo-fenotipo. **Conclusiones:** La importancia del análisis genético en el caso índice y luego en sus familiares posibilita el diagnóstico precoz en los portadores, pudiéndose concentrar el esfuerzo y los recursos en estos y dar el alta definitiva a aquellos familiares en los que se excluye la presencia de la mutación.

518. (745) LA HIPERINSULINEMIA PODRÍA MEDIAR LA HIPERLEPTINEMIA EN EMBARAZADAS CON DIABETES GESTACIONAL MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE SU EXPRESIÓN EN CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS

Vilariño García T.¹; Pérez-Pérez A.¹; Sánchez-Jiménez F.¹; Guadix P.¹; Dueñas J.¹; Varone C.²; Sánchez-Margalet V.¹ *Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla¹; IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².*

Introducción: La Diabetes Gestacional es una de las patologías más frecuente asociada al embarazo. La Leptina es una hormona reguladora en muchos sistemas celulares, incluyendo las células trofoblásticas, en el cual actúa como factor trófico. Es conocido el aumento de leptina en suero de embarazos con Diabetes Gestacional (DG) en comparación con embarazos normales. **Objetivos:** En el presente trabajo nos propusimos estudiar los niveles circulantes de leptina e insulina en sueros de mujeres con DG y controles en las semanas 24-28 de gestación y la expresión de leptina en placentas normales y DG. Estudiar un posible efecto de la insulina en la expresión de leptina en trofoblastos. **Materiales y Métodos:** La leptina e insulina fueron determinadas por ELISA en 40 sueros normales y 40 de DG. La expresión de leptina placentaria fue estudiada por Western Blot y PCR a tiempo real en 10 placentas procedentes de embarazos controles y 10 con DG. Además, se usaron diferentes concentraciones de insulina (0- 100nM) en explantos placentarios para estudiar la expresión de leptina in vitro. Una P-value < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. **Resultados:** Encontramos niveles de leptina e insulina aumentados de forma significativa en embarazos con DG comparado con embarazos controles. La media de insulina

para el grupo control fue de 5.4±2.0 mU/ml frente a 12.3±10 mU/ml en el grupo con DG (p<0.05). La media de leptina para el grupo control fue de 25.0±14 ng/ml frente a 54.0±31 ng/ml en el grupo con DG (p<0.05) La expresión de leptina en placentas también estuvo aumentada (aprox 3 veces) de forma significativa en el grupo de DG comparado con el grupo control (p<0.05). El estímulo de las células trofoblásticas in vitro con insulina mostró un incremento dosis-dependiente en la expresión de leptina por Western Blot y RT-PCR. **Conclusiones:** La leptina está aumentada de forma significativa en sueros y en placentas de embarazos con DG. La insulina aumenta de una forma dosis-dependiente la expresión de leptina en placenta, por lo que, la hiperinsulinemia encontrada en la Diabetes Gestacional podría mediar la hiperleptinemia por activar la expresión de leptina placentaria.

519. (850) EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE DEIODINASA 2 Y COMODULADORES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS AL FINAL DE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA TEMPRANA DE LA RATA

Pennacchio G.²; Ayala C.²; Soaje M.^{2,4}; Jahn G.²; Valdez S.^{2,3}

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET¹; IMBECU CCT-CONICET Mendoza²; Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Cuyo³; Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Cuyo⁴.

El paradigma actual de la acción hormonal tiroidea (HTs) reconoce que las concentraciones de hormona en los tejidos blanco pueden cambiar incluso cuando sus concentraciones séricas sean normales, por activación o inactivación local. Las deiodinasas de yodotironina (DIO) regulan la actividad de las HTs por eliminación de yodo de T₄. La DIO2 convierte T₄ en T₃. En ratas machos existe un mecanismo de homeostasis a nivel SNC que amortigua los efectos del hipotiroidismo (HipoT) por inducción de DIO2. **Objetivo:** estudiar en ratas HipoT al final de la gestación y en lactancia temprana la expresión de DIO2 y de los co-moduladores de las HTs (CoA1, CoA2 y NCOR1) por PCR en tiempo real. Se usaron ratas Wistar controles (Co) e HipoT, inducido con 0.1 g/L de propiltiouracilo en agua de bebida (8 días antes de preñar las ratas hasta el sacrificio) en los días 19, 20, 21 de gestación (G19, G20 y G21) y 2 de lactancia (n=6-8). Los resultados se correlacionaron con PRL, TSH y P₄ séricas (medidas por RIA). En Co, la expresión de DIO2 y de CoA1 tuvo un patrón similar cayendo en G20 respecto a G19 (p<0.05). Las HipoT tuvieron valores bajos en G19 (p< 0,001 vs Co) y tanto DIO2 como CoA1 aumentaron su expresión en G21 (p<0.05 vs G19 HipoT). El patrón de expresión de NCOR2 y CoA2 fue constante en las Co mientras que en las HipoT su expresión fue baja en G19 (p<0.01 vs Co) y aumentó en G21 (p<0.05 vs HipoT G19). En conclusión, en las HipoT se observó un aumento en la expresión de DIO2, CoA1, CoA2 y NCOR2 al final de la gestación mientras que en las Co disminuyó o permaneció sin cambios. Estos datos sugieren que el HipoT modifica diferencialmente la expresión de DIO2 y de los moduladores de las HTs al final de la gestación y lactancia temprana como un mecanismo compensatorio. Habría que profundizar el estudio de la participación de DIO2 en los mecanismos centrales de amortiguación tiroidea en ratas hembras HipoT determinando la actividad de la enzima y los niveles hipotalámicos de HTs.

REPRODUCCIÓN 3

520. (24) VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LA AROMATASA HIPOTALÁMICA DURANTE EL CICLO REPRODUCTIVO DE LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (LAGOSTOMUS MAXIMUS)

Charif S.¹; Felipe Inserra P.¹ Di Giorgio N.^{2,3}; González C.^{1,3}; Lux Lantos V.²; Vitullo A.^{1,3}; Dorfman V.^{1,3}

Universidad Maimónides, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)¹; Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET².

Hipotálamo, hipófisis y ovarios integran el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG). El estradiol (E_2), producido por la enzima aromatasa, actúa sobre la regulación del eje. La vizcacha presenta un período gestacional inusualmente largo, ovulación hasta 800 oocitos por ciclo, folículo-genesis continua y pseudo-ovulación durante la gestación. Con el objetivo de conocer la regulación del eje HHG en la vizcacha, se analizó la expresión hipotalámica de aromatasa durante el ciclo reproductivo. Se utilizaron vizcachas hembras adultas clasificadas en 5 grupos según el estado de preñez y la presencia de estigmas ovulatorios: no preñadas no ovulando (NPNO) y ovulando (NPO), y preñadas tempranas (Ptem), medias (Pmed) y tardías (Ptar). Tanto los animales NPO como los Pmed presentaron estigmas ovulatorios al momento del sacrificio. Mediante ELISA se observó que el nivel de E_2 sérico aumentó significativamente en Pmed, en relación a Ptem y Ptar ($p < 0,001$) y por RIA se observó aumento significativo en la expresión de LH sérica y GnRH hipotalámica en NPO vs. NPNO y en Pmed vs. Ptem ($p < 0,05$). La aromatasa se inmunolocalizó en el área preóptica del hipotálamo, núcleo supraóptico y eminencia media. Con Western-blot se determinó que la expresión de aromatasa durante la preñez fue significativamente mayor en NPO vs. NPNO y en Pmed vs. Ptem y Ptar ($p < 0,05$). Mediante PCR cuantitativa se observó una expresión significativamente mayor del mRNA de aromatasa en el grupo Pmed con respecto a los otros grupos preñados ($p < 0,05$). La secuenciación del producto amplificado mostró alta homología con respecto a rata y ratón (96,7% y 92,2%, respectivamente), confirmando su identidad. El aumento de la expresión de aromatasa hipotalámica en la etapa media de la gestación de la vizcacha sugiere que el incremento del estradiol local podría intervenir en la activación del eje HHG y consecuentemente, promover la formación de folículos ovulatorios. (PIP-CONICET 0225/2011).

521. (45) EL PALMITATO REGULA LA EXPRESIÓN DE GENES VINCULADOS CON EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN LA CÉLULA DE SERTOLI

Requeira M.; Riera M.; Galarzo M.; Pellizzari E.; Cigorranga S.; Meroni S.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas "Dr. Cesar Bergadá" (CEDIE)-CONICET-FEI-División de Endocrinología, Hospital De Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires.

La célula de Sertoli (CS) metaboliza glucosa a lactato que es utilizado como fuente energética por las células germinales. Esta situación metabólica particular indicaría la utilización de otros sustratos para generar su propia energía. En este sentido, se ha postulado que la CS utiliza los ácidos grasos (AG) como su principal fuente energética. Hemos demostrado que en la CS, la activación farmacológica del factor de transcripción PPAR β/δ -factor de transcripción que se postula puede ser activado por AG y/o derivados- 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 un AG como el palmitato podía regular la expresión de los genes mencionados y si existía participación de PPAR β/δ . Para ello, cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron incubados en condiciones basales o tratados por 24 y 48 hs con palmitato (P, 500 μ M en 1% BSA), en ausencia o presencia de GSK3787 (GSK, Inhibidor farmacológico de PPAR β/δ). Se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 por Northern Blot y de FAT/CD36, MCAD y LCAD por RQ-PCR. Los resultados se expresan como $X \pm DS$ de las veces de estímulo con respecto al basal. Se observó que P estimula la expresión de FAT/CD36 y de CPT1 a las 48h y de LCAD a las 24h (3,5 \pm 0,9*; 2,1 \pm 0,5* y 1,8 \pm 0,4* respectivamente) y que no modifica los niveles de MCAD en los tiempos analizados (* $p < 0,05$, n=3). Se observó además que el aumento en la expresión de FAT/CD36, CPT1 y LCAD observado con P es inhibido por GSK. En su conjunto estos resultados sugieren que el palmitato podría ser un ligando endógeno de PPAR β/δ que estimula la expresión de genes vinculados con el transporte y metabolismo de AG, asegurando de esta manera la utilización de estos sustratos como fuente energética necesaria para la CS.

522. (127) VIP INDUCE MARCADORES DE DECIDUALIZACIÓN EN CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES HUMANAS

Grasso E.; Papparini D.; Agüero M.; Fraccaroli L.; Pérez Leirós C.; Ramhorst R.

Laboratorio de Inmunofarmacología, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

El proceso de decidualización es crítico para lograr una implantación exitosa. Mientras que la progesterona es una hormona fundamental en este proceso, se ha descrito que un aumento del AMPc intracelular en las células estromales endometriales inicia el proceso. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un neuropéptido con actividad inmunoreguladora, producido por células endometriales, trofoblásticas e inmunes entre otras, que señala al interior celular a través de AMPc. Teniendo en cuenta estos resultados, nuestro objetivo fue investigar la contribución de VIP en el proceso de decidualización. Para ello, utilizamos una línea celular de estroma endometrial humana (hESC) capaz de diferenciarse *in vitro* a células deciduales. La misma fue tratada con VIP (10^{-6} a 10^{-8} M) o medroxiprogesterona (MPA) y dbAMPc, como control positivo de decidualización. Las células hESC decidualizadas en presencia de MPA-AMPc incrementan la secreción de VIP medido por RT-PCR y ELISA. Asimismo, VIP fue capaz de inducir la expresión de los marcadores característicos de decidualización, IGFBP1 y KLF13, medidos por RT-PCR en forma dependiente de la concentración luego de 8 días de tratamiento ($p < 0,05$ t-test). Este aumento se acompañó por un aumento en la expresión de IL-8 y SDF-1, marcadores de endometrio en su estado receptivo, en forma similar al tratamiento con MPA-AMPc ($p < 0,05$). Finalmente, para evaluar el aspecto funcional de las células decidualizadas en presencia de VIP, se realizó un ensayo de adhesión e invasión de esferoides similares a blastocistos (ESB, generadas a partir de la línea celular trofoblástica Swan-71) sobre monocapa de células hESC. Las ESB fueron capaces de adherirse e invadir tanto en las hESC diferenciadas con VIP como con MPA-AMPc pero no en las hESC sin tratamiento. Estos resultados sugieren que VIP podría contribuir con el proceso de decidualización en células estromales endometriales humanas.

523. (138) LA PROTEÍNA VCP (VALOSIN CONTAINING PROTEIN) SE LOCALIZA EN EL SEGMENTO ECUATORIAL DEL ACROSOMA ESPERMÁTICO MURINO Y ES LIBERADA DURANTE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL

La Spina F.¹; Romarowski A.¹; Visconti P.²; Buffone M.¹
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Department of Veterinary and Animal Science, University of Massachusetts, USA².

Introducción: La proteína VCP (Valosin-Containing Protein) pertenece a la familia de ATPasas AAA tipo II (ATPasas Associated with a variety of Activities), y participa en una gran variedad de funciones celulares, entre ellas, la fusión de membranas. En espermatozoides humanos, VCP es fosforilada en residuos tirosina durante la capacitación y se localiza en la región acrosomal luego de la misma. Debido a que ciertos aspectos en la fisiología espermática requieren de eventos de fusión de membrana se eligió como blanco de estudio esta proteína. Objetivo: Caracterizar la localización y función de la proteína VCP durante la capacitación en espermatozoides murinos. Metodología: 1) Se utilizaron ratones transgénicos que portan EGFP en el acrosoma y RFP en mitocondrias para evaluar el estado acrosomal junto con la localización del anticuerpo anti-VCP. 2) Se evaluaron parámetros de vitalidad, capacitación y relocalización en presencia de DBEq, un inhibidor específico de VCP. 3) Se evaluó la fosforilación de VCP durante la capacitación mediante inmunoprecipitación. Resultados: Se confirmó la presencia de VCP en el flagelo y el segmento ecuatorial en espermatozoides sin capacitar y capacitados. Asimismo, se observó la ausencia de la misma luego de la exocitosis acrosomal. En presencia de DBEq, se observó una disminución de la motilidad y vitalidad, y un aumento de la reacción acrosomal espontánea en magnitudes proporcionales

a la concentración evaluada. En espermatozoides murinos, a diferencia de lo observado en humanos, VCP no es fosforilada en residuos tirosina. Conclusión: VCP sería la única proteína descrita hasta el momento, asociada al segmento ecuatorial de espermatozoides murinos que es liberada al ocurrir la exocitosis acrosomal. Además, debido a las múltiples funciones celulares asociadas a VCP, nuestros resultados sugerirían la participación de esta proteína en otros eventos de la fisiología espermática.

524. (146) EFECTO DE LA EXPOSICIÓN IN ÚTERO A LOS NIVELES ELEVADOS DE HCG SOBRE EL EJE REPRODUCTIVO EN RATONES HEMBRAS

Ratner L.¹; Di Giorgio N.¹; González-Calvar S.¹; Poutanen M.²; Huhtaniemi I.³; Calandra R.¹; Rulli S.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Departamento de Fisiología, Instituto de Biomedicina, Universidad de Turku²; Departamento de Cirugía y Cáncer, Imperial College of London, Londres, Reino Unido³.

Se demostró previamente que ratones hembra transgénicas que sobreexpresan la subunidad β de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG β +) exhiben niveles elevados de hCG, testosterona, progesterona y prolactina. Además, son infértiles y desarrollan prolactinomas en la adultez. Recientemente hemos identificado a la hiperprolactinemia como la principal causa de infertilidad en estas hembras. Un tratamiento con el agonista dopaminérgico cabergolina aplicado en hembras hCG β + durante la quinta semana de edad, previno las alteraciones hormonales, el desarrollo de prolactinomas y la infertilidad en la adultez. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el eje reproductivo de ratones hembras expuestas a la hipersecreción de hCG durante la gestación. Se utilizaron crías hembras provenientes de madres hCG β + previamente tratadas con cabergolina (hCG β +F1) y se compararon con hembras hCG β + nacidas de madres WT (hCG β + controles). Tanto las madres hCG β + como las crías hCG β + controles y hCG β +F1 presentaron niveles séricos de hCG bioactivo de 23 \pm 8 mUI/ml (bioensayo de células de Leydig). A las 3 semanas de edad, las hembras hCG β + controles presentaron pubertad precoz, aumento en el tamaño uterino y en la expresión génica de *Lhcgr* y *Cyp11a1* en ovario (RT-PCR en tiempo real; $p < 0.05$). En las hembras hCG β +F1 dichos parámetros resultaron comparables a los WT. En la adultez, un 80% de las hembras hCG β +F1 lograron una restauración de la función gonadal, el ciclo estral y la fertilidad, así como también el peso hipofisario y los niveles séricos de prolactina y progesterona. Por último, se analizó la expresión de los genes hipofisarios *Drd2*, *Pit-1* y *Prl*, donde se observó una reducción significativa en las hembras hCG β +F1 en comparación con hCG β + controles ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la exposición *in útero* de hCG podría ejercer un "efecto protector" sobre las crías transgénicas, previniendo la aparición de las alteraciones hormonales, infertilidad y desarrollo tumoral.

525. (165) EFECTO DE MELATONINA SOBRE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) Y LA EXPRESIÓN DE PROTEASAS EN MASTOCITOS DEL TESTÍCULO HUMANO PATOLÓGICO

Rossi S.¹; Windschuetl S.²; Matzkin M.¹; Terradas C.^{3,4}; Ponzio R.⁵; Puigdomenech E.³; Levalle O.⁴; Mayerhofer A.²; Calandra R.¹; Frungieri M.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina¹; Institute of Anatomy and Cell Biology, Munich, Alemania²; Instituto Médico PREFER, Buenos Aires, Argentina³; División de Endocrinología, Hospital Durand, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina⁴; Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina⁵.

La melatonina (Mel) producida y secretada por la glándula pineal controla los ritmos circadianos corporales. Esta indolamina afecta también ciertos órganos periféricos a través de receptores específicos. Previamente hemos demostrado la presencia de Mel en el testículo humano patológico, y la existencia de una corre-

lación directa entre su concentración gonadal y la expresión de enzimas anti-oxidantes. Teniendo en cuenta que los mastocitos (MC) del testículo humano expresan receptores mel1a, y que Mel estimula la expresión de enzimas anti-oxidantes en una línea celular de MC humanos (HMC-1), el objetivo de este trabajo fue investigar si Mel afecta la generación de ROS y la expresión de las proteasas, triptasa (Trip) y quimasa (Qui), en MC humanos. La producción de ROS fue evaluada en un fluorómetro a través de la generación del compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína. Mel (100 nM) produjo una disminución significativa en la generación de ROS en HMC-1 incubados en ausencia (unidades arbitrarias [UA], control=18623 \pm 230, Mel= 15699 \pm 434, $P < 0.05$) o presencia de H₂O₂ (UA, control=18623 \pm 230^a, H₂O₂=25128 \pm 2679^b, Mel + H₂O₂=17994 \pm 810^a; diferentes letras denotan diferencias significativas, $P < 0.05$). En cambio, Mel estimuló significativamente la expresión, determinada por PCR en tiempo real (qPCR), de Trip (valor arbitrario asignado al control = 1; Mel= 57+6, $P < 0.05$) y Qui (control = 1; Mel = 38.9+4, $P < 0.05$) en HMC-1. Mediante microdissección por captura láser y PCR, se detectó la expresión Trip y Qui en MC presentes en biopsias testiculares de pacientes con Hipoespermatogénesis y Síndrome de Células de Sertoli Sólo. La concentración testicular de Mel, determinada por ELISA, mostró una correlación directa con la expresión (qPCR) de Trip ($r = 0.72$, $P < 0.05$) y Qui ($r = 0.60$, $P < 0.05$) en el testículo humano infértil. En resumen, estos resultados sugieren que Mel regularía la generación de ROS y la expresión de proteasas en la población de MC del testículo humano.

526. (172) LA ACTIVACIÓN IN VIVO DE LOS PPAR REGULA EL METABOLISMO LIPÍDICO Y LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EL PULMÓN DE FETOS DE RATAS DIABÉTICAS

Kurtz M.¹; Capobianco E.¹; Martínez N.¹; Careaga V.²; Maier M.²; Jawerbaum A.¹

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET¹; Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos aplicados a la Química Orgánica (UMYMFOR)-CONICET, Universidad de Buenos Aires².

La diabetes materna afecta el desarrollo del pulmón fetal. Estudios previos muestran el rol de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) en la regulación del metabolismo lipídico en distintos órganos fetales de rata diabética. La administración a la rata gestante de dietas ricas en ácidos grasos agonistas de PPAR indujo cambios en los niveles de lípidos en el pulmón fetal. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la activación *in vivo* de los receptores PPAR sobre enzimas del metabolismo y transportadores de lípidos y sobre el perfil de ácidos grasos en el pulmón de fetos de ratas sanas (C) y diabéticas (D). **Métodos:** La diabetes se indujo por administración neonatal de estreptozotocina (90 mg/kg). El efecto de los agonistas de PPAR fue evaluado mediante tratamiento dietario a ratas C y D durante la gestación con alimento suplementado con: 6% de aceite de oliva (AO) rico en ácido oleico, o con 6% aceite de cártamo (AC) rico en ácido linoleico, ambos agonistas de PPAR. Se evaluó en el pulmón de fetos machos y hembras de 21 días de preñez la expresión de sintasa de ácidos grasos (FAS), transportador de ácidos grasos (FAT) y ATP-binding cassette A1 (ABCA1), por RT-PCR y se analizó la composición de ácidos grasos (CG). **Resultados:** en pulmones de fetos hembra y no de fetos macho del grupo D, el tratamiento dietario a la rata gestante con AO, aumentó la expresión de FAS (43%, $p < 0.05$), mientras que la suplementación con AC incrementó la expresión de FAT (24%, $p < 0.01$). Ambos tratamientos dietarios disminuyeron la expresión de ABCA1 en los pulmones de fetos hembra del grupo D (AO: 20%, AC: 34% $p < 0.05$). En los pulmones fetales del grupo C y D, las dietas enriquecidas con AO y AC incrementaron la proporción de ácidos grasos polinsaturados ($p < 0.01$). **Conclusiones:** Los PPAR tienen la capacidad de modular la composición de las especies lipídicas del pulmón fetal y de regular proteínas relevantes en la homeostasis lipídica en forma género dependiente.

527. (182) ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PÉRDIDA FETAL TEMPRANA EN RATAS INDUCIDA POR TOXINA SHIGA-2 (STX2)

Sacerdoti F.¹; Cymeryng C.²; Franchi A.³; Ibarra C.¹
Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; LEM, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET, Buenos Aires, Argentina³.

El crecimiento intrauterino está controlado por una compleja comunicación de factores maternos y fetales. Previamente hemos demostrado alteraciones en la preñez en ratas inyectadas intraperitonealmente (i.p) con dosis subletales de Stx2 en estado temprano de gestación. En el presente trabajo nos proponemos estudiar los mecanismos que conducen a la pérdida fetal. Para ello se inyectaron ratas SD i.p con 0,5 ng Stx2/g de peso corporal. El grupo control se inyectó con PBS 1X (n=4). Las ratas se sacrificaron a las 6 hs post-inyección y Stx2 se localizó en los tejidos útero-placentarios por IHQ. Para evaluar los efectos sobre la macrovasculatura uterina, las ratas se sacrificaron a los 4 días post inyección y los vasos uterinos se ligaron para evitar la pérdida del contenido sanguíneo. Los úteros se aislaron y los vasos se estudiaron por análisis de imágenes con el programa Image Pro Plus. Para analizar un posible desbalance hormonal se determinaron los niveles de progesterona plasmática (P4) a los 4 y 6 días post-inyección, por RIA. Finalmente, para evaluar el estado inflamatorio se midió TNF- α sistémico a las 2 hs post-inyección, por ELISA. Los resultados muestran que Stx2 se localiza en la microvasculatura uterina y en la decidua, aunque no se observaron alteraciones macroscópicas en la longitud transversal de la arteria uterina. Sin embargo, se detectó una significativa disminución del tamaño de los sitios de implantación con respecto a los controles (21%, $p < 0,05$, $n = 47$) que se correlaciona con los daños observados por microscopía óptica. Además, la concentración de P4 disminuyó en las ratas experimentales con respecto a los controles (66 ± 16 vs 178 ± 34 ng/ml, $p < 0,05$, $n=4$) y el TNF- α se mantuvo constante a los tiempos medidos. Estos resultados sugieren una acción directa de Stx2 en los sitios de implantación que conduciría a la restricción del crecimiento fetal.

528. (187) ROL DE WNT7A EN LA FALLA DE LA IMPLANTACIÓN ASOCIADA A PERTURBADORES ENDOCRINOS

Ingaramo P.; Guerrero Schimpf M.; Milesi M.; Ramos J.; Vigezzi L.; Muñoz-De-Toro M.; Luque E.; Varayoud J.
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

La molécula de señalización Wnt7a es crítica para el desarrollo y diferenciación del conducto mülleriano y de las glándulas endometriales que son esenciales para la normal funcionalidad uterina. En estudios previos demostramos que la exposición postnatal a Dietilstilbestrol (DES) y Endosulfán (END), provoca subfertilidad evidenciada por un menor número de sitios de implantación. Nos propusimos describir la ontogenia de la expresión uterina de Wnt7a, e investigar si la falla en la implantación en ratas tratadas postnatalmente con DES y END, coincide con cambios en la expresión uterina de Wnt7a. Utilizamos ratas Wistar intactas de 1, 8, 21 y 35 días de edad y ratas en día 5 de preñez, previamente tratadas (días 1, 3, 5 y 7 postnatales, DPN) por vía subcutánea con: aceite, grupo control (C), DES (0,2ug/Kg peso corporal, p.c./día) y END (600ug/kg p.c./día). Evaluamos por inmunohistoquímica la expresión uterina de Wnt7a en epitelio luminal (EL), epitelio glandular (EG) y estroma subepitelial (ES). En ambos epitelios los resultados fueron expresados en porcentaje de células positivas y en estroma como densidad de volumen. En DPN1 y 8 se observa intensa marcación y alta densidad nuclear en ES, e intensa marcación nuclear y citoplasmática en EL. En DPN21 y 35 disminuye la marcación en todos los compartimientos y la densidad de núcleos marcados en ES. La exposición postnatal a DES y END disminuyó la expresión de Wnt7a en el día 5 de

preñez, tanto en los compartimientos epiteliales (EL: C: $91,6 \pm 2,0$; DES: $79,0 \pm 1,2$ y END: $69,0 \pm 0,7$; EG: C: $96,3 \pm 0,8$, DES: $86,3 \pm 1,7$ y END: $68,7 \pm 1,5$) como en estroma subepitelial (ES: C: $27,2 \pm 0,9$; DES: $8,3 \pm 0,4$ y END: $10,1 \pm 1,2$). Debido a que Wnt7a juega un rol crítico durante la implantación del embrión, proponemos que la disminución de esta molécula en el útero en día 5 de preñez podría explicar, al menos en parte, la subfertilidad provocada por la exposición postnatal a DES y END.

529. (252) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA FIBRONECTINA/INTEGRINA EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA INDUCIDA POR ANANDAMIDA (AEA) EN BOVINOS

Osycka-Salut C.¹; Gervasi M.¹; Burdet J.¹; Díaz S.²; Martínez S.¹

Laboratorio de Biología de la Reproducción en Mamíferos, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET, Buenos Aires, Argentina¹; Laboratorio Biología de La Reproducción, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile².

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la AEA, principal endocannabinoide, induce la capacitación espermática en bovinos vía los receptores CB1 y TRPV1. La fibronectina (Fn) es una glicoproteína de la matriz extracelular, y se sabe que durante la capacitación se producen cambios en la exposición de integrinas ($\alpha 5 \beta 1$) que unen Fn en los ESP. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de Fn sobre la capacitación espermática y evaluar la interacción con el sistema endocannabinoide en este proceso. Para ello, se realizaron experimentos de capacitación *in vitro* de ESP bovinos criopreservados en presencia de Fn. La evaluación de la capacitación se realizó mediante las técnicas de CTC y de inducción de la reacción acrosomal por LPC. En ambos casos, la incubación de los ESP con la glicoproteína incrementó el porcentaje de ESP con patrón capacitado al igual que AEA ($p < 0,05$). La presencia de antagonistas de CB1 y TRPV1 en el medio inhibió el efecto capacitante de Fn ($p < 0,05$). Al analizar la actividad de la enzima FAAH (que degrada AEA) en ESP capacitados con Fn, mediante la técnica de radioconversión, se observó una disminución de la actividad de la enzima a los 15min de incubación ($p < 0,05$). A su vez, la localización de $\alpha 5 \beta 1$ espermática es similar a la descripta para TRPV1. Como la capacitación espermática es una de las causas de la liberación de los ESP de las células epiteliales oviductales (CEO), se realizaron co-cultivos de ESP-CEO en presencia de Fn. La Fn indujo la liberación de los ESP de las CEO al igual que la AEA ($p < 0,05$) y la presencia de antagonistas de CB1 y TRPV1 revertió dicho efecto. Por último, los ESP liberados con Fn presentaron una población mayor de ESP con motilidad progresiva y con patrón capacitado respecto al control ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos sugieren que Fn induce eventos asociados a la capacitación espermática promoviendo la liberación de los ESP de las CEO a través de la activación del sistema endocannabinoide en ESP bovinos.

530. (254) EL ÓXIDO NÍTRICO INDUCE APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES DEL TESTÍCULO ACTIVANDO LA VÍA MITOCONDRIAL

Bañuelos C.¹; Fass M.^{1,2}; Jarazo Dietrich S.¹; Lustig L.¹; Theas M.¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas¹; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires².

Para estudiar los mecanismos involucrados en la apoptosis de las células germinales (CG) en respuesta a la inflamación testicular desarrollamos un modelo de orquitis autoinmune experimental (OAE) crónica en la rata. Previamente demostramos, mediante experimentos de co-cultivo, que el bloqueo de la enzima de síntesis del óxido nítrico (ON) en los macrófagos intersticiales provenientes del testículo (T) de ratas con OAE previene la apoptosis de las CG. El objetivo de este trabajo fue estudiar las vías involucradas en el fenómeno de apoptosis de las CG inducido por el ON. Fragmentos de T (FT) de ratas normales fueron incubados en medio DMEM-F12 conteniendo o no un dador de ON, el DETA-Nonoato (D-NO, 2mM) en ausencia o presencia de un antioxidante la N-Acetil-L-

cisteína (NAC, 2.5mM), durante 18h. El D-NO indujo un aumento del% de túbulos seminíferos (TS) con CG apoptóticas (TUNEL) y la NAC previno dicho efecto (media±ESM, medio: 17.10±4.49%, D-NO: 38.36±3.46*, D-NO+NAC: 14.42±2.44^, NAC: 12.68±3.18, *p<0.001 vs medio; ^p<0.01 vs D-NO). El D-NO aumentó el contenido del citocromo c en el citosol (Western blot, Wb, p<0.05), el del fragmento de 37kDa de la caspasa 9 generado durante el proceso de activación (Wb, p<0.05) y su actividad enzimática (kit colorimétrico, media±ESM,% absorbancia vs medio, medio: 100.00±6.48, D-NO: 131.98±4.59, p<0.05). La NAC no impidió la salida del citocromo c al citosol y el clivaje de la caspasa 9. El balance del contenido de las proteínas pro (Bax) y anti-apoptótica (Bcl-2) de la familia de Bcl-2, en la mitocondria, fue similar en los FT incubados en presencia y ausencia de D-NO (p>0.05). En conclusión, demostramos que el ON induce apoptosis de las CG del testículo activando la vía mitocondrial y que este efecto es mediado por el estrés oxidativo. Dado que la NAC no previno la salida del citocromo c ni el procesamiento de la caspasa 9, especulamos que el efecto anti-apoptótico de la misma opera en un paso posterior de esta vía de señalización.

531. (267) EXPRESION ABERRANTE DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC) EN ESPERMATOZOIDES (ESPS) DE PACIENTES ASTENOSPERMICOS

Burdet J.¹; Osycka-Salut C.¹; Arenas G.²; Furlan M.³; Mendeluk G.³; Rey Valzacchi G.²; Pérez Martínez S.¹
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET¹; Centro de Reproducción Asistida PROCREAR-TE²; Laboratorio de Fertilidad Masculina, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

La desregulación del SEC podría estar involucrada en la astenospermia, una de las principales causas de la infertilidad masculina. La anandamida (AEA) es el principal EC que ejerce su efecto a través de los receptores CB1, CB2 y TRPV1. La síntesis de AEA es catalizada por la enzima NAPE-PLD y su degradación a través de la FAAH. Se sabe que los hombres infértiles tienen menor concentración de AEA en el plasma seminal que los hombres fértiles. En ratones faah^{-/-}, se observó un aumento de los niveles de AEA en el tracto reproductor, junto con una disminución de la movilidad espermática y de su capacidad fecundante. Nuestro objetivo fue caracterizar al SEC en ESPs de pacientes astenospermicos y evaluar su rol en la funcionalidad espermática. Se utilizaron, bajo consentimiento informado, ESPs de donantes normospermicos (N) y ESPs de pacientes con astenospermia idiopática (A) seleccionados por lana de vidrio. Por medio de estudios de Western blot observamos que los ESPs N y A no poseen diferencias en el% de ESP que expresan CB1, NAPE-PLD y FAAH. CB1 y NAPE-PLD presentaron la misma inmunolocalización, sin embargo la FAAH se localizó en la región post-acrosomal y pieza media de la cola en N, mientras que en A la localización varió entre la región post-acrosomal, acrosomal, pieza media y pieza principal de la cola. Además, los ESPs de A presentaron una menor actividad de FAAH con respecto N (p<0,05). El análisis de TRPV1 mostró una disminución de la expresión y de la inmunomarcación en A (p<0,05; p<0,001). Por otro lado, los ESPs de normospermicos fueron incubados con capsazepina (CZP, antagonista de TRPV1) y se determinó la movilidad por medio del sistema CASA. CZP produjo una disminución significativa de la movilidad de N (p<0,05) y la co-incubación con capsaicina (agonista de TRPV1) no revirtió este efecto. Nuestros resultados sugieren que una aberración en el SEC podría tener implicancia en la falla de la movilidad espermática de los pacientes astenospermicos.

532. (268) TRATAMIENTOS DIETARIOS MATEROS ENRIQUECIDOS EN ACEITE DE OLIVA Y DE CÁRTAMO REGULAN VÍAS PRO-OXIDANTES EN HÍGADOS DE FETOS DE RATA DIABÉTICA

Martínez N.; Higa R.; Roberti S.; White V.; Jawerbaum A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

La gestación diabética presenta importantes alteraciones a nivel metabólico y oxidativo, que afectan el desarrollo fetal. Los PPARs son receptores nucleares involucrados en la regulación de procesos anti-oxidantes cuyos ligandos están presentes en aceites comestibles como el aceite de oliva (AO) y de cártamo (AC). El hígado fetal es un órgano blanco del estrés oxidativo materno y es un importante regulador del metabolismo energético. **Objetivos:** Evaluar el efecto de la administración de dietas enriquecidas en AO y AC a ratas gestantes sanas (C) y diabéticas (D), sobre la expresión de PPAR α y PPAR γ , la producción de NO y la lipoperoxidación en los hígados de fetos machos (M) y hembras (H) provenientes de dichas ratas. **Métodos:** A partir del día 1 de gestación ratas C y D fueron alimentadas con dieta estándar suplementada o no con 6% de AO (contiene 75% de ácido oleico) o 6% de AC (contiene 75% de ácido linoleico). Se obtuvieron los hígados fetales de dichas ratas en el día 21 de gestación. Se dosaron los niveles de nitratos/nitritos (metabolitos estables de NO, reacción de Griess), la lipoperoxidación (TBARS) y la expresión de PPAR α y PPAR γ (PCR). **Resultados:** La diabetes materna induce un incremento en la producción de NO y de lipoperóxidos en los hígados de fetos M y H (p<0.05), un aumento en la expresión de PPAR α (64% p<0.05) y una disminución de PPAR γ (30% p<0.05) en hígados fetales provenientes de estas ratas. Los tratamientos dietarios enriquecidos en AO y AC regulan los niveles de NO y de lipoperóxidos de manera genero dependiente, y reducen la expresión de PPAR α y PPAR γ en dicho órgano (p<0.05). **Conclusión:** La diabetes materna incrementa parámetros prooxidantes/proinflamatorios en el hígado fetal y dietas suplementadas con aceites ricos en ácidos grasos insaturados que activan PPARs, reducen la sobreproducción de NO y la lipoperoxidación, e inducen mecanismos de retroalimentación negativa sobre la expresión de estos receptores nucleares.

533. (276) EVALUACIÓN DE OFERTAS DIETARIAS VARIABLES EN PUFAS N-6 Y N-3 SOBRE LA FISIOLÓGIA REPRODUCTIVA DE RATONES MACHOS

Bianconi S.; Mari M.; Solís R.; Santillán M.; Stutz G.
Cátedra e Instituto de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

La cantidad y calidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la membrana espermática reflejan el consumo dietario. Eventos críticos de la fisiología espermática, tales como la maduración, motilidad, reacción acrosomal y acción fusogénica, dependen en gran medida de la composición lipídica de la membrana. En el presente estudio exploramos la influencia de diferentes niveles y relaciones de PUFAs n-6 y n-3 sobre diversos parámetros funcionales de espermatozoides epididimarios de ratones *Albino swiss*. Se emplearon cuatro tratamientos dietarios en ratones hembra durante gestación-lactancia y en sus crías machos desde destete a adultez: **D** (deficiente en n-3; dieta purificada; 7% aceite de girasol; PUFAs:3,48%; n-3:0%; n-6/n-3:0; n=19), **A** (adecuada en n-3; dieta purificada; 7% aceite de soja; PUFAs:3,85%; n-3:0,57%; n-6/n-3:5,7; n=15), **E** (excesiva en n-3; dieta purificada; 7% aceite mezcla: hígado de bacalao 60%+soja 40%; PUFAs:3%; n-3:1,25%; n-6/n-3:1,29; n=15) y **C** (control; alimento balanceado comercial; PUFAs:1,67%; n-3:0,08%; n-6/n-3:19,88; n=15); n= número de animales. Se evaluó: peso corporal; concentración, motilidad y formas inmaduras (acodadas y con gota citoplasmática) en cámara de Makler; vitalidad (coloración supravital H258); prueba de resistencia osmótica y reacción acrosomal espontánea (doble tinción con FITC-PSA+H258). Estadística: ANOVA y LSD Fisher *a posteriori*. El porcentaje de gametas con gota citoplasmática fue superior en **C** vs **D**, **A** y **E** (p<0,05), al igual que el total de formas inmaduras (25,47±3,49%; 15,92±1,97%; 14,87±2,26%; 17,03±2,83%; p<0,05). Si bien se detectaron diferencias en el resto de los parámetros evaluados, estas no alcanzaron significación estadística. El menor aporte de PUFAs dietario, así como la elevada relación n-6/n-3, incrementa el porcentaje de formas inmaduras a expensas de un aumento en el porcentaje de gametas con gota citoplasmática. Estudios posteriores permitirán esclarecer los niveles de PUFAs y la relación n-6/n-3 que optimicen la calidad espermática y la fertilidad.

534. (321) INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO ENDOMETRIAL IN-VITRO POR PARTE DE COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL EVALUADOS COMO NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA LA ENDOMETRIOSIS

Ferella L.¹; Baston J.¹; Olivares C.¹; Vojnov A.²; Meresman G.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Instituto de Ciencia y Tecnología "César Milstein"-CONICET².

La endometriosis (EDT) se caracteriza por el crecimiento de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, afectando alrededor del 10% de la población femenina. Debido a la cuestionada eficiencia y a la alta tasa de recidivas observada luego de los tratamientos habituales, se están investigando alternativas terapéuticas que puedan administrarse por plazos prolongados y que a su vez no comprometan el bienestar de la paciente. En base a antecedentes satisfactorios reportados en la investigación del cáncer, se propone evaluar *in-vitro* la acción del flavonoide wogonina (WG) aislado de la raíz *Scutellaria baicalensis*, componente principal de la medicina herbal china, además de dos compuestos activos del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*): ácido carnósico (AC) y ácido rosmarínico (AR) y de la hormona $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 (VD3). Hemos observado que el agregado de WG 40, 80 y 160 μ M, AC 10, 12.5 y 25 μ g/ml y AR 25, 50 y 100 μ g/ml a una línea celular estromal endometrial humana (T-HESC) por 24 hs inhibió significativamente la proliferación celular evaluada por el ensayo de MTS ($p < 0.001$, $p < 0.05$ y $p < 0.05$ para WG, AC y AR respect). Asimismo el estímulo con VD3 0.1, 05 y 1 μ M por 48 hs indujo una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación de T-HESC ($p < 0.0001$). Los ensayos con cultivos primarios de células endometriales provenientes de pacientes reprodujeron los resultados observados en la línea celular ($p < 0.05$ en todos los casos). Además, resultados preliminares advierten acerca de una inducción de la apoptosis por parte de AC, AR y WG en las células T-HESC. A partir de nuestros resultados y conociendo que los compuestos naturales evaluados no provocan efectos secundarios indeseados, sugerimos considerar estas alternativas como terapéuticas promisorias para la EDT. Para sustentar estos resultados, estamos encarando ensayos en roedores con endometriosis inducida experimentalmente y estudios para investigar las vías de acción de estos compuestos.

535. (413) INTERRELACIÓN ENTRE LA VÍA DEL CAMP Y EL ESTRADIOL EN LA EXPRESIÓN DE LEPTINA PLACENTARIA

Schanton M.¹; Toro A.¹; Maymo J.¹; Pérez-Pérez A.²; Gambino Y.¹; Maskin B.³; Sánchez Margalet V.³; Varone C.¹

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España²; Hospital Nacional "Profesor Alejandro Posadas", Buenos Aires, Argentina³.

La leptina es una hormona y citoquina placentaria capaz de regular la proliferación, apoptosis e inmunomodulación durante el embarazo. En etapas tempranas tendría efectos sobre la implantación y el desarrollo embrionario. Uno de nuestros objetivos es estudiar cómo se regula su expresión en células trofoblásticas. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que el estradiol (E_2) regula la expresión de leptina placentaria a nivel transcripcional, a través de receptores de estrógenos nucleares y de membrana por mecanismos clásico genómico y también por la activación de quinasas. Por otro lado hemos determinado que el AMPc induce la transcripción de leptina por distintas vías. Un análisis *in silico* del promotor del gen LEP mostró posibles sitios de unión de CREB en la región promotora de leptina responsable del efecto ejercido por el estradiol. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de la activación de la vía de cAMP en la expresión de leptina placentaria regulada por E_2 , empleando células BeWo como modelo experimental. Hemos observado mediante transfecciones transitorias, que la expresión de las mutantes dominantes negativas CREBM que presenta una sustitución serina 133 por

alanina no pudiendo ser fosforilada en esta posición y CREBK incapaz de unirse al DNA, disminuyeron la actividad del promotor del gen LEP inducida por E_2 . Además CREB regularía la expresión basal de leptina. Este efecto podría deberse a su interacción con un elemento CRE localizado en la región promotora comprendida entre -1951 y -1546 pb, responsable del efecto del E_2 . Por otro lado la sobreexpresión de CBP (proteína de unión a CREB con función de acetiltransferasa) produce una disminución en el efecto de estradiol sobre la expresión de leptina. En conjunto, estos resultados proveen nuevas evidencias acerca de los mecanismos por los cuales el E_2 regula la expresión de la leptina placentaria. Futuros ensayos permitirán estudiar en detalle los complejos proteicos formados entre en el promotor de leptina en respuesta a E_2 .

536. (469) ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE LA PROTEÍNA TESTICULAR CRISP2 PARA LA FERTILIDAD A TRAVÉS DEL EMPLEO DE RATONES KNOCKOUT

Brukman N.¹; Da Ros V.¹; Battistone M.¹; Ikawa M.²; Okabe M.²; Cuasnicú P.¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japón².

La proteína testicular CRISP2 (Cysteine-Rich Secretory Protein 2) se localiza en el acrosoma y la cola de los espermatozoides, y participa en el proceso de fusión de gametas a través de su unión a sitios complementarios en el oolema. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la relevancia de CRISP2 para la fertilidad. Para ello, se generaron animales knockout (KO) para el gen *crisp2*, tal como fuera confirmado por estudios de *Western blot* mostrando la ausencia de la proteína tanto en testículo como en espermatozoides. La fertilidad evaluada por apareo natural de machos KO con hembras control (heterocigotas, HT) durante 21 días no mostró diferencias en la tasa de preñez o número de crías respecto a los machos control. Sin embargo, cuando los apareos se realizaron por una noche utilizando machos KO y hembras control superovuladas, se observó una diferencia significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados del oviducto ($94,5 \pm 3,4$ vs. $18,6 \pm 11,4$; $n=5$; $p < 0,005$). Con el fin de investigar las posibles causas de los menores porcentajes de fertilización observados, diferentes parámetros funcionales de los espermatozoides del cauda epididimario fueron analizados en animales de ambos genotipos. Los resultados indicaron que el número, morfología, viabilidad y motilidad de los espermatozoides no presentaron diferencias entre los animales KO y HT. Sin embargo, mientras los niveles de fosforilación de proteínas en tirosina fueron similares en ambos grupos, los espermatozoides KO exhibieron una disminución significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de reacción acrosomal, evento clave para la ocurrencia de la fertilización. En conjunto, estos resultados apoyan la participación de CRISP2 en el proceso de fertilización y sugieren su posible relevancia para la fertilidad.

537. (488) ALTERACIONES EN EL METABOLISMO LIPÍDICO DE RATAS ADULTAS HIPERANDROGENIZADAS PRE-NATALMENTE

Heber M.; Vélez L.; Ferreira S.; Abruzzese G.; Motta A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

Desordenes metabólicos como dislipidemia, obesidad, insulino resistencia, diabetes de tipo 2 entre otros, están comúnmente asociados al Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), la etiología de este síndrome es desconocida sin embargo se postula que durante la gestación el feto es sometido a una hiperandrogenización prenatal (HA) provocando un ambiente uterino desfavorable y reprogramación fetal. Hemos demostrado previamente que la HA induce en ratas Sprague Dawley pre púberes y púberes una alteración del perfil lipídico y del balance oxidante -antioxidante. **Objetivo:** Analizar si las alteraciones observadas en etapas tempranas del desarrollo persisten en la vida adulta. 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 90 días de edad. **Resultados:** Los animales T2 (284,2±4.3g) presentaban un mayor peso con respecto al C (221,5±10,1g) $p<0,001$. El perfil lipídico en suero: colesterol total (CT), HDL y LDL colesterol y triglicéridos (TG) se cuantificó por kits de Winer lab. El CT del grupo T2 (108±13,7mg/dl) aumento con respecto al grupo C (50,1±7,6mg/dl) $p<0,001$, el HDL colesterol fue menor para el grupo T2 (T2: 41±1mg/dl vs. C: 44,1±1,2mg/dl, $p<0,001$). El LDL fue significativamente mayor para el grupo T2 (T2:65,4±15,1mg/dl vs. C: 10,4±2mg/dl; $p<0,001$) al igual que los TG (T2: 205±8,1mg/dl vs. C: 27±1,6mg/dl; $p<0,001$). La acumulación de lípidos en el ovario se cuantificó por tinción con Red Oil Stain mostrando en el grupo T2 un aumento del 45% en la grasa ovárica. La peroxidación lipídica (cuantificada por los valores de MDA) no varió entre los grupos. Los valores del metabolito antioxidante glutatión (GSH) fueron menores para el grupo T2 (C: 6±0,5 uM/mg proteína vs. T2:4,7±0,5uM/mg proteína; $p<0,001$). Concluimos que el metabolismo lipídico alterado está presente en la vida adulta y que la HA genera un estrés oxidativo sistémico.

538. (571) ROL DE LOS GLUCOCORTICOIDES (GC) EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA (COD): EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA 11 β -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA Y DEL RECEPTOR DE GC

Amweg A.; Rodríguez F.; Salvetti N.; Rey F.; Marelli B.; Ortega H.

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (IciVet-Litoral)-CONICET, Universidad Nacional del Litoral.

Los glucocorticoides (GC) desempeñan un rol fundamental en la fisiología normal y la respuesta al estrés a través de la unión a su receptor (GR). Además las enzimas 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (11 β HSD) 1 y 2, controlan la disponibilidad del cortisol en sus sitios de unión. Nuestro objetivo fue evaluar la expresión de 11 β HSD 1 y 2 y del GR en folículos ováricos de animales con COD. Se realizó la evaluación mediante PCR en Tiempo Real de las 11 β HSDs y del GR en células de la granulosa y de la teca de folículos terciarios pequeños (FP), medianos (FM), grandes (FG) en el grupo control (animales en proestro), y quísticos (FQ) en animales con COD; y mediante inmunohistoquímica indirecta se evaluó la expresión proteica en la pared de folículos primarios, secundarios, terciarios y atresicos en grupo control y, además, en FQ en animales con COD espontánea e inducida con ACTH. También se determinó la concentración de cortisol en líquido folicular. La expresión génica de 11 β HSD1 en la teca fue mayor en FQ que en FP ($p<0,05$). En ambas poblaciones celulares se detectó similar expresión génica del GR. La expresión proteica de 11 β HSD1 en células de la granulosa de quistes espontáneos y de folículos terciarios y quísticos de animales con COD inducida fue mayor que en folículos terciarios controles ($p<0,05$) y no hubo diferencias en la expresión de 11 β HSD2. En granulosa y teca de folículos terciarios y FQ de animales con COD espontánea se determinó una mayor expresión del GR que en folículos terciarios controles ($p<0,05$). Se encontró además una concentración mayor de cortisol folicular en animales con COD espontánea e inducida que en animales controles. El aumento de la expresión de 11 β HSD1 en los folículos quísticos podría asociarse con el incremento en la concentración de cortisol folicular en animales con COD que, conjuntamente al incremento de la expresión del GR, podría intervenir en el proceso inflamatorio asociado a la ovulación en animales con esta enfermedad.

539. (670) PARTICIPACIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF) EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA NITRÉRGICO EN PLACENTA HUMANA. ROL DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Abán C.¹; Leguizamón G.²; Cella M.¹; Ramil V.²; Franchi A.¹; Martínez N.¹; Farina M.¹

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; CEMIC, Buenos Aires².

El factor inducible por hipoxia (HIF) es un factor de transcripción que juega un papel importante en la fisiología de la placenta. En nuestro laboratorio recientemente demostramos que los endocannabinoides pueden regular la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en placenta humana. En el presente trabajo, estudiamos el efecto del HIF sobre la actividad de la NOS e investigamos la participación del sistema endocannabinoide. Para ello, se utilizaron fragmentos de vellosidades coriónicas obtenidas de placenta a término (38-40 semanas de gestación) provenientes de mujeres con embarazos sin complicaciones, luego de cesáreas electivas. Los explantos fueron incubados con medio solo, con AM251 (antagonista del receptor CB1), o cloruro de cobalto (CoCl₂, 100-250 μ M), un agente que estabiliza HIF provocando una hipoxia química. En primer lugar, se evaluó la expresión proteica de HIF luego de la incubación con CoCl₂, así como la viabilidad de los explantos (MTT, hCG) bajo las condiciones de cultivo. Además, observamos que el tratamiento de los explantos placentarios con CoCl₂ incrementa ($p<0,01$) la actividad de NOS. Por western blot detectamos que el incremento de HIF provocó una alteración en la expresión proteica de NAPE-PLD y FAAH, principales enzimas en las vías de síntesis y degradación de los endocannabinoides. Adicionalmente, detectamos que el efecto estimulador sobre la actividad de la NOS luego de la incubación con CoCl₂ ($p<0,001$), revirtió totalmente cuando los explantos fueron co-incubados con AM251. Demostramos que el incremento de HIF causa una desregulación de las enzimas NAPE-PLD y FAAH involucradas en la síntesis y degradación del sistema endocannabinoide, lo cual sugiere que, en condiciones de hipoxia, el tono de los endocannabinoides aumentaría en la placenta. Adicionalmente, demostramos que el aumento de HIF incrementa la actividad de la NOS y que los endocannabinoides estarían involucrados en dicho efecto.

540. (793) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DESCONDENSANTE IN VITRO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS Y SU RELACIÓN CON EL ÉXITO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Julianelli V.¹; Romanato M.¹; Rey Valzacchi G.^{2,3}; Rolando R.³; Rodríguez L.³; Arenas G.²; Calvo L.¹; Calvo J.^{1,4}

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; PROCREARTE² Servicios de Urología y Ginecología, Hospital Italiano De Buenos Aires, Buenos Aires. Argentina³; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁴.

La descondensación cromatínica del espermatozoide en el ooplasma es requisito para una fertilización exitosa y en el humano, ocurriría *in vivo* con la participación de glutatión (GSH) y heparán sulfato (HS) ovocitarios. Entre 10 y 15% de ovocitos no fertilizados en tratamientos de fertilización asistida (FA) contiene una cabeza de espermatozoide condensada en el ooplasma. Objetivo: Evaluar prospectivamente la capacidad descondensante *in vitro* de espermatozoides de pacientes infértiles y su relación con el éxito en FA. Metodología: Sujetos: parejas infértiles que llevaron a cabo procedimientos de FA, con ovocitos propios (OP) o donados (OD). Sobre la misma muestra de espermatozoides usada en ICSI se evaluó fragmentación del ADN espermático por TUNEL y % descondensación máxima (DM) y velocidad descondensación (D60/D30) *in vitro* con Heparina (análogo del HS) y GSH. Se analizó el éxito en FA a través de: % fertilización (F), tasa de clivaje (TC) y calidad embrionaria (SCORE) al día 3, tasa de embarazo clínico (E). Resultados: Se expresan como mediana y rango intercuartil. En la población completa (PC) (n=80) no hubo correlación entre parámetros espermáticos y de FA (Spearman, NS). Se evidenciaron dos poblaciones de pacientes: descondensadores rápidos (DR), D60/30<1,3; n=52) y lentos (DL) (>1,3; n=28). TUNEL y parámetros de FA fueron similares en ambos grupos (Mann Whitney, NS). En PC, origen ovocitos no afectó E: 44% OP (n=47) vs 27% OD (n=33; Chi cuadrado; $p=0,29$). Al utilizar OP, E fue ligeramente menor en DL (17%, n=30; NS Fischer) que en DR (42%, n=16); al utilizar OD, fue mayor en DL (63%, n=19) que en DR (11%,

n=13; p=0,033). Conclusiones: La velocidad de descondensación espermática *in vitro* (D60/D30) afectaría diferencialmente el éxito en FA según se utilicen ovocitos propios o donados, efecto que recién se evidenciaría en el desarrollo embrionario posterior al día 3; su evaluación podría ser una medida del efecto paterno sobre la viabilidad embrionaria.

541. (820) ALTERACIONES EN LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL SINCICIOTROFOBLASTO MODIFICARÍAN LA EXPRESIÓN DE CANALES IÓNICOS Y TRANSPORTADORES EN PLACENTAS PREECLÁMPTICAS

Di Paola M.¹; Maskin B.²; Castro-Parodi M.¹; Damiano A.¹ *Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Hospital Nacional "Profesor Dr. Alejandro Posadas" Buenos Aires².*

En placentas pre-eclámpticas (PE) se han informado numerosas alteraciones en la expresión y funcionalidad de varios canales iónicos y transportadores. Previamente observamos variaciones en la expresión y funcionalidad de AQP9 y CFTR en la membrana apical de sinciciotrofoblasto (STH) de PE. Hasta el momento, poco se sabe la causa de estas alteraciones. Nuestra hipótesis es que cambios en la composición de la membrana plasmática del STH sobre todo en los dominios de membrana ricos en caveolas podrían ser responsables de esto. Nuestro objetivo fue estudiar la composición lipídica del STH en términos de fluidez de placenta normal (PN) y PE. Se prepararon Vesículas de membrana apicales (MVM) y basales (MB) por centrifugación diferencial. Los lípidos se extrajeron por el método de Bligh-Dyer y se separaron por cromatografía en capa fina (TLC). Se cuantificaron por Fiske-Subarow. Se determinó la fluidez de membrana del STH por resonancia paramagnética electrónica (EPR). El colesterol se cuantificó por un método enzimático. Por doble inmunofluorescencia se co-localizaron AQP9, CFTR y Caveolina-1 (marcador de caveolas). Encontramos que en MVM de PE la concentración de esfingomielina fue 1,5 veces mayor que en PN y no observamos diferencias en las MB. Tampoco hallamos cambios en el contenido de colesterol. La relación PC/SM (fosfatidilcolina/esfingomielina) disminuyó significativamente ($0,659 \pm 0,07$ vs $1,037 \pm 0,051$) en las MVM de PE con respecto a las PN y los ensayos de EPR arrojaron un aumento en 1,15 veces del parámetro de orden S. Estos resultados reflejan una disminución de la fluidez de la membrana. Además observamos una pérdida de la co-localización de AQP9 y CFTR con Caveolina-1 en PE. Estos hallazgos sugieren que estos cambios crearían un ambiente desfavorable para la inserción y/o el adecuado funcionamiento de estos canales y transportadores en PE. Más estudios serán necesarios para definir el rol de los lípidos de membrana en la fisiopatología de la Preeclampsia.

542. (830) REGULACIÓN CENTRAL DE LA ANGIOGENESIS OVÁRICA POR ALLOPREGNANOLONA

Laconi M.¹; Cabrera R.¹; Parborell F.² *Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, CCT Mendoza¹; Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET².*

Allopregnanolona (ALL) es un neuroesteroide con efectos en la biología reproductiva de la hembra. Antes demostramos que ALL inhibió la ovulación, la LH, aumentó la Pg y PRL e inhibió la apoptosis en los cuerpos lúteos. La angiogénesis (proceso de formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes, se desarrolla cíclicamente en ovario y es vital para la formación de las estructuras reproductivas en la ovulación y formación del cuerpo lúteo. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de ALL 6µM en la morfofisiología ovárica y el desarrollo vascular del estroma durante un ciclo estral. Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley, canuladas en el ventrículo lateral; el día del proestro se administraron vehículo y ALL (1 µl icv). Se colectó la sangre troncal para medir LH, estrógenos y progesterona por RIA. Por IHQ, se evaluó por un lado el desarrollo vascular ovárico mediante la detección del factor Von Willebrand (marcador

de células endoteliales) y por otro lado, se evaluó la estabilidad vascular mediante la detección de alfa actina (marcador de células de músculo liso). El otro ovario se fijó en formalina 10%, se realizaron cortes histológicos para tinción con H&E para el recuento de estructuras ováricas. Los resultados mostraron que 24hs post tratamiento aumentó el número de folículos atrésicos y disminuyó el número de folículos de Graaf y cuerpos lúteos con aparición de estructuras quísticas (LUF folículos luteinizados no ovulados) en el grupo con ALL respecto a los controles (p<0,01). Luego de 96 hs post tratamiento no se observaron LUFs. ALL causó un aumento en el área como en la estabilidad vascular a las 24 hs comparado al control (p< 0,01). Además, a las 96 hs. postratamiento aumentó la estabilidad vascular respecto al control (p< 0,05). Concluimos que ALL alteró la foliculogénesis y que la alta angiogénesis provocaría la formación de quistes. Las alteraciones en la neuroesteroidogénesis central por ALL tendrían un rol supresor sobre el desarrollo y funcionamiento de las estructuras ováricas.

543. (835) EXPRESIÓN DE MARCADORES AUTOFÁGICOS Y APOPTÓTICOS DURANTE LA REGRESIÓN TESTICULAR EN LAGOSTOMUS MAXIMUS, VIZCACHA

Isla M.; González C.; Vitullo A. *Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides.*

Mientras que varios estudios han destacado la importancia de la apoptosis en la regresión testicular, la contribución de la autofagia a este proceso ha sido escasamente estudiada. El objetivo de este trabajo fue analizar en *Lagostomus maximus* (LM), un modelo natural de involución testicular, la expresión de marcadores autofágicos (Beclin 1, ATG7 y LC3) y marcadores pro-(BAX, MCL-1 corto) y anti-(BCL2, MCL-1 largo y BCL-X largo) apoptóticos en testículos adultos funcionales (n=10) y regresionados (n=8) mediante Real Time PCR. Se realizó, además, la técnica de TUNEL para detectar apoptosis, cuantificando el número de células positivas/túbulo (+/t) y el número total de células + en el caso de las células de Leydig. Para semi-cuantificar el proceso de autofagia se estudió mediante Western Blot la relación LC3II/LC3I, indicadora de la formación de autofagosomas. La expresión de ARNm de MCL-1c fue significativamente mayor en testículos regresionados respecto a testículos funcionales (p<0.05) y BCL-XL disminuyó significativamente en la regresión testicular (p<0.05). No se observaron cambios en la expresión de BAX, BCL2 y MCL-1L. Los testículos funcionales presentaron aproximadamente un 45% de células de Sertoli TUNEL+/t y un 50% de células de Leydig apoptóticas, mientras que durante la regresión testicular este porcentaje fue de 15 y 20%, respectivamente. En ambos casos, el porcentaje de células germinales +/t fue menor al 15%. En cuanto a la autofagia, la expresión de ARNm de BCN1, ATG7 y LC3 disminuyó significativamente en los testículos regresionados respecto a los funcionales (p<0.05). Consistentemente, se observó una disminución de la relación LC3II/I en este último grupo. Estos resultados sugieren que la regresión testicular estaría asociada a una disminución de la autofagia debido a los bajos niveles de expresión de BCN1, ATG7 y LC3 que actuarían como una vía de sobrevida antes que de muerte celular.

544. (77) NIVELES ELEVADOS DE ANTI-P2β Y MENOR GRADO DE AFECCIÓN CARDIACA EN PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA EN TRATAMIENTO CON β1 BLOQUEANTES

Vicco M.¹; Bontempi I.¹; Rodeles L.²; Yodice A.²; Marcipar I.¹; Bottasso O.³ *Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Servicio de Clínica Médica, Hospital "J. B. Iturraspe"²; Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario³.*

Antecedentes: El auto-anticuerpo anti-p2β en la enfermedad de Chagas reacciona en forma cruzada con el receptor adrenérgico β1 (β1-AR) jugando un rol importante en el desarrollo de la

miocardiopatía chagásica (MCPC). Estudios in vitro demostraron que esta unión entre anti-p2 β y β 1-AR es interrumpida por β 1-bloqueantes (β B). En paralelo, ensayos clínicos han concluido que el tratamiento con β B mejoraría el pronóstico de pacientes con MCPC. Por lo antes expuesto, evaluamos en pacientes con MCPC si el tratamiento con β B se asociaba con variaciones del nivel de anti-p2 β así como también con la severidad de MCPC. Material y Métodos: Realizamos un estudio transversal en 80 pacientes con serología positiva para T. cruzi. A todos los pacientes se les realizó valoración clínica completa. Se analizaron los niveles séricos de anti-p2 β , anti-FRA y anti-homogenato de T. cruzi. Se categorizó a las personas acorde a la clasificación de MCPC de Storino, y acorde al tratamiento con β B. El estudio recibió aval ético. Resultados: Todos los pacientes presentaron valores detectables de auto-anticuerpos. No hubo asociación entre los niveles de auto-anticuerpos con el estadio de MCPC. Anormalidades de conducción de ECG y alteraciones ecocardiográficas. Sin embargo, cuando los pacientes fueron estudiados acorde al tratamiento con β B, aquellos con β B presentaron mayor nivel de anti-p2 β ($p < 0.001$). Pacientes con MCPC estadio III bajo tratamiento combinado con enalapril, β B y estatinas presentaron menor afección cardíaca valorada por ecocardiograma, y menor riesgo de mortalidad en comparación con pacientes del mismo estadio pero sin tratamiento ($p < 0.05$). Conclusión: Nuestros resultados sugieren que β 1 bloqueantes modificarían los niveles de anti-p2 β , y que el tratamiento combinado en pacientes con MCPC III se asociaría con menor grado de afección cardíaca y riesgo de mortalidad.

INFECTOLOGÍA, INFLAMACIÓN, INMUNOLOGÍA 3

545. (169) EFECTO DE COMPUESTOS ANTI-INFLAMATORIOS SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL FC γ RI INDUCIDA POR IFN γ EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

Vulcano M.; Diez R.
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno claves en el control de la respuesta inmune. Las DCs inmaduras capturan antígenos en los tejidos periféricos, los degradan en péptidos y los cargan sobre moléculas MHC de clase I y II para luego migrar hacia los ganglios linfáticos donde interactúan con los linfocitos mediante la presentación antigénica. Las DCs usan distintos receptores para la internalización y presentación del Ag, entre ellos los Fc γ Rs. En estudios previos, observamos que las DCs, diferenciadas a partir de monocitos cultivados durante 6 días en presencia de IL-4+GM-CSF, presentan bajos o nulos niveles de Fc γ RI (0.4 \pm 0.1), altos niveles de Fc γ RII (87.2 \pm 7.4) y valores variables de Fc γ RIII (48.5 \pm 27.5), (media \pm SD%DCs⁺; n=10). El tratamiento de las DCs con IFN γ durante 18 h induce la expresión del Fc γ RI (40.2 \pm 6.9; $p < 0.001$; n=12) y no modifica la expresión basal de los Fc γ RII y Fc γ RIII. El objetivo del estudio se basó en investigar los efectos regulatorios de compuestos anti-inflamatorios, como la dexametasona (Dex), la vitamina D3 (VD3) y el TGF- β sobre la expresión del Fc γ RI inducida por IFN γ en DCs. Se observó que la expresión del Fc γ RI se incrementa cuando las DCs se tratan simultáneamente con IFN+DEX (83.4 \pm 7.8; $p < 0.001$; n=8) o con IFN+VD3 (65.7 \pm 6.1; $p < 0.01$; n=6). Por el contrario, el tratamiento con IFN+TGF- β no tuvo efecto. Para verificar si este aumento de la expresión del Fc γ RI se correlacionaba con un incremento de la actividad fagocítica, se incubaron por 1 h DCs previamente tratadas con IFN y cada uno de los anti-inflamatorios, con IgG agregada conjugada con FITC (algG-FITC). Este análisis reveló un aumento significativo de la actividad fagocítica (media \pm SD%DCs⁺: 45.7 \pm 9.2; 30.8 \pm 7.1; 25.4 \pm 5.4; respecto a IFN 18.5 \pm 4.8; $p < 0.01$; n=3) tratadas con IFN+DEX; IFN+VD3 o IFN+TGF β , respectivamente. Teniendo en cuenta que los Fc γ Rs son moléculas efectoras involucradas en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias autoinmunes, estos resultados podrían identificar blancos para el eventual diseño de estrategias terapéuticas.

546. (231) DETECCIÓN DE LINFOCITOS T ESPECÍFICOS PARA BENZNIDAZOL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA CON REACCIONES ADVERSAS AL BENZNIDAZOL

Castro Eiro M.¹; Seigelshifer D.²; Álvarez M.²; Albareda M.¹; Natale M.¹; Viotti R.²; Laucella S.^{1,2}
Instituto Nacional de Parasitología "Dr. M. Fatała Chaberi"; Hospital Interzonal General de Agudos Eva Perón, Buenos Aires, Argentina².

La aparición de efectos adversos durante la administración de benznidazol es una limitación importante en el tratamiento para la enfermedad de Chagas. La alta prevalencia de dermatitis por hipersensibilidad sugiere que éstas podrían ser consecuencia de la estimulación de linfocitos T por la droga. En este estudio, evaluamos si los pacientes que desarrollan reacciones adversas al benznidazol presentan linfocitos T circulantes específicos para esta droga. Utilizamos ensayos de ELISPOT para medir interferón gamma (IFN- γ) y tinción por citometría de flujo para determinar el marcador de activación CD69 luego de la estimulación, in vitro, de células mononucleares periféricas (PBMC) con benznidazol. La viabilidad de linfocitos T en presencia de benznidazol se determinó mediante tinción 7 aminoactinomicina D por citometría de flujo, luego del cultivo de PBMC con distintas concentraciones de benznidazol o su vehículo dimetilsulfóxido y por diferentes períodos de tiempo. No se observaron diferencias en la viabilidad de linfocitos T CD4⁺ en un rango entre 100 μ g/ml y 400 μ g/ml de benznidazol, ya sea durante 20 hs o 40 hs cultivo. Sin embargo, la muerte celular aumenta a las 72hs, independientemente de la concentración de la droga. Posteriormente, realizamos ensayos de ELISPOT para IFN- γ estimulando PBMC provenientes de pacientes que presentaron dermatitis durante el tratamiento con benznidazol y de pacientes no tratados, con 2, 20 y 40 μ g/ml de benznidazol durante 40hs. En los pacientes que presentaron dermatitis fue posible identificar células productoras de IFN- γ ante el estímulo con benznidazol, mientras que en los pacientes no tratados no se detectaron células reactivas al benznidazol. Contrariamente, la expresión de CD69 no permitió discernir claramente la presencia de linfocitos T específicos para benznidazol. Estos resultados sustentan la existencia de mecanismos de hipersensibilidad retardada en la fisiopatología de las reacciones adversas al benznidazol.

547. (447) RESPUESTA INMUNOBOLÓGICA DEL SISTEMA INMUNE DE MUCOSA INTESTINAL FRENTE A UN ESTÍMULO DE ESTRÉS SONORO

Rojo J.; Zgajnar N.; Roux M.; Miranda S.
Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Prof. Dr. Alberto C. Taquini" (ININCA)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

Trabajos previos demostraron que un estímulo de estrés sonoro induce manifestaciones inflamatorias en útero e intestino en hembras CBA/J. Las vellosidades intestinales presentaron desorganización, ruptura, menor contenido celular en lámina propia e incrementada expresión de IL-17. En este trabajo analizamos: 1- la influencia de la cepa y del sexo sobre los daños intestinales y sobre el número de células caliciformes y 2- su persistencia. Además, profundizamos el estudio de los efectos inmediatos analizando: 3- la expresión de VCAM y CCL25 por inmunofluorescencia y microscopía confocal, 4- las variaciones en las poblaciones de LT por citometría de flujo y 5- la expresión de Rag-1/Rag-2 por dot y western blot. Se emplearon ratones CBA/J (H.2d), BALB/c y DBA/2 (ambos H-2k) de ambos sexos sin tratar (C) o sometidos a estrés (E) sacrificándolos a su término. Un grupo de hembras CBA/J fue sacrificado 3 semanas después. En cada caso, n=6. Todos los grupos, aunque en menor medida los machos CBA/J, mostraron alteraciones intestinales y aumento en el número de células caliciformes (C: 103,37 \pm 18.2 vs E: 156,7 \pm 10,14 $p < 0,004$). Los efectos deletéreos se mantuvieron 3 semanas post-estrés. Entre los efectos inmediatos, el estrés sonoro demostró aumentar la expresión de VCAM (E vs C: $p < 0.0013$) pero no de CCL25. Además, en células epiteliales intestinales aisladas se determinó incremento de células CD3+

(C: 54.0 ± 5.4 vs E: 69.2 ± 2.8 , $p < 0.05$) y de células CD3+CD8+ (C: 1.8 ± 0.1 vs E: 3.16 ± 0.5 , $p < 0.05$). Las proteínas Rag1 y Rag2 sólo se expresaban en el grupo E. Estas observaciones indican que las alteraciones histológicas inducidas por el estrés sonoro no revierten espontáneamente y sugieren que su magnitud estaría influenciada por una base genética y hormonal. El aumento de la población CD3+CD8+ junto con la expresión de Rag sugiere que el estrés sonoro induce diferenciación local de células T, confirmando la propiedad del intestino delgado de actuar como órgano linfóide primario.

548. (499) LA ADHESIÓN DE ESCHERICHIA COLI ENTEROAGREGATIVA A LAS CÉLULAS HEP-2 ESTÁ AFECTADA POR LA EXPRESIÓN DE RPOS

Almirón M.¹; Sanjuan N.²

IIB-Universidad Nacional de San Martín, CONICET¹; Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) es un patógeno asociado a diarreas persistentes cuya prueba de referencia para su diagnóstico es la forma de adhesión a las células HEp-2. El patrón característico es la adherencia agregativa en donde participan fimbrias ya caracterizadas y otras moléculas aún no identificadas. En estudios anteriores hemos demostrado que la proteína de membrana bacteriana OsmY altera el modo en que EAEC se asocia a las células Hep-2 aunque no modifica su capacidad de adhesión e invasión a las mismas. OsmY es una proteína que está regulada por múltiples factores incluyendo el de transcripción RpoS. El objetivo de este trabajo fue investigar si existen otros genes en EAEC regulados por RpoS que puedan afectar su interacción con las células eucarióticas. Para ello se construyó un mutante tomando la cepa prototipo, 17-2, a la que se le transfirió por transducción con el fago P1 la mutación *rpoS:Kan* de otra cepa de *Escherichia coli* y se evaluó su fenotipo y comportamiento en ensayos de infección a células Hep-2. El mutante 17-2*rpoS:kan* presenta un tamaño de célula menor y la deficiencia en la catalasa, características de los mutantes RpoS⁻. El fenotipo de agregación en cultivos líquidos bacterianos de la cepa patrón está conservado en el mutante. Los ensayos de infección a células Hep-2 se realizaron utilizando una m.o.i de 100 con cultivos de la cepa 17-2 y 17-2*rpoS* de 18hs de incubación y se efectuaron estudios cuali y cuantitativos de adhesión e invasión. La observación microscópica del patrón de adherencia a las células eucarióticas del mutante en relación a la cepa patrón fue semejante mientras que el porcentaje de células asociada a Hep-2 fue mucho menor ($44 \pm 11\%$). En tanto la invasión de ambas se mantuvo en niveles bajos (<0.1%) sin diferencias significativas entre ambas cepas. Se concluye que la expresión de genes dependiente de RpoS está involucrada en el mecanismo de adhesión de EAEC.

549. (542) INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA POR ALFA-TOXINA RECOMBINANTE DE CLOSTRIDIUM SEPTICUM

Guerra R.¹; Ortiz Flores R.²; Villa M.¹; Aguilera M.²; Gómez A.¹; Aguilar C.¹; Cortiñas T.¹; Colombo I.²

Área Microbiología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis¹; Instituto de Histología y Embriología Mendoza (IHEM)-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza².

Clostridium septicum es agente causal de la gangrena gaseosa mionecrótica. Produce la alfa-toxina, una toxina formadora de poro (PFT) de 46kDa, que es considerada el único factor letal. La autofagia es un mecanismo de defensa del sistema inmune innato que ha sido recientemente implicada en la respuesta a varias PFT. La perforación de la membrana por las PFT genera una disminución de la relación ATP/AMP que induce la vía de señalización autofágica. La proteína LC3 es un marcador de autofagia presente en células eucariotas que se encuentra tanto soluble (LC3-I) como asociada a los lípidos de membrana (LC3-II). El incremento de LC3-II se correlaciona con la presencia de autofagosoma. El objetivo de este trabajo fue establecer la capacidad de la alfa-toxina recombinante de *C. septicum* ATCC 12464 de inducir autofagia

en células eucariotas. Macrófagos peritoneales de ratón (M ϕ) y células ováricas de hámster chino (CHO) transfectadas estables que sobreexpresan GFP-LC3, fueron tratadas con alfa-toxina recombinante. La toxina fue clonada en un vector TOPRO-151 de *Escherichia coli*. Las células se incubaron en medio completo en presencia de 0,3-2 μ g/ml de alfa-toxina. La presencia de vesículas LC3-II positivas en células CHO fue observada por microscopía confocal y contraste de Hoesch en Mowiol para la detección de apoptosis. En M ϕ las vesículas autofágicas fueron visualizadas con naranja de acridina. La expresión de los marcadores de autofagia se determinó además por Western Blot. La toxina indujo una respuesta de autofagia dosis dependiente, que fue detectada por el aumento de estructuras vesiculares LC3-II positivas. En M ϕ , las vesículas autofágicas LC3 II positivas se visualizaron a las 24-48h mientras que en células CHO se observaron a las 4-24h de tratamiento, además se determinó la presencia de núcleos apoptóticos. Este trabajo constituye el primer informe donde se demuestra que la alfa-toxina de *C. septicum* es capaz de inducir autofagia en células de mamíferos.

550. (563) CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR CLOSTRIDIUM CHAUVOEI

Cáceres C.; Guerra R.; Villa M.; Cortiñas T.

Área Microbiología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis.

Clostridium chauvoei es agente causal de la mancha enfermada mortal que afecta principalmente al ganado bovino y ovino en todo el mundo. Los síntomas son fiebre generalizada e inflamación del tejido infectado. En el establecimiento de las enfermedades inflamatorias participan varios mediadores, entre ellos, las interleucinas pro-inflamatorias y en el control de la inflamación interleucinas con funciones antiinflamatoria. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *C. chauvoei* de inducir la expresión de las interleucinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α y antiinflamatorias IL-4 e IL 10 en macrófagos peritoneales de ratón (M ϕ). Se emplearon 1×10^6 M ϕ /pocillo co-cultivados con células de *C. chauvoei* a diferentes multiplicidades de infección (MDI): 3:1, 10:1 y 20:1 y diferentes tiempos de incubación: 5, 12 y 21 h. La expresión de las interleucinas fue obtenida mediante RT-PCR. Los productos de amplificación fueron semi-cuantificados mediante análisis de imagen y los resultados expresados como incremento o disminución relativa a M ϕ sin infectar (control). Los resultados demostraron que *C. chauvoei* induce un incremento de la expresión de TNF- α e IL-1 β 10 veces superior al control, mientras que IL-6 incrementó 3 veces su expresión a las 21h post-infección. De igual manera se observó que la expresión de IL-4 incrementó 5 veces con respecto al control a las 10 h. Por el contrario la expresión de IL-10 fue siempre inferior al control, siendo significativa ($p < 0.05$) la disminución a las 21 h post-infección. Los resultados indican que la infección por *C. chauvoei* no sólo induce un marcado incremento de interleucinas pro-inflamatorias sino que además inhibe la respuesta de IL-10, lo que explicaría la inflamación aguda en la mancha. A su vez la expresión temprana de IL-4 estaría asociada a una menor expresión de IL-6 y a la inducción de la expresión de una respuesta humoral tipo Th2 característica de este patógeno.

551. (593) LAS POBLACIONES DE TRYPANOSOMA CRUZI PRESENTES EN CIRCULACIÓN DIFIEREN DE AQUELLAS ENCONTRADAS EN EL CORAZÓN Y EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEL MISMO HUÉSPED DURANTE LA ETAPA AGUDA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Moya D.; Esteves B.; Bazán P.; Alejandra Lidia Báez; Strauss M.; Miler N.; Rivarola H.; Paglini P.; Lo Presti M. *Cátedra de Física Biomédica, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

La enfermedad de Chagas presenta una amplia gama de signos clínicos que podría explicarse por la heterogeneidad genética del parásito y un tropismo diferencial del mismo a los tejidos del huésped. En el presente trabajo se determinó la distribución de

las poblaciones de *T. cruzi* presentes en 3 aislamientos diferentes (Lucky, Casibla y SGO-Z12) en sangre, corazón y músculo esquelético (ME) de ratones albino suizos (n=60; cada uno infectado con 50 parásitos de cada aislamiento) durante la etapa aguda de la infección experimental (35 días post infección). Se utilizó para comparar un grupo infectado con una cepa control (Tulahuen). La presencia del parásito se determinó por PCR amplificando la región del minixión de *T. cruzi*. Así mismo, se determinó el linaje de *T. cruzi* presente en cada muestra y su distribución diferencial mediante RFLP (Bce AI). Las alteraciones en corazón y ME se analizaron mediante estudios histológicos. Las PCRs fueron positivas en todas las muestras analizadas. Los aislamientos Casibla y SGO-Z12 presentaron los linajes II y VI mientras que el aislamiento Lucky presentó los linajes II, IV y VI. Tulahuen solo presentó el linaje V. En la mayoría de los casos las muestras de sangre y corazón de un mismo individuo presentaron un mismo linaje; el ME sin embargo presentó un linaje diferente. Estos resultados fueron corroborados por el RFLP que demostró poblaciones diferentes del parásito en ME en todos los casos. El análisis histológico mostró la presencia de infiltrados inflamatorios más severos en ME que en corazón. Los presentes resultados muestran una distribución tisular del parásito desde etapas tempranas de la infección y un histotropismo diferencial de las diferentes poblaciones de *T. cruzi* presentes en un mismo aislamiento. Los aislamientos utilizados además presentaron una mezcla de linajes, lo que resalta la importancia de estos resultados para aquellos pacientes de área endémica con alta probabilidad de infecciones mixtas.

552. (649) SELECCION DE APTAMEROS DE ADN ESPECIFICOS PARA IL-1 BETA HUMANA RECOMBINANTE

Asensio C.; Valdivieso A.; Santa Coloma T.
Laboratorio de Nanotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBIOMED)-CONICET-Universidad Católica Argentina, Buenos Aires.

La IL-1 β es una citoquina involucrada en numerosas patologías. Existen anticuerpos monoclonales para detectarla o inactivarla, pero no existen aptámeros de ADN. A partir de una librería de ADN de cadena simple con 50 bases aleatorias centrales, se hicieron varias rondas de selección contra IL-1 β humana recombinante como blanco. La IL-1 β fue adherida a membranas de nitrocelulosa, luego bloqueadas con BSA. En cada ronda los aptámeros unidos a la IL-1 β se eluyeron por calor y se amplificaron por PCR. La cantidad de IL-1 β se disminuyó a partir de la tercera ronda de 100 a 25 ng. A partir de la cuarta ronda de selección la señal obtenida por PCR fue mucho más alta que la señal de fondo proveniente de la BSA utilizada en el bloqueo o que la señal de un péptido control. Se han implementado nuevas estrategias para hacer las distintas rondas de selección comparables entre si y cuantitativas: el uso de proteínas y péptidos estándares que unen ADN no-específicamente y el uso de cuadrículas diseñadas en computadora e impresas en nitrocelulosa para pegar en ellas proteínas o péptidos en forma ordenada y separada. Los aptámeros se seleccionaron mediante una presión de selección por afinidad y por especificidad. La especificidad se obtuvo mediante la resta de los aptámeros amplificados por unión a BSA depositada en nitrocelulosa (en todas las rondas de selección) y también mediante la resta con lisados de líneas celulares humanas y de *S. cerevisiae* transferidos a nitrocelulosa (Western Blots). La unión de los aptámeros se monitoreó y cuantificó mediante PCR/qPCR de los eluidos. Para la detección de los aptámeros unidos al blanco en la nitrocelulosa, en Westerns o cuadrículas, se utilizó la biotilación en el extremo 5' y el revelado mediante estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, HRP o CY3. Se espera que estos aptámeros puedan servir para detectar IL-1 β y para bloquear la unión a sus receptores. Subsidios PIP 2009-2011, 2012-2014/ PICT 2012, 1278.

553. (783) UTILIZACIÓN DEL ANTÍGENO RV2626C DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS INFECTADOS CON EL BACILO EN FORMA ACTIVA Y LATENTE

Peña D.^{1,2}; Rovetta A.^{1,2}; Hernández Del Pino R.^{2,3}; Gutiérrez M.⁴; Palmero D.⁵; Chuluyán E.⁶; García V.^{1,2}
IQUIBICEN UBA-CONICET¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires³; Sección Bacteriología de La Tuberculosis, Hospital General de agudos "Dr. E. Tornú", Buenos Aires⁴; División Tisioneumonología, Hospital "F.J. Muñiz", Buenos Aires⁵; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET⁶.

La infección latente (TBL) ocasionada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es el reservorio principal del patógeno, ya que 1/3 de la población mundial estaría infectada. Aunque los ensayos de liberación de IFN- γ frente antígenos específicos de *Mtb* (CFP-10 y ESAT-6) son las pruebas diagnósticas más modernas, no pueden distinguir entre infección latente y activa (TB). Para mejorar el diagnóstico actual, se estudiaron comparativamente antígenos (Rv2626c, CFP-10 y ESAT-6) potenciales inductores de respuestas diferenciales durante la infección por *Mtb*. Así, utilizando células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos TBL, TB y dadores sanos (DS), analizamos la producción citoquinas (Th1 -IFN- γ , Th2-IL-13, Th17 -IL-17 y co-producción de IFN- γ , IL-2 y TNF-polifuncional celular) frente a los antígenos de *Mtb* por citometría de flujo y ELISA. Al estimular con Rv2626c, los individuos TBL aumentaron significativamente la producción de IFN- γ e IL-17 comparando tanto con DS como con pacientes TB. En contraste, la estimulación con CFP-10 y ESAT-6 no indujo diferencias en las respuestas de IFN- γ e IL-17 entre TBL y TB. Asimismo, en individuos TBL, Rv2626c indujo un perfil de respuesta polifuncional, no inducido por un sonicated de *Mtb*. Más aún, Rv2626c conservó su capacidad de diferenciar entre TBL y TB en muestras de sangre entera (SE), en claro contraste con la combinación CFP-10+ESAT-6 que, tal como está reportado, aumentó la producción de IFN- γ tanto en TBL como en TB. Al realizar un análisis ROC de los datos, las curvas obtenidas en CMSP mostraron un área bajo la curva (ABC)=0.78, mientras que en SE se obtuvo un ABC=0.79 (p<0.001). En conjunto, estos resultados indican que el uso de Rv2626c posee un alto potencial como herramienta diagnóstica para la TBL, mejorando los ensayos actualmente disponibles al discernir entre pacientes e individuos infectados. Los protocolos mencionados fueron aprobados por los comités de ética de los Hospitales participantes.

554. (821) LA VITAMINA D3 DISMINUYE LA CONCENTRACIÓN DE COLÁGENO EN LA LÍNEA CELULAR EGPE PROVENIENTES DE PROTOESCÓLICAS DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Fuchs A.; Barbery Venturi M.; Roldán E.
CAECIHS, Universidad Abierta Interamericana, Buenos Aires.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo *in vitro* con utilidad para el estudio del efecto de moléculas farmacológicas o fisiológicas en las células del *Echinococcus granulosus*. Consiste en una línea celular que desarrolla colonias gráficas en agarosa, EGPE (*Echeverría y col, 2010*). Hemos estudiado el efecto de los bisfosfonatos sobre su crecimiento clonal, el etidronato, Ibandronato y olpadronato disminuyen la formación de colonias y el ATP celular y aumentan el calcio intracelular. Estos efectos son revertidos por la prolina (Fuchs y col 2013). Se observó que los bisfosfonatos afectan la membrana extracelular de las colonias gráficas. En este trabajo hemos estudiado la concentración de colágeno en las células EGPE, expresada en μg OHProlinea / μg de prot. Se utilizó el reactivo de Erlich para el colágeno y el Bradford para las proteínas. Las células EGPE se trataron con 30 μM de etidronato e ibandronato (Lab. Gador SA) con o sin la asociación de 10 μM y /o 13 μM de 1,25 cholecalciferol durante 8 días. El control fueron células cultivadas sin tratamiento, todas los cultivos contenían 10% de suero fetal bovino. 75 a 250 μg de proteínas de cada muestra fueron utilizadas para la medición de colágeno. **Resultados:** Diferencias significativas (p<0.05) eva-

luadas por el test T se encontraron entre EGPE sin tratamiento (control) $0,23 \pm 0,04$ (n=5) y las tratadas con Vit D3 $0,11 \pm 0,05$ (n=6). No se obtuvieron diferencias significativas entre el control y las células tratadas con prolina, o bisfosfonatos o la combinación de los bisfosfonatos con prolina, sin embargo la asociación de la vitamina D3 con los bisfosfonatos o la prolina disminuyó el valor del colágeno a valores cercanos a 0. **Conclusión:** La asociación de bisfosfonatos con la vitamina D3 potencia la acción antifibrinogénica descripta para la vitamina D3. Este efecto sinérgico podría ser beneficioso para la disminución de la implantación de la *Echinococcus quística* metastásica.

- 555. (847) EFECTO DE HIDROXITIROSOLO Y OLEUROPEÍNA SOBRE EL NIVEL TRANSCRIPCIONAL DE GENES IMPLICADOS EN LA INFLAMACIÓN AGUDA EN CULTIVO PRIMARIO DE MASTOCITOS PERITONEALES DE RATA**
Persia F.¹; Campo Verde Arbocco F.²; Mariani M.¹; Fogal T.¹; Penissi A.¹
Instituto de Histología y Embriología Mendoza. "Dr. Mario H. Burgos" (IHEM)-CONICET¹; Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza².

Los mastocitos (MC), células del sistema inmune, frente a diferentes estímulos inmunológicos inician a un mecanismo intracelular no citolítico denominado activación, que culmina con la liberación de mediadores biológicamente activos (degranulación), comandando una respuesta de carácter inflamatorio. En trabajos previos determinamos que compuestos con actividad antiinflamatoria y antioxidante: hidroxitiroso (HT) y oleuropeína (Olp) inhiben la activación de los MC, disminuyendo la liberación de β -hexosaminidasa (β -hex) y degranulación, además de tener efectos gastroprotectores. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el siguiente trabajo se analizó en MC estimulados el nivel transcripcional de genes de inflamación aguda (IA), genes blanco del factor de transcripción NF κ B, relacionados con la síntesis de moléculas pro-inflamatorias como prostaglandinas, óxido nítrico e interleuquinas. Nuestra hipótesis plantea que HT y Olp inhiben la transcripción de genes implicados en la IA. Para realizar el siguiente estudio: se cultivó en medio D'mem MC peritoneales purificados de rata. Se trató con $[100\mu\text{M}]$ de HT u Olp por 24 hs (pre-incubación). Se estimuló con concanavalina A (control positivo: sin tratamiento y control negativo: sin tratamiento ni estimulación). Se extrajo el ARN total con TRIreagen, se purificó en oligo dT celulosa y se aisló el ARN mensajero. Se realizó retrotranscripción y PCR en tiempo real de los genes *ptgs-2*, *inos*, *il-5*, *il-6* y *tnf α* y se normalizó con el gen endógeno *gapdh*. Estadística: ANOVA1/Tukey-Kramer. Del análisis del nivel de transcripción de los genes *ptgs-2*, *inos*, *tnf α* , *il-5* e *il-6* se observó que en MC incubados con HT y OLP, el nivel transcripcional fue menor que en el control positivo para los genes analizados, por lo que HT y OLP estarían disminuyendo el nivel transcripcional de algunos genes relacionados con la IA, infiriendo que los mediadores inflamatorios y enzimas relacionadas también se verían disminuidos.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN 3

- 556. (10) LA ADIPONECTINA INFLUENCIA EL PREDOMINIO DE VLDL ALTERADAS EN EL SÍNDROME METABÓLICO**
Lucero D.¹; Miksztołowicz V.¹; Cacciagiù L.¹; López G.²; López G.¹; Berg G.¹; Zago V.¹; Schreier L.¹
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires/INFIBIOC-UBA¹; Cátedra de Bioanálisis II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca².

La heterogeneidad de subfracciones de VLDL ha demostrado variable capacidad aterogénica. Se desconoce si la reducción de adiponectina asociada a insulino-resistencia modula las características de VLDL circulante. Objetivo: Evaluar la relación entre adiponectina y características de VLDL en un estado de insulino-resistencia. Estudiamos 45 pacientes con síndrome metabólico

(SM) y 15 controles sanos. Se evaluó presencia de esteatosis hepática no-alcohólica (ultrasonido y eventual biopsia) y se obtuvo suero (ayuno 12hs) para determinar perfil lipídico, adiponectina, aislar VLDL por ultracentrifugación ($d < 1,006$ g/ml), analizar su composición química y perfil de subfracciones por HPLC de exclusión molecular. Se midió actividad de lipoproteína lipasa (LPL) en plasma post-heparínico obtenido 10 min post-inyección de heparina (60 U/kg). Los pacientes SM mostraron reducción en adiponectina, aún mayor en pacientes con hígado graso ($7,8 \pm 3,8$ y $5,0 \pm 2,0$ vs $15,5 \pm 7,2 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,01$). VLDL de los pacientes SM presentaron mayor masa (159 ± 97 vs. $72 \pm 38 \text{mg/dl}$; $p = 0,01$), sobre-enriquecimiento en triglicéridos ($p < 0,05$), aumento de apo B-VLDL ($5,1 \pm 2,2$ vs. $3,8 \pm 1,2 \text{mg/dl}$; $p = 0,01$) –indicador de número de partículas- y mayor proporción de subfracciones de VLDL grandes (mediana [rango]: $33,5\%$ [$1,2-72,9$] vs. $7,8\%$ [$1,0-21,9$]; $p = 0,01$). La actividad de LPL fue menor en SM ($p = 0,01$). Ajustando por HOMA-IR y circunferencia de cintura, adiponectina correlacionó inversamente con masa de VLDL ($r = -0,37$; $\beta = -0,35$), apo B-VLDL ($r = -0,51$; $\beta = -0,39$), $p < 0,01$, y proporción de VLDL grande ($r = -0,32$; $\beta = -0,28$; $p = 0,05$) y directamente con actividad de LPL ($r = 0,38$; $\beta = 0,35$, $p = 0,02$). En SM la reducción de adiponectina tendría un rol no solo incrementando la secreción de mayor número de partículas de VLDL grandes, sino también reduciendo la degradación de VLDL vía LPL. Adiponectina promovería la acumulación de VLDL alteradas, contribuyendo al estado aterogénico del SM

- 557. (33) EFECTO DE LA SEMILLA DE SALVIA HISPÁNICA L DIETARIA SOBRE LA DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSITO EN RATAS DISLIPÉMICAS INSULINO RESISTENTES**
Ferreira M.; Chicco A.; Lombardo Y.
Cátedra de Química Biológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Estudios previos han demostrado que la semilla de *Salvia hispánica L* – chia- variedad Salba rica en ácido Ω -linolénico (18:3 n-3, ALA), es capaz de mejorar la dislipidemia, esteatosis hepática, insulino resistencia (IR) y adiposidad visceral inducidas en ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS). El presente estudio investiga si el reemplazo de aceite de maíz (AM) por semilla de chia puede mejorar o revertir: a) las alteraciones metabólicas (lipólisis, efecto antilipolítico de la insulina), b) la actividad de enzimas lipogénicas (sintetasa de ácidos grasos –FAS-, acetil-CoA-carboxilasa- ACC-, glucosa-6-P-dehidrogenasa – G-6-PDH- y enzima málica), c) los cambios morfológicos presentes en el tejido adiposo de ratas alimentadas con DRS. Ratas Wistar recibieron durante 3 meses DRS (%energía: 60 sacarosa, 23 AM, 17 proteína). Al cabo de ese tiempo, la mitad de los animales continuó consumiendo DRS (hasta los 6 meses) mientras que en la otra mitad el AM fue reemplazado por semilla de chia durante 3 meses (SRD+chia). El grupo control consumió dieta control durante toda la experiencia. En 6 ratas por grupo se determinó en plasma: lípidos, glucosa, insulina; y en adipocitos aislados y tejido adiposo (TA) epididimal: los parámetros mencionados en a),b),c). El reemplazo de AM por semilla de chia en la DRS: a) normalizó: 1- los niveles plasmáticos de glucosa, TG y AGNE ($p < 0,05$); 2- la lipólisis basal, la lipólisis estimulada por isoproterenol y el efecto antilipolítico de la insulina ($p < 0,05$); b) redujo la adiposidad visceral, disminuyendo la hipertrofia de las células grasas ($p < 0,01$) y mejoró la alterada distribución celular sin cambios en la celularidad; c) En TA normalizó/mejóro significativamente las actividades enzimáticas FAS, G-6-PDH, ACC y enzima málica ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la normalización de la dislipidemia e IR en ratas alimentadas con SRD+chia puede contribuir a mejorar la disfunción del tejido adiposo.

- 558. (64) LA DISRUPCIÓN SELECTIVA DE LOS RECEPTORES DE DOPAMINA TIPO 2 EN LACTOTROPOS HIPOFISARIOS AUMENTA EL PESO CORPORAL Y LA ADIPOSIDAD EN RATONES HEMBRA**
Luque G.¹; Millan M.¹; Ramírez M.¹; Ornstein A.¹; Rubinstein M.²; Becu-Villalobos D.¹
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)-CONICET².

La prolactina posee tanto funciones reproductivas como metabólicas, y niveles elevados de esta hormona se han asociado con un incremento en la ingesta y peso corporal. Sin embargo, las hembras que carecen de los receptores de dopamina tipo 2 (RD2s) en todo el organismo (*Drd2^{-/-}*) con marcada hiperprolactinemia a lo largo de la vida, no tienen estos parámetros alterados, probablemente a causa de fenotipos superpuestos debido a la ausencia global de RD2s. Generamos un ratón transgénico que carece de RD2s funcionales específicamente en los lactotrofos (*lacDrd2KO*) para estudiar el rol de altos niveles de prolactina sin el efecto solapado de los RD2s centrales. Los ratones hembra *lacDrd2KO* presentaron hiperprolactinemia sostenida, una marcada hiperplasia hipofisaria y un eje de GH conservado. Observamos un aumento significativo en la ingesta a partir de los 3 meses de edad, y desde los 6 meses en adelante un incremento en el peso corporal con respecto a sus pares *Drd2^{loxP/loxP}*. La adiposidad y el tamaño de los adipocitos se encontraron significativamente aumentados, como también los niveles de triglicéridos séricos. Asimismo, las hembras *lacDrd2KO* presentaron intolerancia a la glucosa y un test de tolerancia a la insulina conservado. Los niveles de expresión hipotalámicos de ARNm de *Pomc* y *Ppo* y el contenido de aMSH en hipófisis intermedia no se encontraron alterados en ausencia de RD2 funcionales en lactotrofos (parámetros que se encuentran alterados en hembras *Drd2^{-/-}*). Por otra parte, la expresión de *Npy* se encontró significativamente aumentada, lo cual sumado al efecto orexigénico de prolactina estaría dando como resultado un incremento en la ingesta y adiposidad. Nuestros resultados enfatizan el rol metabólico de prolactina, y demuestran la importancia de utilizar ratones transgénicos tejido específicos para discernir los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos que pueden encontrarse enmascarados en un ratón *knockout* global.

559. (102) COMPOSICIÓN PROTEICA DE LAS GOTAS LIPÍDICAS HEPÁTICAS. RELACIÓN CON LOS REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS DE LA CÉLULA

Quiroga A.^{1,2}; Ceballos M.¹; Parody J.¹; Casella M.¹; Carnovale C.¹; Álvarez M.¹; Carrillo M.¹; Lehner R.²
Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario¹; Group on Molecular and Cell Biology of Lipids, University of Alberta, Canadá².

Poco se sabe sobre la composición proteica de las gotas lipídicas (GL) del hígado y sobre los cambios en dicha composición durante la transición ayuno-realimentación. Nuestro objetivo fue investigar la composición proteica de las GLs hepáticas durante el ayuno y la realimentación en el ratón. Se utilizaron ratones macho C57BL/6 de 4 meses de edad que fueron divididos en dos grupos: ayunado (24 h) y realimentado (24 h ayuno y 6 h de realimentación). Los ratones se sacrificaron mediante punción cardiaca, los hígados se recogieron, se enjuagaron en PBS frío y se sometieron a homogeneización. Las proteínas de las GLs se resolvieron en geles desnaturizantes al 10% (SDS-PAGE) y se analizaron por LC-MS/MS. Se identificaron un total de 612 proteínas asociadas a las GLs en el ayuno, y 485 proteínas asociadas a las GLs de animales realimentados. Mientras que 404 proteínas fueron comunes a ambos estados, 95 proteínas de las GLs fueron únicas del ayuno y 76 fueron únicas de la realimentación, respectivamente. Algunas de las proteínas de las GLs compartidas en ambos estados de alimentación fueron los marcadores clásicos de GLs perilipin 2 y perilipin 3, CTP: fosfolina citidiltransferasa A (CCT-II), aciltransferasas, etc. También se encontraron varios marcadores del retículo endoplásmico, incluyendo calnexina. Entre las proteínas únicas del ayuno encontramos perilipina 5, ABHD5/CGI-58, etc, y varias proteínas marcadoras de mitocondria y peroxisoma, apoyando el papel de GLs en el suministro de sustratos para la oxidación de ácidos grasos. Las proteínas únicas de la realimentación incluyen AGPAT2, sintasa de S-adenosilmetionina 1 y esteroil 17-alfa-hidroxiolasa, entre otras. Estos resultados ponen de manifiesto la naturaleza dinámica de la composición proteica de las GLs hepáticas de acuerdo con los requerimientos energéticos de la célula.

560. (116) INGRESO AQUÍ EL TÍTULO BIODISPONIBILIDAD DE CALCIO EN DIETAS ADICIONADAS CON HARINAS INTEGRALES EXTRUDIDAS DE SORGO BLANCO Y ROJO, EN UN MODELO ANIMAL DE RATAS WISTAR EN CRECIMIENTO

Weisstaub A.¹; Dwyer L.¹; Benesperi R.¹; Pardo M.¹; Llopert E.²; Drago S.²; Zuleta A.¹

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Universidad Nacional del Litoral²; Instituto de Tecnología de Los Alimentos, Santa Fe, Argentina².

El consumo de granos enteros es sugerido por sus beneficios saludables. Sin embargo, el mayor contenido de fitatos de los cereales integrales disminuye la biodisponibilidad de minerales como el Calcio (Ca). Procesos como la extrusión disminuirían el contenido de fitatos debido a la hidrólisis que se produce por altas temperaturas y presión, mejorando la absorción de este mineral. Se estudió la influencia de una dieta adicionada con dos variedades de sorgo extrudido (blanco y rojo) como fuente de fibra sobre la biodisponibilidad de Ca. Ratas Wistar macho recién destetadas se alimentaron durante 60 días (Tf) con las siguientes dietas *ad libitum* (n=8/grupo): dieta control (DC) y dos dietas a base de Sorgo Blanco y Rojo extrudido (SB y SR). Durante la experiencia se registraron consumo de dieta, aumento de peso y absorción aparente porcentual de Ca (Abs%). A Tf se extrajo el Femur derecho para determinar contenido porcentual de Ca (CaF%) y se removió el ciego para medir peso y pH del contenido cecal como medidas de fermentabilidad. El consumo de DC fue superior al de SB y SR (1108±96 vs 931±89 vs 985±66 g; *p*=0.014), aunque no se observaron diferencias en el aumento de peso (284±34 vs 272±61 vs 280±17 g; *p*=0.8485). La Abs% y CaF% no arrojó diferencias significativas entre DC y SB pero sí con SR (*p*<0.0001) (71.1±3.3 vs 64.7±7.1 vs 51.0±5.2) y (23.0±1.6 vs 21.7±2.1 vs 14.4±2.1 mg/100 mg). El peso del ciego de DC fue mayor a SB aunque no a SR (3.05±0.25 vs 2.41±0.31 vs 3.01±0.57 g; *p*=0.0105) mientras que no existieron diferencias en el pH cecal (6.97±0.18 vs 7.03±0.42 vs 6.67±0.41 *p*=0.1177). El consumo de cereales integrales mostró un efecto positivo sobre la saciedad, mientras que la extrusión de la variedad blanca podría estar involucrada en la degradación de los fitatos, manteniendo la biodisponibilidad de Ca en valores similares a una dieta control, sin fitatos. * Financiado por UBACyT N° 0020110200054, PICT 1105 y CAI+D 2009 Tipo II PI 54-259.

561. (159) EFECTO DE GOS/FOS® SOBRE LA ABSORCIÓN Y RETENCIÓN DE CALCIO EN UN MODELO DE RECUPERACIÓN NUTRICIONAL

Gonzales Chaves M.^{1,2}; Bryk G.^{1,2}; Zeni Coronel M.²; Medina D.²; Mandalunis P.⁴; Pita Martín De Portela L.³; Zeni S.^{1,2}
Cátedra de Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, Hospital de Clínicas, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA.²; Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires⁴.

La desnutrición calórico-proteica durante las primeras etapas de la vida da lugar a un peso y estatura menor al normal; conllevando a trastornos en el contenido mineral y largo de los huesos en la adultez. En la rehabilitación, junto al mayor aporte proteico se deberían incrementar el de calcio (Ca) para una correcta recuperación ósea. Los prebióticos serían una herramienta para aumentar la absorción y retención ósea de Ca; por ello se evaluó el efecto de GOS/FOS® en la recuperación utilizando un modelo de restricción proteica (RP). Al destete ratas macho Wistar recibieron una dieta hipoproteica (4%) por una semana; luego recibieron dietas normoproteicas: AIN 93-G con 0.5% (DA5) y DA5 + 5% GOS/FOS® (DP5). Los controles recibieron desde el destete AIN 93-G con 0.5% (A5) y A5 + 5% GOS/FOS® (P5) hasta los 50 días de vida. Se midió: crecimiento de peso, talla corporal (PC) (TC) respectivamente, y desarrollo de lactobacilos

(DL) semanalmente. Al final se evaluó: pH cecal, absorción de Ca y fósforo (P), contenido mineral femoral, contenido y densidad mineral ósea (CMO, DMO) (Lunar DXA), volumen óseo (VO), ancho total del cartílago epifisario (Ce), ancho del cartílago hipertrófico (Ch) (histología) y longitud de tibia (LT). El crecimiento se detuvo durante la semana de RP; con la realimentación el grupo DP5 no logró alcanzar la talla de A5. DP5 y P5 aumentaron el DL y disminuyeron el pH cecal ($p < 0.0001$). DP5 presentó un aumento significativo en la absorción de Ca ($p < 0.005$), en la concentración de Ca y P en Femur ($p < 0.01$) y en CMO ($p < 0.05$); DP5 mostró valores estadísticamente superiores en VO, Ce, Ch y longitud de tibia respecto a DA5 ($p < 0.05$). Conclusión: durante el período de estudio los GOS/FOS® permitieron equiparar a DP5 con A5, sugiriendo su utilidad en la recuperación nutricional. © N.V.Nutricia

562. (206) PAPEL DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LA DIFERENCIACIÓN DE PRE-ADIPOCITOS 3T3-L1

Barcos L.^{1,2}; Lago Huvelle M.¹; Schupp M.²; Leskow F.¹
IQUIBICEN-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Charité University Medicine, Berlin, Alemania².

La insulina es una hormona proteica que regula procesos como el metabolismo de la glucosa, la proliferación y la diferenciación celular. El receptor de insulina (IR) existe como dos variantes de splicing cuya expresión se encuentra finamente regulada: una isoforma A (más corta) y una isoforma B (más larga). Ambas presentan diferencias funcionales que se reflejan en la diferente afinidad por la insulina, cinética de internalización y dinámica de señalización, entre otros factores. Utilizando células 3T3-L1 como modelo nos propusimos evaluar el efecto de cada isoforma del IR en la proceso de diferenciación de pre-adipocitos. En primer lugar, se determinó el efecto producido por la sobreexpresión del IR, infectando dichas células con partículas virales. En estas células, en que se determinó la sobreexpresión específica de cada isoforma, se pudo observar una inhibición en la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1 en condiciones de inducción fuerte. Sin embargo, frente al estímulo débil con Pioglitazone, insuficiente para promover la diferenciación de pre-adipocitos normales, la sobreexpresión de ambas variantes de IR aumentó el porcentaje de células diferenciadas, determinado por la expresión de marcadores específicos como PPAR γ y aP2. Adicionalmente, se apagó la expresión de ambas isoformas mediante siRNAs específicos, pudiéndose comprobar que, frente a una inducción completa, el silenciamiento de la isoforma IR-B disminuye significativamente el porcentaje de diferenciación en estas células. En conjunto, estos experimentos nos permiten concluir que, tanto la expresión de las distintas isoformas del IR como el nivel de expresión de cada una de estas, afectan el proceso de diferenciación en pre-adipocitos 3T3-L1, proceso que depende a su vez del contexto celular y las señales extracelulares.

563. (306) DAÑO OXIDATIVO Y RESPUESTA INFLAMATORIA EN TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA POR COBALTO Y NÍQUEL

Ferrarotti N.; Semprine J.; Musacco-Sebio R.; Saporito-Magriñá C.; Repetto M.
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Los metales de transición se pueden clasificar en metales redox activos o inactivos según la capacidad de participar en procesos y reacciones químicas de óxido-reducción. Los metales redox activos son principalmente el hierro (Fe) y el cobre (Cu), sin embargo, el cobalto (Co) y níquel (Ni) se consideran redox inactivos. Uno de los mecanismos involucrados en el daño a cerebro por toxicidad inducida por metales es la respuesta inflamatoria y la generación de especies reactivas del oxígeno. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el daño oxidativo a biomoléculas por la exposición a Co y Ni involucra procesos inflamatorios en un modelo de toxicidad aguda y crónica en ratas. Modelo agudo: Se

administró a 3 grupos de ratas Sprague Dawley (200-250 g, ip) a) CoCl_2 y NiSO_4 (dosis: 7,5 mg/kg) durante un período de 0 a 48 h, b) curva dosis-respuesta (dosis: 0-10 mg/kg, 16 h), y c) NaCl (0.9%, ip, grupo control C). Modelo crónico: Tres grupos de ratas Sprague Dawley (150 g) recibieron: agua (C), CoCl_2 y NiSO_4 (0,1 g/L en agua de bebida) durante 42 días. Se evaluó en cerebro quimioluminiscencia in vivo (QI), actividad de NADPH oxidasa, y en plasma, interleuquina 6 (IL-6). Resultados: en cerebro (modelo agudo) QI incrementó 2,8 veces con Co y 5 veces con Ni (C: 16 ± 2 cps/cm², $p < 0.01$) a las 4 y 16 h. La actividad de NADPH oxidasa incrementó más del 100% a las 48 h con Ni. La toxicidad crónica generó aumentos de NADPH oxidasa 18 veces por Co a los 14 d, y por Ni, 3 veces a los 7 d y 30 veces mayor a C a los 42 d (C: 22 ± 3 nmol/min.g, $p < 0,001$). La exposición aguda y crónica a Co y Ni genera daño oxidativo, con incrementos de la actividad de NADPH oxidasa y de la concentración de IL-6 mayores al 100% (C: 13 ± 3 pg/mL) a partir de los 7 días de sobrecarga crónica con Ni. La respuesta a los efectos tóxicos del Co es más tardía que para el Ni en el modelo crónico, sin embargo, en toxicidad aguda el Co genera rápida respuesta inflamatoria a dosis menores que el Ni.

564. (324) LA SUPLEMENTACION CON ANTIOXIDANTES PREVIENE LA HIPERTRIGLICERIDEMIA Y LA HIPERCOLESTEROLEMIA DE LOS ANIMALES QUE RECIBIERON UNA DIETA ALTA EN GRASAS Y FRUCTOSA EN LA BEBIDA

Wallinger M.; Lambrisca M.; Reyes M.; Berreta J.; Linares L.; Reyes Toso C.
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

En estudios previos se observó que la administración crónica de vitamina E previene parcialmente el aumento de la trigliceridemia -TGL- en animales que recibieron una dieta estándar complementada con fructosa al 10% en la bebida -F10%- . En estas condiciones los animales desarrollan un cuadro similar al síndrome metabólico -SM-. El efecto sobre la TGL podría estar relacionado con las acciones antioxidantes de la VE. En el presente trabajo se evaluó el efecto de un complejo antioxidante (CA) sobre el desarrollo del SM por consumo de una dieta alta en grasa y F10%. Las ratas (Wistar machos $n = 48$) se estudiaron durante 6 semanas: 1- Dieta estándar (DE); 2-F10%; 3- F10% más grasa en la dieta al 20% (FG) y 4- FG con antioxidantes (FGa). Las dietas se realizaron según AIN93, modificando la cantidad y tipo de grasa (vacuna) en los grupos FG y FGa. El grupo FGa recibió en la dieta un CA compuesto por zinc, selenio y vitaminas C y E. Se controló periódicamente el peso, consumo de dieta, de bebida, y perfil lipídico. Análisis estadístico ANOVA. Los animales de los grupos F ($p < 0,001$ F 55.92; R2 0.8419) y FG ($p < 0,001$ F232; R2 0,9063) presentaron aumento de TGL a las 6 semanas con respecto al inicio. FG presentó también un incremento del colesterol total -Ct- ($p < 0,001$; F163, 7) y del HDL ($p < 0,001$; F71, 87). Para ambos lípidos el incremento fue mayor en el grupo FG (FG vs FCT: $p < 0,001$; F67, 92; TGL: $p < 0,01$; F18, 63). La suplementación con antioxidantes previno parcialmente el aumento de la trigliceridemia (FG vs FGa $p < 0,001$; F2, 938; R20, 6191) y la colesterolemia (FG vs FGa $p < 0,001$; F4, 52; R20, 6068) a las 6 semanas, sin modificaciones en el HDL colesterol. Se concluyó que la administración de un CA previno parcialmente la hipertrigliceridemia y la hipercolesterolemia de un modelo experimental de SM con un marcado aumento de los lípidos plasmáticos. Este hecho estaría relacionado con los efectos antioxidantes sobre el metabolismo de los lípidos a nivel hepático.

565. (408) INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN GÁSTRICA POR HELICOBACTER PYLORI Y EL GENOTIPO DE LAS CÉPES COLONIZANTES EN EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL DE PACIENTES ADULTOS CON SINTOMATOLOGÍA DIGESTIVA

Mantero P.¹; Janjetic M.^{1,2}; Piskorz M.³; Barrado A.¹; Arce M.²; Zubillaga M.¹; Boccio J.¹; Goldman C.¹
Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Escuela de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad De Buenos Aires²; Centro Gastroenterológico Vicente López (CEGAILO), Buenos Aires³.

La infección por *Helicobacter pylori* podría modificar la secreción de hormonas sintetizadas en la mucosa gástrica que modulan el apetito con una consecuente influencia sobre el índice de masa corporal (IMC). La tasa de hidrólisis de urea (UHR), resultado obtenido a partir del ^{13}C -Test del Aire Espirado (^{13}C -UBT) para el diagnóstico de *H. pylori*, podría relacionarse con la carga bacteriana. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la infección por *H. pylori*, los valores de UHR y el genotipo de las cepas colonizantes en el IMC de pacientes con sintomatología digestiva. Se incluyeron adultos (18-70a) con indicación de videoendoscopia digestiva alta. El diagnóstico de *H. pylori* se realizó mediante ^{13}C -UBT y PCR del gen constitutivo *vaca* en biopsias gástricas de antro y cuerpo, donde también se amplificaron los genes de patogenia *cagA-cagT-cagE*. La evaluación antropométrica incluyó medición de peso, talla y circunferencia de cintura y se realizó una encuesta sociodemográfica y recordatorio alimentario de 24hs. El análisis estadístico se realizó mediante SPSS Statistics 17.0. La prevalencia de infección entre los 27 pacientes incluidos fue del 29.6%, evidenciándose por PCR presencia de todos los genes de patogenia estudiados en el 50.0% de los pacientes infectados. Los resultados de ingesta alimentaria revelaron una tendencia de pacientes *H. pylori* positivos a menor ingesta de energía coincidente con un menor porcentaje de sobrepeso-obesidad respecto de pacientes no infectados (25.0% vs 47.4%), aunque dichas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p=0.28$). No encontramos asociación entre los valores de UHR o el genotipo de las cepas colonizantes con el IMC de los pacientes ($p=0.84$, $p=0.66$). En conclusión, aunque la infección y el genotipo de *H. pylori* no se asociaron con el IMC, se observó una tendencia hacia menores prevalencias de sobrepeso-obesidad e ingesta de energía en los pacientes infectados.

566. (426) VLDL ATÍPICAS PRODUCIDAS EN INSULINO-RESISTENCIA. EFECTO DE DIETAS SUPLEMENTADAS CON ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN UN MODELO ANIMAL

Bursztyn M.¹; Lucero D.¹; López G.²; Friedman S.³; Macri V.³; Schreier L.¹; Zago V.¹

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, IN-FIBIOC-UBA¹; Cátedra de Bioanalítica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca²; Cátedra de Química General y Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires³.

En la insulino-resistencia (IR), la heterogeneidad de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG) es de importancia fisiopatológica por su variable rol aterogénico. Poco se sabe acerca del tipo de VLDL circulante cuando se reciben dietas con ácidos grasos insaturados (AGI) en la IR. Objetivo: estudiar el efecto de la suplementación con AGI sobre tamaño y composición de VLDL en un modelo animal de IR. Se utilizaron aceites de pescado y de girasol alto oleico (AGAO), fuentes de $\omega 3$ y 9 respectivamente. Se estudiaron durante 12 semanas ratas Wistar macho, 180-200g, divididas al azar en 4 grupos: 1 con dieta estándar (DE, n=5) y 3 con dieta rica en sacarosa (DRS, 30% en agua de bebida), subdivididos en: AGI- $\omega 3$ (n=5), AGI- $\omega 9$ (n=5)- 15g/100g dieta- y DRS control (DRS-C, n=5). En suero en ayunas se midieron perfil lipídico y ácidos grasos libres (AGL). Se aisló VLDL por ultracentrifugación ($d=1,006$ g/ml), se analizó su composición química y tamaño por HPLC de exclusión molecular. En los cromatogramas se evaluaron VLDL grandes y VLDL típicas, expresándose como proporciones. DRS-C presentó: mayores niveles de AGL ($0,74\pm 0,20$ vs $0,46\pm 0,11$ mmol/l, $p=0,04$), VLDL con mayor contenido de TG ($64,4\pm 7,3\%$ vs $48,3\pm 9,8\%$, $p<0,05$) y mayor proporción de VLDL grandes (mediana [rango]: $49,1\%$ [14,5-82] vs $20,9\%$ [5,1-41,3]; $p=0,02$) vs grupo DE. En relación a DRS-C, AGI- $\omega 3$ presentó disminución de AGL ($0,34\pm 0,06$, $p<0,01$), de TG-VLDL y en la proporción de VLDL grandes ($55,2\pm 4,4\%$, $p<0,05$) y ($22,5\%$ [19,7-35,6], $p<0,02$). AGI- $\omega 9$ no mostró diferencias significativas en la composición ni tamaño de VLDL respecto a DRS-C. La suplementación con AGI- $\omega 3$ mejoró la características aterogénicas de la VLDL producidas en IR, lo cual tendría relación con el

menor flujo de AGL hacia el hígado. En cambio, AGI- $\omega 9$ no logró revertir las anomalías de esta lipoproteína. La acción de los AGI utilizados fue variable en relación al tipo de VLDL.

567. (437) IMPACTO DE LA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN LA VIDA ADULTA EN ANIMALES CON CAMBIOS EN LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA DURANTE LA LACTANCIA

Alzamendi A.¹; Castrogiovanni D.¹; Spinedi E.²; Giovambattista A.¹

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata¹; Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata².

Los cambios de programación metabólica en el período postnatal temprano inducen efectos a largo plazo pudiendo desencadenar alteraciones funcionales, luego de recibir cargas alostáticas durante la adultez. En este trabajo evaluamos el impacto del consumo de una dieta rica en fructosa (DRF, fructosa 10% p/v en agua de bebida) por ratas hembra adultas, nacidas de madres que consumieron DRF durante la lactancia. Ratas S-D preñadas fueron alimentadas *ad libitum* con dieta normal durante la gestación. Al post-parto y durante la lactancia, las madres se separaron en dos grupos que recibieron alimento *ad libitum* dieta normal y como bebida, agua (MC) o DRF (MF). Entre los días 21-60 de vida las crías recibieron dieta normal. Al día 60 de vida, un grupo de crías se sacrificó, y las crías restantes se dividieron en dos 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 peso corporal (PC) y consumo calórico, y el día 81 de vida se sacrificaron. Se obtuvo sangre para determinar glucosa (GLU), triglicéridos (TG), insulina (INS), colesterol total (CT) y leptina (LEP). Al día 60 de vida, las crías no presentaron alteraciones en los parámetros analizados. Al día 81 de vida, las crías CF presentaron aumentados niveles de TG y CT ($p<0,05$ vs. CC). Los FC mostraron aumento en los niveles de GLU ($p<0,05$ vs. CC). Los FF resultaron con aumento del PC y del consumo calórico ($p<0,05$ vs. CC), y de los niveles de GLU, INS, TG, LEP y CT ($p<0,05$ vs. CC, CF y FC). Los resultados indican que el consumo materno de DRF durante la lactancia induce en sus crías adultas un aumento en la susceptibilidad al desarrollo de alteraciones endocrino-metabólicas y de la función del TA, reforzando la importancia de la programación metabólica en el período postnatal inmediato (FPREDM 062013; PIP 0704).

568. (523) ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PROGRAMACIÓN FETAL INDUCE DIMORFISMO SEXUAL A PADECER ENFERMEDADES EN EL ADULTO

Echarte S.; Podaza E.; Chisari A.

Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar Del Plata.

La hipótesis del "fetal programming" propone que individuos nacidos con bajo peso como consecuencia de una malnutrición materna severa durante la gestación, tienen una alta predisposición a padecer en su vida adulta enfermedades metabólicas (diabetes de tipo II, hipertensión arterial, alteraciones cardíacas, dislipidemias, hígado fibroso, cirrosis y cáncer). La homeostasis alterada de especies reactivas del oxígeno (ROS) es un proceso que contribuye a la vulnerabilidad de padecer dichas enfermedades; siendo las mujeres menos susceptibles que los hombres. El objetivo es estudiar el dimorfismo sexual en el estrés oxidativo hepático inducido por una malnutrición proteica en las madres gestantes y lactantes, que se manifiesta en la vida adulta de las crías. Se emplearon ratas Wistar preñadas que se alimentaron con una dieta con 8% de proteínas durante el período de gestación y lactancia. Las crías, machos y hembras, continuaron con esa dieta hasta los 60 días. Se extrajo sangre por punción cardíaca y se disecó el hígado. El estrés oxidativo se evaluó analizando ROS, carbonilación proteica, peroxidación lipídica y capacidad antioxidante total; el daño hepático mediante transaminasas séricas y contenido de colesterol y triglicéridos en hígado. El contenido de

ROS, carbonilación de proteínas y la peroxidación lipídica en el hígado fueron superiores en los machos en comparación con las hembras ($p < 0,05$). La capacidad antioxidante total en los machos es significativamente más alta ($p < 0,05$). Se pone en relieve la complejidad de la lesión de la malnutrición en el que el estado de oxidación se correlaciona con la lesión hepática en forma de causa y efecto. El contenido hepático de colesterol y triglicéridos es significativamente mayor ($p < 0,05$) en machos, al igual que el valor sérico de transaminasas. En conclusión, la comprensión de los mecanismos que inducen esta diferencia nos permitiría explicar la susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades metabólicas de los hombres.

569. (576) PERFIL LIPÍDICO LIPOPROTEICO Y COMPETENCIA MECÁNICA ÓSEA POR EFECTO DEL CONSUMO DE DIETAS RICAS EN AGMI

Alsina E.¹; Suarez C.¹; Bozzini C.¹; Macri E.¹; Zago V.²; Schreier L.²; Boyer P.¹; Friedman S.¹

Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas. INFIBIOC-UBA, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Introducción: En estudios previos demostramos que en la hipercolesterolemia nutricional (HCN), una dieta rica en AGMI (ácidos grasos monoinsaturados) provenientes del aceite de girasol alto oleico (AGAO) impactaba negativamente en el perfil lipídico-lipoproteico y en la masa ósea. Sin embargo, no se estudió el efecto sobre la competencia mecánica ósea. **Objetivo:** Evaluar el efecto del consumo dietas ricas en AGMI sobre el perfil lipídico-lipoproteico y la competencia mecánica ósea en la HCN.

Métodos: 70 Ratas macho Wistar al destete fueron asignadas a 1 de 7 grupos; 3 grupos recibieron una dieta control: Control (C) o C-AO (aceite oliva) o C-AGAO. En los 4 grupos restantes se indujo la HCN con una dieta aterogénica rica en grasa saturada (GS) y col por 3 semanas. Luego se reemplazó la GS por AGAO o AGAO-F (1% de fitosteroles naturales) o AGAO-n3 (aceite de pescado) o AO por 5 semanas. Las dietas se administraron *ad libitum* y se registró zoometría y consumo (kcal/100g peso/día). A Tfinal se evaluó col-T, col-noHDL y col-HDL (mg/dL) y se midieron propiedades biomecánicas óseas, estructurales, geométricas y materiales. **Resultados:** C y C-AO mostraron mayor peso y consumo ($p < 0,05$). AGAO mostró los mayores niveles séricos de col y col-LDL ($p < 0,001$) y menor de HDL ($p < 0,05$). AGAO-F optimizó los niveles de col-T, col-noHDL y col-HDL vs. AGAO; AGAO-n3 alcanzó los menores niveles de col-T y col-noHDL. Los grupos HCN fueron afectados negativamente tanto en las propiedades óseas estructurales (cargas máx fractura y elástica límite y rigidez ósea) como geométricas (áreas de sección transversal y cortical; mm²) ($p < 0,05$), sin modificaciones en los materiales.

Conclusiones: Los efectos negativos producidos por la HCN sobre la biomecánica ósea, no pudieron ser revertidos por las dietas utilizadas y podrían deberse a una alteración en la masa ósea y distribución arquitectónica, sin afectar calidad intrínseca del hueso. UBACyT 0613 y 0070.

570. (746) LA HIPERGLUCEMIA INDUCE LA REDISTRIBUCION DE TUBULINA EN ERITROCITOS

Nigra A.; Monesterolo N.; Amaiden M.; Rivelli J.; Casale C.; Santander V.

Universidad Nacional De Río Cuarto, Córdoba.

En las últimas décadas numerosos estudios han demostrado que los eritrocitos son sensibles a su entorno. Se ha descrito que la tubulina podría desarrollar un importante papel estructural e incluso en la regulación enzimática. Nuestros antecedentes previos han descrito que en eritrocitos humanos, esta proteína se distribuye en tres fracciones, una citosólica, una estructura de tubulina sedimentable a 100 000 x g y una asociada a la membrana plasmática. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la estructura sedimentable de tubulina y analizar el efecto de glucosa sobre esta fracción de tubulina de eritrocitos. Los resultados muestran que, tanto en eritrocitos humanos como de rata, la glucosa induce

la translocación de tubulina desde la fracción sedimentable a la membrana. Esta migración de tubulina, también fue observada en eritrocitos humanos de pacientes diabéticos y de ratas Wistar con inducción de diabetes por estreptozotocina. La medición del contenido de tubulina de la fracción sedimentable en eritrocitos tratados con glucosa y posteriormente con nocodazol o taxol, mostró que la glucosa induce un aumento en el dinamismo de esta fracción. El análisis de la deformabilidad de los eritrocitos tratados con glucosa mostró que la translocación de tubulina a la membrana estaría correlacionada con la disminución en la deformabilidad eritrocitaria. Por otro lado, la observación de la fracción de tubulina sedimentable por microscopía electrónica reveló la polimerización de tubulina con un patrón que se asemeja a una maya compuesta por aros polimerizados de la proteína. En conclusión, la hiperglucemia induce en los eritrocitos de los mamíferos una redistribución de la tubulina hacia la membrana, hecho que podría estar relacionado con la disminución de la deformabilidad.

571. (754) ALTERACIÓN EN LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (I-III, II-III Y IV) POR EFECTO DE AGENTES PORFIRINOGÉNICOS

Zuccoli J.¹; Ruspini S.¹; Batlle A.¹; Buzaleh A.^{1,2}

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Hospital de Clínicas José De San Martín¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

La mitocondria juega un rol vital en el metabolismo energético y muerte celular, la homeostasis del calcio y la generación de especies reactivas de oxígeno. El hemo es una de las moléculas biológicamente más diversificadas en la naturaleza; su deficiencia por fallas en su biosíntesis o por un catabolismo acelerado, desencadenaría daño celular severo. El hemo es cofactor de una gran variedad de proteínas como la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) y Citocromo c oxidasa (CcOx). Previamente observamos alteraciones en la actividad, expresión y/o localización de la NOS en cerebro frente a agentes porfirinogénicos; siendo la respuesta diferencial al igual que cuando se evaluaron otros metabolismos. Dada la interrelación entre la NOS y la CcOx, el objetivo de este trabajo fue dilucidar el efecto de diferentes drogas porfirinogénicas sobre la cadena respiratoria en encéfalo de ratones. Se midieron las actividades los complejos I-III, II-III y IV en mitocondria de encéfalo de ratones (25 gr.) tratados con Isoflurano (2 ml/ kg), Sevoflurano (1,5ml/kg) y etanol (30% en agua de bebida, 7 días) y ayunados (24hs). El Sevoflurano inhibió 70% ($p < 0,01$) la actividad de la CcOx (complejo IV). Por el contrario, se observó un aumento del 115% ($p < 0,01$) debido al ayuno. En el resto de los tratamientos no hubo alteraciones en esta enzima. Los complejos I-III (NADH-citocromo c reductasa) y II-III (Citocromo c reductasa succinato) variaron con el tratamiento. El Sevoflurano indujo 60% ($p < 0,05$) la actividad del complejo II-III, sin alterar al complejo I-III. El ayuno causó un efecto opuesto produciendo inducción (90%; $p < 0,05$) del complejo I-III y disminución (67%, $p < 0,05$) en la actividad del complejo II-III. En conclusión, los agentes estudiados afectaron los complejos respiratorios lo que llevaría a la disrupción de la función mitocondrial, generando además un daño oxidativo, que podría ser consecuencia de las alteraciones sobre el metabolismo del hemo debida a los tratamientos.

572. (768) VARIACION DE LEPTINA SERICA EN MUJERES, DURANTE UN TRATAMIENTO DE DESCENSO DE PESO

Felipoff A.¹; Río M.¹; Dupraz H.¹; Weisstaub A.¹; Perdomo C.¹; González Infantino C.²; Zago L.¹

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires².

La leptina, hormona secretada principalmente por el tejido adiposo interviene en la homeostasis energética evitando un incremento excesivo en el porcentaje de grasa corporal. Se considera que sus niveles en sangre son proporcionales a la cantidad de tejido adiposo del individuo. El objetivo del trabajo es evaluar las

variaciones en los niveles de leptina durante el tratamiento de pacientes con sobrepeso u obesidad. Se estudiaron 61 mujeres (20 a 73 años de edad) que se incorporaron a un programa de descenso de peso basado en la modificación de su dieta habitual. Se determinó el IMC (Kg/m²), la circunferencia de cintura (CC) y la concentración de leptina sérica (LEP) (Leptin-EASIA DIA Source) al iniciar el tratamiento (To) y a los 3 meses (T3). La modificación de los parámetros evaluados entre To y T3 se resume en la siguiente Tabla observándose una disminución significativa en los valores de IMC, CC y LEP.

Seguimiento	To (n= 61)	T3 (n= 61)
IMC (Kg/m²)	32.0 + 4.85 ^a	30.7 + 5.21 ^a
Nor mopeso (%)	--	10
Sobrepeso (%)	40	48
Obesidad (%)		
Grado I	38	21
Grado II	11	13
Grado III	11	8
CC (cm)	108.3 + 12.49 ^a	104.9 + 11.79 ^a
LEP (ng/ml)	16.7 + 11.77 ^a	12.1 + 9.17 ^a

^a: P < 0.0001

Se encontró una correlación directa entre la disminución de los valores de LEP y de IMC (r= 0.50). Cuando los valores de LEP se dividieron en cuartiles según IMC a To, el% de pacientes con LEP > 15 ng/ml disminuyó en todos los grupos entre To y T3 (1º cuartil: 27% vs 7%; 2º: 20% vs 13.3%; 3º: 53% vs 27% y 4º: 88% vs 69%). Sin embargo, un alto porcentaje de las pacientes mantuvo niveles elevados de LEP (>15 ng/ml). En el grupo estudiado se corroboró la correlación entre los valores de leptina y del IMC. El descenso de peso fue acompañado por una disminución en los niveles de la hormona aun cuando en un alto porcentaje de las pacientes la persistencia de valores elevados sugeriría resistencia a la LEP. UBACyT CB03.

573. (819) AMINOLEVÚLICO DEHIDRASA Y BIOSÍNTESIS DEL HEMO EN EL HONGO DIMÓRFICO "MUCOR ROUXII"
Melito V.^{1,2}; Lombardo M.^{1,2}; Martínez M.²; Batlle A.¹
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

Gran variedad de especies fúngicas presentan dualidad fenotípica. Los eventos involucrados en el dimorfismo brindan información acerca del control de la morfología celular e infectividad de patógenos dimórficos. El pasaje de levadura a micelio, inducido por aireación del cultivo, afecta la mitocondriogénesis y por ende la síntesis de citocromos que son hemoproteínas. Si bien el camino del Hemo es regulado por la 5-aminolevúlico Sintetasa, en algunos microorganismos, como levaduras, la 5-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D) sería la reguladora. Nuestro objetivo fue estudiar en el hongo dimórfico *Mucor rouxii*, algunos parámetros de la biosíntesis del hemo en micelio, levaduras y durante la morfogénesis. Se midió el contenido de ácido 5-aminolevúlico (ALA), porfobilinógeno (PBG), porfirinas (P) y actividad de ALA-D en cultivos crecidos en presencia de ALA (10⁻⁵-10⁻³M). Para ALA 10⁻⁴M y 10⁻³M el micelio presentó una captación 7,3 y 13,0 veces mayor respecto de ALA 10⁻⁵M. En levaduras estos aumentos fueron menores: 2,2 y 3,1 veces respectivamente. Para ALA 10⁻³M en micelio se observa acumulación de ALA, PBG y P, mientras que en levaduras se observa sólo PBG y P. La actividad de ALA-D *in vitro*, fue 2,5 veces mayor en micelio y no varió en ninguno de los tipos celulares con el agregado de ALA al medio. *In vivo*, el micelio mostró

mayores variaciones del ALA-D en relación al ALA agregado. Durante la transición de levaduras a micelio sin y con ALA 10⁻⁴M desde la siembra de esporas o desde la aireación de levaduras, se encontró un camino del hemo eficientemente regulado. La aireación estimula la biosíntesis de P y actividad de ALA-D, sin acumulación significativa de precursores y P. El crecimiento en aerobiosis requiere mayor contenido de citocromos y justifica la biosíntesis más activa de P. La menor actividad de ALA-D junto a su capacidad de regular el ALA intracelular, avalarían un rol regulatorio para el ALA-D en levaduras de *Mucor rouxii*.

ONCOLOGIA 3

574. (13) EFECTO DEL ÁCIDO ALL-TRANS RETINOICO (ATRA) E INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) SOBRE LOS COMPONENTES LUMINALES Y MIOEPITELIALES DE LA LÍNEA MAMARIA MURINA TRIPLE NEGATIVA LM38-LP
Berardi D.; Díaz Bessone, M.; Flumian C.; Cirigliano S.; Bal de Kier Joffe E.; Urtreger A.; Todaro L.
Instituto de Oncología "Ángel H Roffo", Buenos Aires.

El ATRA ejerce algunos de sus efectos sobre diferenciación celular y reversión del fenotipo maligno a través de interacciones con isoformas de PKC. Previamente demostramos que el ATRA aumenta la expresión de PKC δ y disminuye PKC α en la línea LM38-LP. Tanto el tratamiento con ATRA como con el inhibidor farmacológico de PKC δ (Rottlerina) inhiben la proliferación arrestando las células en G1. Además, la inhibición de PKC α (G66976) en combinación con ATRA inhibe la proliferación induciendo apoptosis. En la línea LM38-LP, compuesta por células luminales (LEP), mioepiteliales (MEP) y stem, nos propusimos estudiar: A) La modulación de la expresión de las isoformas α y δ de PKC frente al tratamiento con ATRA en los componentes LEP y MEP B) La sensibilidad de las células LEP y MEP al tratamiento combinando de ATRA con inhibidores de PKC α/δ C) Si la reducción de la proliferación inducida por la inhibición de PKC δ es mediada por autofagia. Por RT-PCR observamos que el tratamiento con ATRA por 48h aumento los niveles de PKC δ sólo en las células LEP disminuyendo PKC α en ambas subpoblaciones. Por citometría de flujo determinamos que tanto el tratamiento con ATRA como la inhibición farmacológica de PKC α δ por 96h disminuyen la proporción de células LEP (% MEP (CD29+/CD24-); Control: 42,3 \pm 1,06; G66976: 67,4 \pm 0,87; Rottlerina: 51,6 \pm 0,18; ATRA: 51,3 \pm 0,96; ATRA/G66976: 71,3 \pm 0,4; ATRA/Rottlerina: 42,4 \pm 0,38; p \leq 0.05 vs control). Por Western Blot observamos que la inhibición de PKC δ por 48h induce un aumento de la autofagia, evidenciado por el cambio en la relación LC3-II/LC3-I (corroborado utilizando un inhibidor de la bomba de protones lisosomal). Concluimos que existe una respuesta diferencial de los componentes LEP y MEP al tratamiento con ATRA mediado posiblemente por PKC δ . La apoptosis inducida por inhibición de PKC δ , es más importante en el componente LEP de LM38-LP y el mecanismo por el cual la inhibición farmacológica de PKC δ inhibe la proliferación sería la autofagia.

575. (44) EL RECEPTOR β 2-ADRENÉRGICO REGULA EL COMPORTAMIENTO NORMAL O TUMORAL DE CÉLULAS DE MAMA HUMANA
Gargiulo L.¹; Copsel S.¹; Rivero E.¹; Davio C.²; Lüthy I.¹; Bruzzone A.¹
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Laboratorio de Farmacología de Receptores, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Trabajos previos demuestran que la epinefrina (Epi), vía la activación de receptores adrenérgicos (RA) regula de manera diferencial el comportamiento de células tumorales (MCF-7) y no tumorales (MCF-10A) de mama humana. En tal sentido, Epi disminuye la proliferación, aumenta la adhesión y disminuye la migración de las líneas no tumorales. Lo mismo ocurre cuando se

estimula con un agonista β -RA, sugiriendo una respuesta vía β -RA. En células tumorales, la Epi (al igual que los agonistas α_2 -RA) provoca un aumento de la proliferación y migración, indicando una respuesta α_2 -RA. Los mecanismos moleculares involucrados son desconocidos al presente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la causa posible de esta respuesta diferencial a la Epi entre las células tumorales y no tumorales de mama humana. Mediante ensayos de unión a radioligando demostramos una mayor expresión del β -RA ($p < 0.05$), que se correlaciona con una mayor producción de AMPc ($p < 0.001$) en los modelos de mama normal respecto al tumoral. Dicha respuesta no fue consecuencia de una cinética de desensibilización diferencial del β -RA entre ambas líneas. A fin de evaluar el efecto de la expresión diferencial del β_2 -RA sobre proliferación, adhesión y migración celular, se transfectaron ambas líneas para sobreexpresar el β_2 -RA o para disminuir su expresión utilizando siRNAs. En ambas líneas, el silenciamiento del β_2 -RA desencadenó un fenotipo más maligno, aumentando la proliferación y la migración y disminuyendo la adhesión celular ($p < 0.05$). Su sobreexpresión provocó una disminución de la proliferación y migración celular, y un aumento en la adhesión ($p < 0.05$), volviéndolas fenotípicamente menos agresivas. Este trabajo demuestra que el nivel de expresión del β_2 -RA y el consiguiente aumento en la producción de AMPc, es en parte responsable del comportamiento diferencial entre las células tumorales y no tumorales de mama humana. Éste regula procesos como proliferación, adhesión y migración celular.

576. (58) ESTUDIO DE POTENCIALES GENES CO-REGULADOS POR PROTEÍNAS TGF-BETA/SMAD Y FACTORES CORE EN CÉLULAS TUMORALES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

Ferreira Solari N.¹; Canedo L.¹; Parra G.²; Rorr C.³; Pérez-Castro C.¹

Instituto de Investigación de Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)-CONICET, Partner Institute of The Max Planck Society¹; Laboratorio de Fisiología de Proteínas, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³.

En el SNC hay tumores malignos y benignos, siendo los glioblastomas y los adenomas de hipófisis los más abundantes para cada categoría. Las células iniciadoras de tumor (CITs) que se encuentran en esos tumores, poseen propiedades similares a las de las células madres como la capacidad de autoperpetuarse y de regenerar la heterogeneidad poblacional. Las proteínas TGF β /SMAD poseen un rol clave en la biología del cáncer y en el comportamiento de las células madre embrionarias (CME). Las CME requieren además de las acciones de los factores Core (Nanog/Sox2/Oct4) para preservar su identidad. Nuestro objetivo es identificar genes candidatos expresados en CITs co-regulados por proteínas TGF β y factores del Core; y evaluar su impacto en el comportamiento tumoral. Previamente mediante el desarrollo de un nuevo algoritmo bioinformático, identificamos un grupo de genes en CME que presentan en sus regiones regulatorias sitios de unión de factores SMAD y del Core. En líneas tumorales de hipófisis y de glioma, crecidas en monocapa o en esferas autoperpetuantes, se analizó el efecto de TGF β sobre la expresión de los genes candidatos por real time PCR, Western-Blot e inmunofluorescencia. Asimismo, se evaluó la expresión de estos genes en tumores generados en ratones NOD/SCID, a partir de las mismas líneas tumorales en las distintas condiciones de cultivo. Demostramos que los genes son regulados por TGF β , aunque su modulación difiere entre las distintas líneas estudiadas. De manera similar existe una expresión diferencial de los mismos entre las distintas formas de cultivo (células en monocapa/diferenciada y esfera/indiferenciada), así como también en los tumores iniciados *in vivo*, sugiriendo la influencia de los factores Core sobre la regulación de esos genes. Una mayor comprensión de la participación de estos genes en el comportamiento tumoral podría contribuir a un mayor entendimiento de la biología de estos tumores y al desarrollo de estrategias de diagnóstico y/o terapéuticas. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11).

577. (109) AUMENTO DEL EFECTO FOTOSENSIBILIZANTE ANTITUMORAL UTILIZANDO DERIVADOS DIPEPTIDICOS DE ALA

Vallecorsa P.; Di Venosa G.; Mamone L.; Sáenz D.; Batlle A.; Casas A.

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

La Terapia Fotodinámica (TFD) implica el uso de una sustancia fotoactivable para sensibilizar y dañar el tejido en cuestión mediante la administración de luz. En el campo de la TFD el ácido 5-aminolevulínico (ALA), precursor de la Protoporfirina IX (PpIX), es uno de los compuestos más interesantes. Su eficiencia *in vivo* ciertas veces está limitada por la naturaleza hidrofílica. Una solución atractiva es la de mejorar sus propiedades físico-químicas y de liberación selectiva mediante la incorporación de derivados peptídicos cortos. El objetivo de este trabajo fue el de testear 2 nuevos derivados dipeptídicos de ALA, AcLeuALAME (LeuALA) y AcPheALAME (PheALA) en diferentes líneas celulares, para su uso en TFD. Las líneas celulares empleadas fueron: F3II y LM3 de carcinoma mamario, PAM212 de queratinocitos normales y B16 de melanoma. Para obtener valores plateau de PpIX se emplearon concentraciones de ALA entre 0,4 y 0,6 mM en todas las líneas (UF/105 células): PAM212: 30, LM3: 15, F3II: 10 y B16: 5. Por otro lado, empleando concentraciones de 0,001 mM y 0,05 mM de PheALA y LeuALA respectivamente, en las cuatro líneas, se alcanzaron valores similares a los máximos alcanzados con ALA. La aplicación de la TFD empleando 0,05 mM de derivados resultó en una Dosis Lumínica Letal 50 (DL50) de (mJ/cm²): PAM212: 34,2, F3II: 24,7, LM3: 20, y B16: 13,3 y 17,1 para PheALA y LeuALA respectivamente. Empleando dosis equimolares, el ALA no indujo ningún daño asociado a la terapia. Explantes de piel de ratón expuestos a ALA y dipéptidos, demostraron que la penetración *in vivo* de los derivados a través de la piel es diferente al efecto *in vitro*, hecho a tener en cuenta en una posible aplicación tópica de los mismos. Se concluye que los derivados dipeptídicos del ALA constituyen una herramienta promisoría en la fotosensibilización de tumores de distintas estirpes.

578. (142) ROLES DIFERENCIALES DE ANGIOTENSINA II Y ANGIOTENSINA (1-7) EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS

Cambados N.¹; Nahmod K.³; Sampayo R.²; Simian M.²; Kordon E.¹; Schere Levy C.¹

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Área de Investigación, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires²; Center for Human Immunobiology, Texas Children, USA³.

Angiotensina II (AngII) y angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)] son péptidos del sistema renina angiotensina (RAS) que median importantes funciones biológicas. 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 y comparar los roles de Ang-(1-7) y AngII en el desarrollo tumoral mamario. Encontramos que Ang-(1-7) indujo activación de MAPK y AKT con un patrón similar al de AngII en las células epiteliales mamarias no tumorales HC11. En células tumorales MDA-MB231, encontramos que AngII indujo una activación sostenida en el tiempo de factores de supervivencia como pAKT y BCL-XL, mientras que la activación inducida por Ang-(1-7) fue transitoria. En ensayos de migración realizados en células MDA-MB231, observamos que AngII indujo 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) inhibió la migración inducida por TGB1. Determinamos además que de ambas angiotensinas sólo la AngII indujo transición epitelio-mesenquimal (EMT) en células epiteliales mamarias NMuMG, tanto a nivel morfológico así como también por una inhibición significativa de la expresión

de marcadores epiteliales como E-CAD ($P < 0.0001$) y un aumento significativo de marcadores mesenquimales como fibronectina ($P < 0.005$), ambos determinados por qRT-PCR. Mediante ensayos de zimografías, encontramos que AngII indujo la actividad de MMP-9 mientras que Ang-(1-7) sólo en bajos niveles. Conclusión: En células tumorales mamarias AngII y Ang-(1-7) tendrían efectos contrapuestos. Estos resultados podrían explicar en parte el mecanismo subyacente a la estimulación del crecimiento e invasión tumoral mediados por AngII y a la inhibición del crecimiento tumoral reportado para Ang-(1-7).

579. (212) MODULACIÓN MUSCARÍNICA DEL EFECTO DEL PACLITAXEL SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA MCF-7. PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DE TUMOR

Rojó D.; Español A.; Lombardi M.; Sales M.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET.

La resistencia a la quimioterapia es un problema crítico en la terapéutica antitumoral y se especula con que las células madre de tumor (CMT) están implicadas en este efecto. El uso de combinaciones de fármacos en dosis metronómicas es una estrategia utilizada para incrementar el efecto terapéutico y disminuir los efectos adversos. Previamente demostramos que el agonista muscarínico carbacol (Carb) puede inhibir la proliferación de células tumorales de mama humana MCF-7 después de un tratamiento prolongado. En este trabajo estudiamos el efecto de la combinación de Carb con el citostático paclitaxel (Px) sobre la proliferación de células MCF-7. Por ensayos colorimétricos con el reactivo MTT determinamos que el tratamiento con Px o Carb por 40 h disminuye la proliferación en forma concentración-dependiente con un efecto máximo a 10^{-9} M ($24,7 \pm 11,9\%$) y 10^{-10} M ($77,8 \pm 9,8\%$) respectivamente ($p < 0,001$ y $p < 0,05$ vs. control). Además la combinación de una concentración subterapéutica de Px (10^{-9} M) con una concentración subóptima de Carb (10^{-11} M) produce un efecto citotóxico ($65 \pm 19,6\%$) ($p < 0,01$ vs. control) que no se observa con cada droga por separado ($p < 0,01$ vs. Carb 10^{-11} M y $p < 0,01$ vs. Px 10^{-9} M) sin producir efectos en las células normales MCF-10A. Por ensayos de citometría de flujo determinamos la presencia de una población de CMT (CD44+/CD24-) ($0,99 \pm 0,13\%$) en células MCF-7 que se redujo con Px (10^{-9} M) ($p < 0,01$ vs. control) potenciándose este efecto con Px+Carb (10^{-11} M) ($p < 0,001$ vs. control). Concluimos que el tratamiento combinado con Px+Carb potencia el efecto citotóxico individual sobre las células MCF-7 con el efecto agregado de disminuir la población de CMT lo que le confiere un posible potencial terapéutico.

580. (226) LAS METALOTIONEÍNAS COMO NUEVOS MARCADORES DE PRONÓSTICO EN CÁNCER COLORRECTAL HUMANO

Arriaga J.^{1,2}; Bravo A.³; Levy E.²; Bruno L.⁴; Morales Bayo S.⁴; Roberti M.²; Rocca Y.¹; Baffa Trasci S.²; Huertas E.⁴; Sánchez Loria F.⁴; Pairola A.⁴; Barrio M.²; Mordoh J.^{1,2,4}; Bianchini M.²
Fundación Instituto Leloir¹; Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer²; Hospital Interzonal General de Agudos HIGA Eva Perón, San Martín³; Instituto Alexander Fleming⁴; Hospital Municipal Bernardo Houssay, Vicente López, Buenos Aires⁵.

Uno de los puntos más importantes que es necesario mejorar en el manejo clínico del cáncer colorrectal (CCR) es el disponer de nuevas herramientas que permitan decidir si es necesario dar quimioterapia en pacientes con estadios intermedios, donde existe una gran heterogeneidad de evolución clínica y respuesta a la terapia. Para ello, luego de estudiar por microarrays de cDNA la expresión global de mRNAs en CCR con respecto al tejido normal, nos propusimos profundizar el estudio funcional y la posible relevancia pronóstica de una familia de proteínas surgidas de este estudio: las metalotioneínas (MTs), que son pequeñas proteínas con capacidad antioxidante y de distribuir zinc. Logramos demostrar que las MTs se encuentran disminu-

das en el epitelio tumoral, en parte debido a la hipermetilación del promotor de la isoforma 1G (MT1G). Dicha sub-expresión se acentúa con el grado de malignidad de los tejidos, desde estadios pre-malignos (adenomas) hasta la metástasis, y se encuentra asociada con una peor sobrevida de los pacientes portadores de dichos tumores, permitiendo postular a las MTs como nuevos marcadores de pronóstico. Experimentos en líneas celulares colorrectales evidencian que la re-expresión de la MT1G produce un enlentecimiento del crecimiento tumoral o un mayor grado de diferenciación, dependiendo de la línea celular utilizada, lo que puede explicar la menor agresividad de estos tumores. Asimismo, también sensibiliza a las líneas a agentes quimioterápicos utilizados en la clínica colorrectal, produciendo una mayor activación del gen supresor tumoral p53. Lo que es más, la medición conjunta de las MTs junto con la expresión de p53 en tumores humanos es un marcador pronóstico independiente del estadio tumoral en pacientes con estadios Dukes B y C de dicha enfermedad. Así, combinamos estudios pronósticos a partir de tejidos tumorales humanos, con estudios moleculares y funcionales en líneas celulares para intentar explicar los resultados obtenidos y sustentar la propuesta de las MTs como nuevos marcadores de pronóstico en CCR. Esperamos que estos resultados lleven en un futuro a mejorar el manejo clínico de esta enfermedad, especialmente en los estadios II y III donde se requieren de más herramientas para la importante decisión de si dar quimioterapia o no.

581. (232) LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE CTBP1 EN LÍNEAS TUMORALES DE MAMA INDUCE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Dalton N.^{1,2}; De Luca P.^{1,2}; Zalazar F.^{1,2}; Moiola C.^{1,2}; Vázquez E.²; De Siervi A.^{1,2}

Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Laboratorio de Inflamación y Cáncer, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama postmenopáusico y está asociado con el alto grado de tumores de mama. *C-terminal Binding Protein* (CtBP1) es un co-represor transcripcional de genes supresores tumorales que se activa por alta energía (NADH). Previamente encontramos que el aumento del NADH, que proviene de la activación persistente de la glucólisis, activa la unión de CtBP1 al promotor de BRCA1 reprimiéndolo. Sin embargo, aún no está claro el rol de la activación de la vía de CtBP1 en el desarrollo tumoral mamario. En este trabajo estudiamos los efectos de la activación de la vía de CtBP1 sobre la proliferación celular. Para ello utilizamos dos líneas tumorales de mama, MCF7 y MDA MB231, que presentan bajos o altos niveles de expresión de CtBP1, respectivamente. También, utilizamos líneas celulares MDA MB 231 transfectadas en forma estable con el plásmido shCtBP1 o control. Utilizando estas líneas desarrollamos tres modelos de inducción de la vía de CtBP1: i) medio de cultivo adicionado con suero de ratones hembras que fueron alimentados con dieta alta en grasa (SDG) o control (SDC) durante 16 semanas; ii) Medio de cultivo adicionado con distintas concentraciones de suero fetal bovino (SFB); iii) crecimiento celular durante 3 meses en medio de baja (LG) o alta glucosa (HG). Los resultados mostraron que el SDG aumentó significativamente la viabilidad y expresión de ciclina D1 en la línea MDA MB 231. Es interesante resaltar que el silenciamiento de la expresión de CtBP1 disminuyó significativamente este efecto. Además, el silenciamiento de CtBP1 inhibió la proliferación cuando estas líneas fueron tratadas con bajas concentraciones de SFB. Finalmente, el crecimiento de las células MDA MB 231 en medio HG indujo significativamente la expresión de CtBP1 y la proliferación celular con respecto al medio LG. En conclusión, la activación de la vía de CtBP1 aumenta la proliferación de células de cáncer de mama.

582. (243) IMPLICANCIA DE LOS RECEPTORES RETINOIDES RAR α Y RAR γ EN EL CRECIMIENTO Y AUTORENOVA-

CIÓN DE LOS COMPONENTES CELULARES DE LA LÍNEA MAMARIA MURINA LM38-LP

Flumian C.; Berardi D.; Bessone M.; Cirigliano S.; Bal de Kier JofFe E.; Urtreger A.; Todaro L.

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

En la actualidad, los retinoides (Rds) están siendo utilizados en ensayos clínicos para el tratamiento y la prevención del cáncer dado su rol en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular. Utilizando la línea celular LM38-LP, compuesta por células luminales (LEP), mioepiteliales (MEP) y stem/progenitoras (SP) nos propusimos evaluar la participación de los receptores retinoides RAR α y RAR γ en la regulación del crecimiento celular, la modulación de la proporción de células LEP vs. MEP y el mantenimiento y crecimiento de células SP. Para ello, células de la línea LM38-LP se trataron con distintos agonistas y/o antagonistas de las isoformas α y γ de los RARs y se evaluaron tanto el crecimiento en monocapa como la capacidad de estas células de formar mamosferas. Mediante recuento celular directo pudimos determinar que el tratamiento con AM580 (agonista RAR α , 200 nM) combinado con MM (antagonista RAR γ 50 nM) disminuyó la proliferación luego de 144h. Mientras que los tratamientos con MM, Ro41 (antagonista RAR α , 2 μ M), BMS (agonista RAR γ , 50 nM) y sus combinaciones no tuvieron efecto en la proliferación. Por citometría de flujo pudimos establecer que todos los tratamientos retinoides disminuyeron la relación LEP/MEP (CD24+CD29+/CD24-CD29+). En relación a las SP, observamos que los pre-tratamientos con AM580, MM, AM580+MM y BMS+Ro41 aumentaron la capacidad de la línea LM38-LP de formar mamosferas y mientras BMS, Ro41 y BMS+Ro41 aumentaron el diámetro promedio de las mismas, el AM580 indujo el efecto inverso. Podemos concluir que tanto RAR α como RAR γ están involucrados en el mantenimiento de la proporción entre LEP y MEP, siendo la activación de RAR α y la inhibición farmacológica de RAR γ lo que conlleva a la inhibición del crecimiento de LM38-LP. Además, RAR α estaría participando en la supervivencia de las SP, mientras que RAR γ estaría involucrado en el crecimiento de este componente celular.

583. (270) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE DROGAS QUIMIOTERAPÉUTICAS. ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Diaz Flaque M.; Cayrol F.; Aschero R.; Sterle H.; Valli E.; Barreiro Arcos M.; Cremaschi G.

Instituto de Investigaciones Biomédicas-CONICET, Universidad Católica Argentina, Buenos Aires.

El citocromo P450 (CYP) es una familia de enzimas que metabolizan medicamentos utilizados en quimioterapia. Es determinante conocer el patrón de expresión de estas enzimas en cada paciente al momento de iniciar el tratamiento quimioterapéutico. Las hormonas tiroideas (HT), son reguladoras del metabolismo y de fisiología de la mayoría de los tejidos normales. En este trabajo, estudiamos la capacidad de las HT de regular la expresión de las enzimas CYP en células de linfoma T (LT). Trabajos previos de nuestro laboratorio, demostraron que las HT, actúan regulando la fisiología de los LT a través de mecanismos no genómicos activados por un receptor de membrana (mTR), la integrina α V β 3. Para diferenciar los efectos genómicos mediados por receptores nucleares (TR) de los no genómicos inducidos por el mTR, se usaron HT libres y acopladas a agarosa (HT-ag, incapaces de entrar a la célula) y se evaluó su efecto sobre la expresión de los CYP en células de LT humano, Jurkat. El tratamiento durante 18 hs con HT libres y HT-ag indujo un incremento de 4 veces del ARNm del CYP 3A4 (n= 5, p<0.05). El pre-tratamiento de las células Jurkat, con el péptido RGD (inhibidor de acciones no genómicas de HT por unión a la integrina α V β 3), inhibió el incremento del ARNm de CYP3A4 inducido por HT en un 98 \pm 9%. Adicionalmente, se generaron tumores sólidos del linfoma T murino EL-4 en ratones controles (rC), hipotiroideos (rh) e hipertiroideos (rH) singéneos. En los tumores e hígados provenientes de rH, se vio un aumento del ARNm de CYP (2 veces y 6 veces respectivamente, n=4), mientras que en los rh, se vio una disminución (1 vez en ambos casos,

n=4) con respecto a los rC. Estos resultados indican que las HT modulan la expresión de enzimas CYP, a través de la activación de mecanismos que incluyen a efectos no genómicos mediados por el mTR. Estos resultados indicarían la importancia de evaluar el estado tiroideo en pacientes con LT durante la aplicación de regímenes terapéuticos.

584. (277) DESARROLLO DE ANTICUERPOS DE DOMINIO ÚNICO DE LLAMA (VHH) CONTRA ANTÍGENOS DE MELANOMA HUMANO

Lacru M.¹; Arriaga J.¹; Blanco P.²; Bravo A.³; Mordoh J.^{1,2}; Urrutia M.¹

Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET¹; Centro de Investigaciones Oncológicas (CIO-FUCA)²; Unidad de Inmunopatología HIGA Eva Perón, Buenos Aires³.

El melanoma cutáneo (MC) es un tumor maligno cuya tasa de incidencia y mortalidad están en aumento en varias regiones del mundo. Si el MC se detecta tempranamente, es curable por simple excisión quirúrgica; pero una vez que metastatiza, su pronóstico empeora y resulta refractario a la mayoría de las terapias. Nos propusimos desarrollar anticuerpos (Acs) mediante una nueva estrategia, como es el *display* en fagos de Acs de dominio único o VHHs. Los VHHs, compuestos sólo por la región variable de la cadena pesada, tienen la ventaja de identificar epítopos distintos de los reconocidos por los Acs convencionales. Para lograr el objetivo propuesto, se inmunizaron 2 llamas con 3 líneas de melanoma humano metastásico (MHM) y a partir de sangre de las mismas se construyó una biblioteca de VHHs. La biblioteca obtenida constó de tamaño adecuado (1.7 x 10⁷ clones) y buena diversidad, identificándose post-digestión con enzimas de restricción de alta frecuencia de reconocimiento 9 patrones distintos entre 20 clones evaluados. Con el fin de enriquecer el pool de fagos-VHH de la biblioteca en Acs específicos contra melanoma, se realizaron rondas de enfrentamientos de fagos-VHH a 2 tipos celulares: células de MHM para conservar Acs que reconocen Ags tumorales, y a células negativas (eritrocitos) para sustraer Acs que reconocen Ags comunes a otras células humanas. Durante el enriquecimiento de los VHHs, se observó mediante ELISA que la reactividad del pool de fagos-VHH que reconocen Ags de MHM aumentó a medida que transcurrieron las rondas del enriquecimiento (DO_{490nm} = 0.19, 0.45, 0.73 y 1.25, para post 1^o, 3^o, 4^o y 5^o ronda respectivamente). Con el fin de seleccionar VHHs que reconocen Ags de membrana, se enfrentaron clones de fagos-VHH post 3^o ronda a líneas y tejidos de MHM. Identificamos grupos de fagos-VHH que reconocen células tumorales en biopsias de pacientes por inmunohistoquímica. También identificamos clones reactivos contra líneas de MHM por inmunocitoquímica.

585. (320) EVALUACIÓN DE AGONISTAS DE TLR PARA SU USO COMO CO-ADYUVANTES DE VACUNAS ANTITUMORALES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Moreno Ayala M.¹; Klein S.²; Bal de Kier JofFe E.²; Castro M.³; Seilicovich A.¹; Candolfi M.¹.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Área Investigación Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires, Argentina²; Neurosurgery, Department of Cell and Developmental Biology, University Of Michigan, School of Medicine, USA³.

Para optimizar la producción de vacunas antitumorales de células dendríticas (CDs), evaluamos la eficacia de CDs activadas con agonistas de receptores tipo toll (TLR) en dos modelos murinos de cáncer de mama. Primero comparamos distintos protocolos para el cultivo de CDs. Precursores de médula ósea de ratones Balb/c fueron incubados con IL4+GMCSF o con IL6+Ftl3L por 7-14 días. La incubación con IL4+GMCSF tuvo un mayor rendimiento y pureza (~1x10⁵cél/ratón: 65-90% CDs) que con IL6+Ftl3L (~0.5x10⁵cél/ratón: 5-30% CDs). Por ello, utilizamos vacunas de CDs obtenidas con IL4+GMCSF para tratar a ratones portadores de carcinomas mamarios LM3 o 4T1. Las CDs fueron incubadas con lisados tumorales y activadas con un agonista de

TLR9 (CpG₁₈₂₁), un agonista de TLR7/8 (R848) o la combinación de ambos. Estas vacunas fueron administradas 14d y 24hs antes de la inoculación tumoral. Sólo la vacuna activada con CpG promovió sobrevida a largo plazo en ratones portadores de tumores LM3 (25%, log rank) e inhibió el desarrollo de metástasis pulmonares ($p < 0.05$ vs control, Kruskal Wallis). Sin embargo, el efecto antitumoral de estas vacunas fue bloqueado cuando CpG fue combinado con R848. Las CDs activadas con CpG también tuvieron un efecto antitumoral en ratones portadores de tumores 4T1, en los cuales inhibieron la progresión tumoral. Sin embargo, en este modelo más agresivo, no promovieron sobrevida a largo plazo ni inhibieron el desarrollo de metástasis. Cuando evaluamos la activación de CDs *in vitro* observamos que CpG+R848 produjo una disminución más rápida de la viabilidad de CDs que CpG solo (Mortalidad_{96h}: $50 \pm 3.5\%$ vs $35 \pm 3.5\%$; $p < 0.05$, ANOVA). Además, la combinación de CpG y R848 inhibió el aumento de expresión de CD86 inducido por CpG (G_{mean} : 112 vs 290). Nuestros resultados indican que CpG es mejor co-adyuvante para vacunas de CDs que R848. Los agonistas de TLR7/8 parecen inhibir los efectos proinflamatorios de CpG, y su utilización como coadyuvantes de vacunas sería desfavorable.

586. (346) LOS TUMORES DE PÁNCREAS EVADEN LOS EFECTOS POR-APOPTÓTICOS DE LA GEMCITABINA EXACERBANDO LA AUTOFAGIA

Papademetrio D.; Cavaliere V.; Costantino S.; Álvarez E. *Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Los adenocarcinomas ductales de páncreas (PDA) corresponden al 95% de los tumores del páncreas, con una sobrevida de 5 meses. Una de las causas asociadas a la agresividad es la resistencia a la quimio/radioterapia. El objetivo del trabajo fue estudiar si la gemcitabina es capaz de inducir apoptosis de células de PDA luego de la inhibición de la autofagia, *in vitro* e *in vivo*. Se analizó la capacidad de la gemcitabina de inducir apoptosis sola o post-tratamiento con 3-MA en las líneas MIAPaCa-2 y PANC-1, mediante ensayos de TUNEL. La gemcitabina, en todas las dosis evaluadas, incrementó un 30% la apoptosis luego de la inhibición de la autofagia ($p < 0.001$). El tratamiento de MIAPaCa-2 y PANC-1 produjo un ($44,5 \pm 4,8\%$) y ($23,7 \pm 4,4\%$) de apoptosis respectivamente. Luego del pre-tratamiento con 3-MA, se alcanzaron valores de ($70,1 \pm 8,3\%$) y ($41,1 \pm 6,1\%$). Estudiamos la dependencia de caspasas en la muerte apoptótica. El inhibidor de pan-caspasas z-VAD-fmk redujo los porcentajes en un 65% ($p < 0.001$) en MIAPaCa-2, pero no produjo cambios en PANC-1. Luego se analizaron los niveles de pro-caspasa 3, de clivaje de PARP y la re-localización de AIF. Además se evaluó la actividad de caspasas 3/7. Se observó que la gemcitabina combinada con 3-MA produjo muerte apoptótica dependiente de caspasas en las células MIAPaCa-2, mientras que la línea PANC-1 resultó ser caspasa-independiente. Por último, estudiamos el efecto de los tratamientos sobre el tamaño de tumores xenogénicos generados por inyección sc. de las células MIAPaCa-2 en ratones nude. Evaluamos mediante microscopía electrónica la morfología celular, vimos que tanto la gemcitabina sola como luego del tratamiento con 3-MA redujeron el volumen tumoral, sin embargo, la gemcitabina sola produjo una exacerbación del proceso autofágico mientras que luego de la 3-MA, fue capaz de inducir apoptosis. Nuestros resultados en conjunto sugieren que la autofagia es el mecanismo responsable de la resistencia a la gemcitabina.

587. (356) EL METIL ESTER DE NITRO-L-ARGININA (L-NAME) REGULA EL NÚMERO DE CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS EN LOS GANGLIOS DRENANTES DE TUMORES DE VEJIGA MB49

Balarino N.; Langle Y.; Belgorosky D.; Prack Mc Cormick B.; Marino L.; Sandes E.; Eijan A. *Área Investigación, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.*

La instilación endovesical con Bacilo Calmette Guerin (BCG) es el tratamiento estándar para pacientes con cáncer de vejiga

(CaV) no músculo invasor (NMI) localmente avanzado. Se ha reportado que la producción de óxido nítrico (NO) podría oponerse a la inmunoterapia con BCG. El NO es producido por las enzimas NO sintasas (NOS). Anteriormente demostramos que la expresión de la isoforma inducible (iNOS) en CaV humano se asociada a un pronóstico desfavorable. La línea murina MB49 genera tumores NMI, expresa iNOS y es productora de NO. Resultados preliminares indican que el inhibidor de la producción de NO, L-NAME (Ki 4.4 μ M para iNOS), reduce el crecimiento tumoral concomitante con la disminución de la proteína S100A9. La expresión de S100A9 se asocia con el reclutamiento de células supresoras derivadas del linaje mielóide (MDSC) induciendo un perfil supresor de la respuesta inmunológica. Objetivo: analizar el contenido de MDSC en tumor, ganglio y bazo de ratones portadores del tumor MB49 bajo tratamiento con L-NAME +/-BCG. Materiales y métodos: Ratones C57BL/6J inoculados s.c. con 3×10^5 cel MB49/ratón, fueron tratados con BCG (2mg/ml) +/- L-NAME (0.1g/kg ratón). Se determinó tamaño tumoral, expresión de S100A9 por inmunohistoquímica y número de MDSC (CD11b+, GR1+) por citometría de flujo. Resultados: En bazo y en ganglio drenante de los tumores MB49 se encontró un aumento de 4 veces en el número de MDSC ($p < 0,05$). El tratamiento con L-NAME +/- BCG inhibe el crecimiento tumoral ($p < 0,05$), reduce la expresión de S100A9 y disminuye el porcentaje de células MDSC en ganglio drenante ($p < 0.05$) sin modificarlo en ganglio contralateral. Solo el tratamiento con BCG+L-NAME fue capaz de normalizar el número de MDSC en bazo ($p < 0,05$). Conclusión: La inhibición del crecimiento del CaV MB49 inducida por L-NAME+BCG estaría asociado a la modulación de la respuesta inmune evidenciado por disminución de MDSC.

588. (387) MUSKELINA Y HEMO OXIGENASA 1 (HO-1): NUEVA ASOCIACIÓN CLAVE CAPAZ DE MODULAR LA MORFOLOGÍA CELULAR EN EL CÁNCER DE PROSTATA

Paez A.¹; Valacco P.²; Toscani M.¹; Binaghi M.¹; Vázquez E.¹; Gueron G.¹

Departamento de Química Biológica, Facultad De Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN- CONICET¹; Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectroscopia MALDI-TOF (CEQUIBIEM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

La hemo-oxigenasa 1 (HO-1) es la enzima limitante en la degradación del hemo. Sin embargo, varios trabajos demostraron que HO-1 cumple una función más allá de su actividad enzimática. HO-1 ejerce un rol anti-tumoral en el cáncer de próstata (PCa) inhibiendo la proliferación, migración e invasión y retardando el crecimiento tumoral *in vivo*. Previamente documentamos su expresión nuclear en carcinomas primarios de próstata en humanos. 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 utilizamos un abordaje proteómico para encontrar los interactores moleculares de HO-1, a través de los cuales esta proteína estaría ejerciendo sus funciones. 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 espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF (Ultraflex II). Las masas peptídicas obtenidas por esta vía (huellas peptídicas) se volcaron en el software Mascot. Los resultados preliminares muestran que HO-1 interactúa con muskelina (MKLN) un mediador intracelular de la adhesión, relacionado con la comunicación entre la membrana celular y el núcleo y ligado a la regulación de la morfología celular. Líneas de PCa que sobre-expresan HO-1 exhibieron altos niveles de MKLN (RT-qPCR e inmunofluorescencia), molécula que además cumple funciones como factor de transcripción. También se comprobó un mayor grado de co-localización nuclear (verificado por los valores del coeficiente de Manders) entre HO-1 y muskelina cuando se indujo la expresión celular de HO-1. Este es el primer abordaje en la construcción del interactoma de HO-1 que nos permitirá la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos novedales o factores pronóstico para el PCa.

589. (392) EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR FOTOACTIVACIÓN DE TETRAACETATO DE RIBOFLAVINA INDUCE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOSO

Juárez A.¹; Del Valle Sosa L.¹; Leimgruber C.¹; Torres A.¹; Haggi E.²; Pons P.¹

Centro de Microscopia Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba¹; División Tecnología Unidad Académica Río Gallegos, Universidad Nacional de la Patagonia Austral².

La fotoactivación de tetraacetato de riboflavina (RTA) conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), por lo que podría ser aplicado en Terapia Fotodinámica (TFD). Ésta consiste en la activación de un fotosensibilizador con luz visible lo que produce la muerte celular por formación de ERO. El objetivo fue estudiar el efecto de las ERO generadas por fotoactivación de RTA en células humanas de carcinoma escamoso SCC-13. Se determinó que RTA es fotoestable y tiene capacidad de generar oxígeno singlete empleando como sonda 9,10-dimetilantraceno. Para evaluar el efecto de la TFD en células tumorales se empleó la línea SCC-13 incubadas en medio DMEM con RTA 50µM por 3h y se irradiaron con λ 444nm (4.5, 9 y 18J/cm²). Se demostró que la RTA no es citotóxica pero fotoactivada genera disminución de la viabilidad y proliferación en forma dosis de luz dependiente. Se observaron variaciones del ciclo celular con aumento en las fases S y G2/M vs control. Los estudios morfológicos ultraestructurales mostraron que las células sometidas a TFD presentan condensación de cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. La presencia de apoptosis se corroboró por citometría de flujo con Anexina V/7AAD y técnica TUNEL. Se observó clivaje de PARP y disminución de procaspasa 3 demostrando que la apoptosis inducida es caspasa dependiente. Se determinó que la citotoxicidad de la TFD se debe al aumento de los niveles intracelulares de ERO detectados con 2,7-dihidrocloro fluoresceína. Para comprobar la efectividad de la TFD *in vivo*, se aplicó RTA en epidermis hiperplásica de ratones SKH: HR1 tratados con laurilsulfato de sodio y se iluminó 18J/cm², logrando reducción de la hiperplasia en un 49 y 44% en hembras y machos respectivamente. Estos resultados sugieren que RTA es un compuesto fotoestable y su fotoactivación genera estrés oxidativo produciendo la muerte celular por apoptosis, por lo cual podría ser un efectivo fotosensibilizador en la aplicación de TFD.

590. (407) EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y VÍAS DE MUERTE INDUCIDAS POR NANOPARTÍCULAS DE SILICIO INCORPORADAS A CÉLULAS NEURO2-A DE NEUROBLASTOMA DE RATÓN. POTENCIAL APLICACIÓN EN TERAPIA RADIANTE

Miglietta E.; Porte Alcon S.; Gorojod R.; Alaimo A.; Kotler M.

Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-Oncología, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN- CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

El neuroblastoma es el tumor extracraneal sólido más frecuente en niños menores de cinco años y se caracteriza por una alta resistencia a la radioterapia convencional. Las nanopartículas de silicio (NPSi) han sido propuestas como posibles radiosensibilizadores por inducir la formación de ROS al ser irradiadas dentro de la célula tumoral. Objetivos: evaluar la toxicidad de NPSi derivatizadas con 2-propen-1-amina (NPSi-NH₂, 1-3nm) en un modelo *in vitro* de neuroblastoma murino (Neuro-2a) y el tipo de muerte celular involucrada. Seleccionar las condiciones experimentales apropiadas para futuros experimentos implicando radiación ionizante. Resultados: La viabilidad celular medida por MTT y Rojo Neutro (RN) mostró una disminución del 59±4% (p<0,001) y 28±4% (p<0,001) respectivamente por exposición a 50µg/ml de NPSi-NH₂ por 24hs. En cambio, 10µg/ml de NPSi-NH₂ por 24hs no causaron pérdida significativa de la viabilidad. La tinción nuclear con Hoechst 33258 mostró un aumento dosis

dependiente en la frecuencia de aberraciones morfológicas tales como núcleos irregulares (200%) y lobulados (450%). La relación entre los niveles de Bax y Bcl-2 medidos por Western Blot así como la ausencia de morfologías apoptóticas clásicas (núcleos condensados y fragmentados y burbujeo de la membrana celular) sugieren que la muerte inducida por las NPSi-NH₂ no sigue una vía apoptótica. El análisis de la morfología celular sugirió la ocurrencia de muerte por necroptosis. Sin embargo, la pre-incubación con el inhibidor de RIP1 quinasa, necrostatina-1, (25-100µM) no previno la pérdida de viabilidad celular (medida por MTT y RN) indicando que la necroptosis no está comprometida. Conclusiones: las NP-Si-NH₂, que resultan aptas para la unión de moléculas proteicas y "targeting" a tumores, no presentan citotoxicidad a 10µg/ml, una concentración reportada como tóxica para la mayoría de las NP. Estudios futuros aportarán datos para la completa elucidación del tipo de muerte celular implicado.

591. (440) PAPEL DE GPC3 EN LA PROGRESIÓN TUMORAL MAMARIA HUMANA: DESARROLLO DE UN MODELO PRE-CLÍNICO

Castillo L¹; Tascón R.¹; Ferreira Dos Santos A.²; Bal de Kier Joffe E.¹; Labriola L.²; Peters M.¹

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires¹; Laboratorio de Mecanismos Moleculares de Citoprotección, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad de San Pablo, Brasil².

La reexpresión de GPC3 en el adenocarcinoma mamario murino LM3 indujo una inhibición de su capacidad metastásica. Dada su importancia clínica, nos propusimos desarrollar un modelo humano para analizar el rol del glicoproteína en la progresión tumoral mamaria. Evaluamos la expresión de GPC3 en líneas celulares de cáncer de mama humano por qPCR. Los niveles del glicoproteína fueron inversamente proporcionales a la capacidad metastásica. Seleccionamos a MCF-7 y MDA-MB231 para modificarlas genéticamente. La expresión de GPC3 fue bloqueada por siRNA en la línea MCF-7 (inhibición mayor al 75%), mientras que el glicoproteína fue sobreexpresado en MDA-MB231 a través de infecciones virales (200 veces más mRNA GPC3). Las células MDA-MB231-GPC3 presentaron mayor velocidad de proliferación en monocapa (Tiempo de duplicación poblacional: -GPC3 48h vs control 25h, p<0,01), aunque su capacidad clonogénica fue menor (Colonias: -GPC3 8 vs control 40, p<0,001). Las células MCF-7-shGPC3 proliferaron más rápido que las -shCN (Tiempo de duplicación poblacional: -shGPC3 72h vs control 87h, p<0,001), siendo también mayor su capacidad clonogénica (Colonias: -shGPC3 130 vs control 37 colonias, p<0,001). En relación a la viabilidad, el 70% de las MDA-MB231-GPC3 sobrevivió al hambre de 96 h, en comparación al 100% de las -GFP (p<0,05). El silenciamiento de GPC3 provocó una disminución del 15% en la viabilidad de MCF-7 (p<0,05). Determinamos que las células MDA-MB231-GPC3 fueron menos migrantes (Cobertura de herida: -GPC3 20% vs control 100%, p<0,001), mientras que las MCF-7-shGPC3 resultaron más móviles (Cobertura de herida: -shGPC3 15% vs control 2%, p<0,001). Finalmente, las MDA-MB231-GPC3 se mostraron menos adherentes entre sí (Agregación: -GPC3 33% vs control 83%, p<0,05), al contrario que las MCF-7-shGPC3 que presentaron un aumento en su adhesión homotípica (Agregación: -shGPC3 56% vs control 21%, p<0,05). Nuestros resultados revelan la importancia de GPC3 en la biología del cáncer de mama humano.

592. (445) EVALUACIÓN DEL DAÑO AL ADN Y SU REPARACIÓN INDUCIDOS POR LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN TIROIDES

Rodríguez C.¹; Carpano M.¹; Perona M.¹; Thorp S.¹; Curotto P.¹; Pozzi E.¹; Casal M.²; Juvenal G.^{1,3}; Pisarev M.^{1,3}; Dagrosa A.^{1,3}

Comisión Nacional de Energía Atómica¹; Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"²; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³.

Introducción: Previamente comenzamos el estudio de los mecanismos de daño y reparación inducidos por la radioterapia con

boro en células tumorales de tiroides. Observamos una diferencia tanto en la cantidad de ADN dañado como en los patrones de expresión génica de las enzimas de reparación en células irradiadas con radiación gamma, con neutrones solos y con neutrones más boronofenilalanina (BPA). El objetivo de estos estudios fue profundizar el análisis de los patrones de daño y reparación en células tumorales tiroideas irradiadas midiendo el diámetro de los focos de la histona H2AX fosforilada y la expresión de las proteínas Ku70 y Rad51, principales componentes 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 distribuidas en los siguientes grupos: 1) BPA (10 µg/10B/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 (flujo= 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 de 3 Gy (±10%). La expresión de las enzimas Ku70 y Rad51 fue analizada por Western Blot a diferentes tiempos (2, 4, 6, 24 y 48 h) y el daño al ADN se midió por inmunofluorescencia con el anticuerpo anti gamma H2AX. 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) 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 de Ku70 no se vieron modificados en los grupos irradiados respecto al control. Los focos de la histona gamma H2AX mostraron ser de mayor diámetro para el grupo BNCT. Conclusión: Estos resultados sustentan la hipótesis de una activación diferencial de la vía HRR en las células de carcinoma de tiroides tratadas con BNCT durante la reparación del ADN dañado. La vía NHEJ no mostró variaciones en la expresión de sus enzimas en células irradiadas respecto a las no irradiadas.

593. (466) EFECTOS DE GANODERMA LUCIDUM SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA CELULAR ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO

Ferronato M.¹; Obiol D.¹; Bidegain M.²; Gandini N.¹; Alonso E.¹; Salomón D.¹; Cubitto M.²; Curvetto N.²; Curino A.¹; Facchinetti M.¹

Laboratorio de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET¹; Laboratorio de Hongos Medicinales y Comestibles, CERZOS-CONICET².

Ganoderma *lucidum* es un hongo que se ha empleado con fines medicinales desde hace milenios en países orientales. Muchas son las actividades que se le atribuyen tales como efectos antiinflamatorios, antineoplásicos y antioxidantes. Los objetivos del presente trabajo fueron investigar si el extracto de G. *lucidum* posee efectos antitumorales en carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello (CCECC) y comenzar a evaluar si los mismos son consecuencia de la actividad antioxidante. Para ello utilizamos las líneas humanas HN12 y HN13 con el fin de estudiar los efectos del extracto sobre la supervivencia y migración celular. Se comenzó con la extracción alcohólica de los triterpenoides de las esporas que se conoce que contienen la mayor actividad antitumoral. Se ensayaron diferentes diluciones del extracto sobre la supervivencia de la línea HN13, observando un efecto inhibitorio de la misma, dependiente de la concentración (p < 0.001, ANOVA). A partir de los datos obtenidos se calculó la concentración inhibitoria media (IC50) y con la misma se realizaron estudios de migración utilizando el ensayo de la herida. Se observó que el extracto triterpénico también reducía marcadamente la migración celular (p < 0.001, ANOVA) respecto de las células tratadas con el vehículo (isopropanol). Además, el tratamiento con el extracto hizo aumentar los niveles de HO-1. Más aún, el extracto incrementó los niveles de HO-1 un 900% más que el tratamiento con el activador usual de la enzima (hemina 100 µM). Se repitieron los ensayos en la línea HN12, obteniéndose resultados similares. En conclusión, los datos muestran que los triterpenoides obtenidos de la fracción alcohólica

de las esporas de Ganoderma *lucidum* poseen actividad antitumoral en las líneas de CCECC, manifestada como una reducción de la supervivencia y de la migración celulares. El aumento en la expresión de la enzima HO-1 observados sugiere que se activan mecanismos antioxidantes que podrían estar involucrados en los efectos observados.

594. (480) ANÁLISIS DE VARIABLES QUE AFECTAN EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA REALIZACIÓN DE MICROARREGLOS: PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO PARA TUMORES DE MAMA

Chirico D.¹; Sendoya J.¹; Rotondaro C.¹; Fresno C.²; Fernandez E.²; Bravo I.³; Trincherro A.³; Llera A.¹; Podhajcer O.¹; United States-Latin America Cancer Research Network⁴.

Fundación Instituto Leloir¹; Universidad Católica de Córdoba²; Hospital Eva Perón³; Red US-LACRN (NCI, Argentina, Uruguay, Chile, México, Brasil)⁴.

El estudio del cáncer mediante microarreglos ha contribuido a caracterizar molecularmente a los tumores a partir de las variaciones en la expresión de genes y esta caracterización es actualmente utilizada para pronosticar recurrencia de cáncer y respuesta a quimioterapia. En el marco de un proyecto de análisis de perfiles moleculares en cáncer de mama de la Red de Investigación de Cáncer de Estados Unidos y América Latina (US-LACRN), nuestro laboratorio colecta y procesa muestras de tejido tumoral de pacientes siguiendo protocolos estandarizados. El ARN de estas muestras se destina al estudio de expresión de genes por microarreglos. Con el objetivo de identificar variables no contempladas en la estandarización que podían afectar la calidad del ARN obtenido, se estudiaron, en 206 bioespecímenes, los efectos del tipo de material (i.e. biopsia core o pieza quirúrgica), forma de congelación de la pieza (i.e. con o sin isopentano), porcentaje de ruptura del tejido, índice lipídico y otras variables sobre el RIN (índice de integridad que evalúa calidad) y masa del ARN obtenido. En general las variables analizadas no afectaron significativamente la calidad y/o rendimiento de ARN. Tanto las biopsias como las cirugías rindieron ARN que superó los criterios establecidos para su utilización de microarreglos. Un alto índice lipídico y un bajo porcentaje de ruptura de la muestra mostraron una tendencia a afectar negativamente el RIN aunque no de manera estadísticamente significativa. La inclusión de isopentano como medio de congelación sí mejoró significativamente la probabilidad de obtener RIN mayores a 6 (p<0.05). Se comprobó que 147 (97%) de las 151 amplificaciones/marcaciones realizadas con ARN de RIN mayor a 6 superaron los umbrales de calidad aceptables para la hibridización. Concluimos que una estandarización cuidadosa de los procedimientos de colección de bioespecímenes redundará en una calidad de ARN suficiente para la realización exitosa de microarreglos.

595. (492) MAGEB2 ES UNA PROTEÍNA TUMORAL ASOCIADA A LOS RIBOSOMAS QUE ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN CELULAR

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, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN - CONICET¹; Laboratorio Nazionale CIB, Area Science Park, 34012-Trieste, Italia².

La familia de los genes MAGE-A, B y C tiene expresión específica en células tumorales y en células normales de la línea germinal. Nuestros y otros trabajos indican que la expresión en células tumorales de la mayoría de las proteínas de la subfamilia MAGE-A causa resistencia a la muerte y arresto celular, localizan en el núcleo y funcionan como reguladores transcripcionales. Nuestro objetivo es caracterizar miembros de la subfamilia MAGE-B: comenzamos estudiando a la proteína MageB2. Observamos que su expresión causa un aumento de la proliferación celular conjuntamente con la activación del factor E2F1. La sobreexpresión

de GFP-MageB2, a diferencia de las proteínas MAGE-A, localiza principalmente en los nucléolos y levemente en citoplasma. La delección de la secuencia de localización nucleolar (NoLS) en su extremo N-terminal o el estrés ribosomal causan su deslocalización de los nucléolos. En este trabajo reportamos que mediante inmunopurificación MageB2 interacciona con proteínas nucleolares y ribosomales y une ARN ribosomal. Además, el subfraccionamiento celular mostró a MageB2 endógeno en citoplasma, núcleo y nucléolo co-purificado con sus respectivos marcadores. Estos resultados nos sugirieron una asociación entre MageB2 y los ribosomas. Esta hipótesis fue confirmada mediante la purificación de ribosomas. Por otro lado, el oncogen c-Myc, un potente activador de la biosíntesis ribosomal, al co-expresarse con GFP-ΔNoLS MageB2 causa su relocalización al nucléolo, sugiriendo que c-Myc recluta a MageB2 cuando aumenta la biosíntesis ribosomal. Observamos también que el silenciamiento de MageB2 enlentece el procesamiento de ARN ribosomal, disminuyendo la cantidad de ARN ribosomal 28s y 18s, mientras que su sobreexpresión causa un aumento en la traducción ensayada por genes reporteros. Nuestro reporte es el primero que muestra una proteína MAGE asociada con procesos de gran importancia como la regulación de la traducción para la proliferación y crecimiento tumoral.

- 596. (496) EFECTO DEL ÁCIDO ALL-TRANS RETINOICO (ATRA) E INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) SOBRE EL CRECIMIENTO Y AUTORENOVACIÓN DEL COMPONENTE STEM/PROGENITOR (SP) DE LA LÍNEA MAMARIA MURINA LM38-LP** Berardi D.; Flumian C.; Diaz Bessone M.; Cirigliano S.; Bal de Kier Joffe E.; Urtreger A.; Todaro L.
Instituto de Oncología "Ángel H Roffo", Buenos Aires.

Las células SP tumorales serían responsables de la quimiorresistencia de numerosos tumores mamarios. Hemos demostrado que las mamoesferas de la línea LM38-LP, expresan altos niveles de genes pluripotenciales y son capaces de regenerar el tumor M38 *in vivo*. Utilizando mamoesferas de LM38-LP nos propusimos A) estudiar el efecto del ATRA sobre la expresión de PKC α/δ . B) estudiar el efecto del ATRA e inhibidores farmacológicos de PKC α/δ (Gö6976/Rottlerina) sobre la modulación de los receptores retinoides (RAR) y sus efectos sobre proliferación, autorenovación y diferenciación de las SP. Por RT-PCR determinamos que el tratamiento de las mamoesferas con ATRA durante 48h sólo indujo una disminución de los niveles de PKC α , acompañado de un aumento de RAR β 2 y RAR γ 2, involucrados en diferenciación y mantenimiento de SP. La combinación de ATRA/Gö6976 por 96h redujo el crecimiento de las mamoesferas más eficientemente que cada tratamiento por separado (Diámetro a las 96 hs: Control: 176 \pm 8 μ m, inhibidor PKC α : 130 \pm 11 μ m ATRA: 129 \pm 10 μ m, ATRA/inhibidor PKC α : 103 \pm 5 μ m; $p \leq 0.05$), mientras que la Rottlerina indujo el efecto inverso (Diámetro: 191 \pm 7 μ m; $p \leq 0.05$). El tratamiento de las mamoesferas con Gö6976 redujo drásticamente la formación de mamoesferas secundarias (Número de mamoesferas secundarias: Control: 313 \pm 19; Gö6976: 124 \pm 29; Rottlerina: 373 \pm 21; ATRA: 575 \pm 15; ATRA/Gö6976: 69 \pm 21 and ATRA/Rottlerina: 392 \pm 17; $p \leq 0.05$ vs Control). Mediante cultivos 3D en Matrigel, observamos que el pre-tratamiento de mamoesferas con ATRA induce la formación de colonias organizadas con presencia de lumen. El pre-tratamiento con Gö6976 llevo a la formación de estructuras pequeñas con evidente muerte celular mientras que la Rottlerina no afecto la diferenciación de estas estructuras. Por RT-PCR observamos que sólo el tratamiento ATRA/Gö6976 indujo una disminución de los niveles de los genes pluripotenciales Nanog y Slug, en cambio, la Rottlerina indujo su aumento. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de PKC δ lleva a la proliferación del componente SP, posiblemente a través del aumento de Nanog y Slug. Además, el tratamiento de ATRA/inhibidor de PKC α , inducirían diferenciación e inhibición de la autorenovación de SP, pudiendo ser de utilidad para el tratamiento de los tumores mamarios quimiorresistentes.

- 597. (503) CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA, GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DE LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO**

Chervo M.¹; Blanco P.¹; Barrio M.¹; Mordoh J.^{1,2}
Centro de Investigaciones Oncológicas, CIO-FUCA¹; Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET, Buenos Aires².

El melanoma cutáneo (MC) es un tumor maligno originado en los melanocitos cuya incidencia y mortalidad han aumentado en las últimas décadas. El MC presenta características distintivas tales como su alta tasa de crecimiento y gran capacidad metastásica. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de ciertos parámetros presentes en cuatro nuevas líneas celulares de MC humano, en un intento de definir sus propiedades biológicas, genéticas y antigénicas. Las líneas fueron establecidas en nuestro laboratorio y designadas como #10, #12, #13 y #14. Las líneas #10 y #13 fueron aisladas de metástasis (mts) linfáticas y las líneas #12 y #14, de mts de SNC. A nivel biológico se estudió su cinética de crecimiento por el ensayo MTT. #10 y #12 presentaron un tiempo de duplicación de 20 hs, mientras que #13 y #14 de 30 hs. También se determinó su capacidad de crecer libres de anclaje por el ensayo clonogénico en metilcelulosa. #12 y #13 presentaron un índice clonogénico de 36% y 48%, respectivamente; en cambio, #10 y #14 no formaron colonias. A nivel genético se evaluó el status mutacional de los oncogenes *BRAF* y *NRAS*, ambos codificantes de proteínas pertenecientes a la vía MAPK, y también del gen del receptor tirosina quinasa *C-KIT*, por el método de Sanger. Las líneas #12 y #13 presentaron la mutación *BRAF* V600E heterocigota, mientras que #10 y #14 presentaron la mutación *BRAF* V600K homocigota. Todas las líneas fueron wild type para *NRAS* y *C-KIT*. A nivel fenotípico, se midió la expresión de los siguientes antígenos a través de citometría de flujo: MART-1, gp100, gangliósidos GD2/GD3, y HLA-A0201. Los niveles más altos de expresión se hallaron en #12 y #13, obteniéndose para #12, por ejemplo, niveles de MART-1 de 99,64% \pm 0,13; gp100 97,96% \pm 0,44; GD2 98,19% \pm 1,14; GD3 89,30% \pm 8,45 y HLA-A0201 99,53% \pm 0,07. La información obtenida de este trabajo podría ser de utilidad para próximas investigaciones *in vitro* o *in vivo* en las que se utilicen dichas líneas celulares.

- 598. (510) META-TIROSINA, UN MEDIADOR DE LA RESISTENCIA CONCOMITANTE, UTILIZADO COMO AGENTE TERAPÉUTICO CON ELEVADA CAPACIDAD ANTI-METASTÁSICA Y BAJA TOXICIDAD**
Machuca D.¹; Bruzzo J.¹; Chiarella P.¹; Camerano G.³; Costas H.³; Maglioco A.¹; Dran G.¹; Meiss R.²; Ruggiero R.¹
Laboratorio de Oncología Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹; Instituto de Estudios Oncológicos IEO; Academia Nacional de Medicina²; Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina³.

La resistencia concomitante antitumoral (RC) es el fenómeno por el cual un individuo portador de tumor inhibe el crecimiento de un implante tumoral secundario. Ha sido descrita en animales y en seres humanos. En ratones, la RC es inducida por tumores inmunogénicos y no-inmunogénicos de volumen ≥ 2000 mm³, con la excepción de aquéllos altamente metastásicos. Recientemente nuestro grupo identificó en el suero de portadores de tumores que inducen RC, a dos isómeros de tirosina que no aparecen en proteínas normales, meta (m)- y orto-tirosina, como responsables del fenómeno. Aquí se evaluó la eficacia terapéutica y toxicidad de m-tirosina en ratones portadores de dos tumores murinos altamente metastásicos, el C7HI y el LMM3, que no generan RC pero son sensibles a la RC generada por otros tumores. La administración diaria intravenosa (iv) de m-tirosina (0.2ml de 1.5mg/ml) a ratones portadores de C7HI inhibió drásticamente el desarrollo de metástasis pulmonares con respecto a los controles, tanto cuando el tratamiento duró 21 días: (Mediana(rango) = 5.5 (0-44), n=8 vs 44.5 (17-95), n=8; $p < 0.01$) como 42 días: 5 (1-77), n=8 vs 57.5 (27-125), n=9; $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test). Similar resultado obtuvimos sobre metástasis pulmonares de portadores de LMM3 que recibieron m-tirosina iv por 14 días (0.2ml de 10mg/ml): Tratados: 37 (11-78), n=8 vs Controles: 60 (44-100), n=6; $p < 0.05$. Se evaluó el potencial efecto tóxico de m-tirosina (0.2 ml de 10mg/ml iv durante 21 y/o 42 días) sobre el sistema inmune

mediante ensayos de hemaglutinación e hipersensibilidad por contacto observándose que la capacidad de desarrollar tanto una respuesta humoral como celular no se encontraba alterada. Al mismo tiempo el análisis histológico de bazo, riñón, hígado, pulmón, intestino y médula ósea no mostró alteraciones histológicas ni citológicas significativas respecto a controles normales, indicando que aun la mayor dosis terapéutica de m-tirosina tiene escasos efectos colaterales.

599. (539) POBLACIONES DE LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ CIRCULANTES EN ANIMALES CBI- INMUNOSUPRIMIDOS PORTADORES DEL ADENOCARCINOMA DE MAMA M-406

Del Giúdice A.*; Crocco L.*; Scotta L.; Ilieff E.; Pagura L.; Cardinale A.; Di Masso R.; Scharovsky O.; Rico M.; Rozados V.

*Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. *: Contribuyeron igualmente*

Las líneas de ratones CBi⁻ y CBi/L derivan de un experimento de selección artificial realizado a partir de la línea CBi, en la que surgió espontáneamente el adenocarcinoma de mama M-406. Al desafiar estos animales con M-406: CBi presenta 100% de susceptibilidad, CBi⁻ 100% de resistencia y en CBi/L el tumor crece en el 51,3% (ES), regresa en el 30% (EL) y entra en equilibrio en el 18% (EQ), comportamiento asimilable a la Inmunoedición Tumoral. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las células involucradas en la interacción huésped-tumor en los tres genotipos. Para ello, se desafiaron con M-406 s.c. animales CBi, CBi/L, CBi⁻ y CBi⁻ previamente inmunosuprimidos con dexametasona (7,5 mg/día, 5 días) (CBI⁻IN). Durante el experimento se evaluó el crecimiento tumoral y se extrajo sangre para determinar por citometría de flujo el% de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ circulantes. El tumor se comportó en forma habitual en CBi, CBi/L y CBi⁻ y creció en CBI⁻IN. El% de linfocitos CD4⁺ basales fue mayor en CBi [mediana y rango, 83 (74,5-88)] comparado con CBi [30 (21,5-56,7)] y CBi/L [30 (26,1-33,8)] Kruskal-Wallis (P<0,0001). Los animales CBi⁻ presentaron menor% de CD8⁺ basales [7 (4,8-8,0)] que CBi/L [9 (7,9-17,8)] y mayor que CBi [6 (3,5-11,0)] (P<0,001). Por otro lado, los ratones CBI⁻IN presentaron menor% de CD4⁺ [55 (37,2-72,9)] que los CBI⁻ (P<0,001), sin observarse diferencias en CD8⁺. En CBi/L en EL se observó menor% de linfocitos CD4⁺ [21 (10,9-25,0)] y CD8⁺ [8 (7,1-9,7)] que en ES [32 (26,5-39,4)]; [12 (9,0-14,4)] o EQ [37 (30,7-44,2)]; [13 (10,1-15,5)] (P<0,001). Podemos concluir que: 1) el% de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ basales presentes en CBi⁻, podría en parte, explicar la resistencia a M-406 que se vio revertida con la inmunosupresión; 2) las diferencias observadas en CBi/L no permiten explicar los distintos estadios de crecimiento tumoral. Sería necesaria la identificación de otras poblaciones celulares para caracterizar este modelo. .

600. (575) LA RESISTENCIA A 5-FLUOROURACILO Y A OXALIPLATINO EN LÍNEAS TUMORALES DE CÁNCER COLORRECTAL HUMANO ESTÁ ASOCIADA AL AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE OCT-4 Y DE NANOG

Batalla M.¹; Bolontrade M.²; Sganga L.^{2,3}; Cerda M.¹; Iezzi M.²; Podhajcer O.²; Policastro L.^{1,2}

Comisión Nacional De Energía Atómica, Buenos Aires¹; Fundación Instituto Leloir²

La quimioresistencia es una de las principales causas del fracaso de los tratamientos contra el cáncer. El 5-fluorouracilo (5-FU) es la droga quimioterapéutica más utilizada para el tratamiento del cáncer colorrectal. Sin embargo, la respuesta de pacientes con estados avanzados de la enfermedad es sólo del 10-25%. En combinación con otras drogas como el oxaliplatino (OXA) mejora la respuesta de los pacientes al tratamiento. En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un modelo para el estudio de la quimioresistencia en cáncer colorrectal mediante la generación de sublíneas celulares resistentes al 5-FU y al OXA. A partir de las líneas tumorales humanas de cáncer colorrectal Caco-2 y T-84, hemos obtenido las líneas Caco-25FU-R y T-845FU-R resistentes al 5-FU y las líneas Caco-2OXAR y T-84OXAR resistentes al

OXA. Las sublíneas resistentes (SLR) se desarrollaron a partir de cultivos de las líneas parentales Caco-2 y T-84 (LP) tratadas con dosis crecientes de 5-FU y de OXA independientemente durante 6 meses. Las SLR mostraron 8-10 veces un incremento en la dosis inhibitoria 50(IC50) respecto de las LP (p<0.01). La tasa de proliferación fue significativamente menor en las SLR respecto de las LP (p<0.01), y la capacidad de crecer independientemente de anclaje fue significativamente mayor en las SLR (p<0.01). Existen evidencias experimentales que muestran una asociación entre la expresión de genes asociados a los procesos de embriogénesis y el desarrollo de quimioresistencia en cáncer. En este sentido, hemos evaluado la expresión de los genes OCT-4, Nanog y SOX2 en nuestro modelo de estudio por técnicas de inmunohistoquímica. Las SLR mostraron un aumento significativo de la expresión de OCT-4 y Nanog, y no así en la expresión de SOX2. En futuros experimentos, exploraremos si el silenciamiento de estos genes modula la quimioresistencia a fin de diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

601. (580) AGENTES RADIOPROTECTORES PARA REDUCIR LA MUCOSITIS INDUCIDA POR LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN TEJIDO PREMALIGNO EN UN MODELO DE PRECANCER BUCAL

Monti Hughes A.¹; Pozzi E.¹; Thorp S.¹; Medina V.^{2,3}; Martinel Lamas D.²; Rivera E.²; Curotto P.¹; Garabalino M.¹; Heber E.¹; Itoiz M.^{1,4}; Aromando R.^{1,4}; Nigg D.⁵; Trivillin V.^{1,3}; Schwint A.^{1,3}

Comisión Nacional de Energía Atómica¹; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (Conicet)³; Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires⁴; Idaho National Lab, USA⁵.

BNCT se basa en la reacción de captura entre el boro localizado preferencialmente en tumor y los neutrones térmicos, generando partículas letales de corto alcance que dañan al tumor, preservando el tejido normal. Previamente, demostramos el éxito terapéutico del BNCT mediado por el compuesto borado BPA en el tratamiento de tumores y en la inhibición del desarrollo tumoral en tejido premaligno en modelos de cáncer y precancer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster. A pesar del éxito terapéutico, la mucositis inducida por BNCT en el tejido premaligno resultó limitante de dosis y favoreció, en algunos casos, el desarrollo tumoral. En un escenario clínico, la mucositis bucal limita la dosis que se puede administrar a tumores de cabeza y cuello. Este estudio evalúa la reducción, a niveles aceptables, de la mucositis inducida por BNCT en tejido premaligno, mediante la utilización de agentes radioprotectores. Grupos de hamsters fueron cancerizados con DMBA y tratados con BPA-BNCT, dosis total absorbida 5Gy, en el Reactor Nuclear RA3: G1) con histamina (n=6, 1mg/kg, sc); G2) con JNJ7777120 (n=5, 10mg/kg, sc); G3) sin tratamiento radioprotector (n=11). La acción radioprotectora de la histamina y JNJ7777120 fue demostrada previamente en otros modelos. BPA-BNCT sin tratamiento radioprotector presentó mucositis severa/inaceptable en 45% de los animales. En cambio, BPA-BNCT+histamina ó JNJ7777120, solo el 17% y 20%, respectivamente, exhibieron mucositis inaceptable. En cuanto al porcentaje de animales con tumores nuevos durante el mes de seguimiento, BPA-BNCT+histamina no mostró un aumento significativo versus BPA-BNCT sin radioprotectores (33% vs 18% respectivamente; Test exacto de Fisher p=1,000). BPA-BNCT+JNJ7777120 inhibió el desarrollo tumoral en todos los animales. Este estudio sugiere el potencial de la histamina y del JNJ7777120 para prevenir una mucositis severa e inaceptable asociada al tratamiento con BPA-BNCT a una dosis con valor terapéutico de 5Gy.

602. (589) PARTICIPACIÓN DEL ESTROMA TUMORAL EN LA REGRESIÓN INDUCIDA POR ANTIPROGÉSTÁGENOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE MAMA

Polo M.; Riggio M.; Lanari C.; Novaro V.
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET.

La expresión de receptores de estrógenos y de progesterona, así como también la presencia de variantes tumorales con dife-

rente dependencia hormonal y respuesta a terapias endocrinas y de quinasas, hacen del modelo de carcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) una herramienta útil para estudiar los fenómenos de inhibición del crecimiento y de regresión tumoral. Previamente demostramos que la variante MPA-dependiente C4-HD responde al tratamiento endocrino (48 horas del antiprogéstano Mifepristona, MFP, 12mg/kg/día) con un aumento en la apoptosis y necrosis del epitelio tumoral, y la expansión del compartimiento estromal. En este trabajo se analizó la progresión temporal de este fenómeno y las características del estroma de los tumores en regresión. Si bien a partir de 6 horas de administrado el MFP fue posible detectar en el epitelio tumoral una caída en el índice mitótico y un aumento de la apoptosis ($p < 0,01$), el área estromal se incrementó ($p < 0,01$) a partir de las 12 horas de tratamiento con MFP. La expansión del estroma estuvo acompañada por un incremento en el marcador de fibroblastos activados α SMA, una mayor vascularización ($p < 0,01$) (determinada por inmunofluorescencia para el marcador CD31) y una mayor activación de las quinasas AKT y S6 ($p < 0,01$). Curiosamente, tal como determinamos por western blot y por inmunohistoquímica el tratamiento con MFP produce una disminución de la activación de la vía PI3K/AKT en el epitelio y un aumento en el estroma. En base a lo observado, la expansión del estroma registrada en la regresión de la variante C4-HD respondería a señales disparadas por la muerte del epitelio tumoral. Actualmente estamos evaluando dicho fenómeno en la regresión en otros modelos preclínicos de cáncer de mama como en la línea T47D. Comprender los mecanismos celulares que se disparan en respuesta a agentes antitumorales podría permitir el desarrollo de nuevas terapias así como potenciar terapias preexistentes.

603. (122) MRP4/ABCC4: NUEVO BLANCO PARA LA ERRADICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE LEUCÉMICAS

Cospel S.^{1,2}; Beyrath J.²; Woestenenk R.³; Cany J.³; Ziblat A.⁴; Dolstra H.³; Shayo C.¹; Russel F.²; Davio C.⁵
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina¹; Department of Pharm Tox, NCMLS, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands²; Department of Lab Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands³; Laboratorio de Fisiopatología de La Inmunidad Innata, (IByME)-CONICET, Buenos Aires, Argentina⁴; Laboratorio de Farmacología de Receptores, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina⁵.

Las células madres leucémicas (LSCs) son fundamentales para la generación y perpetuación de la enfermedad leucémica y responsables de la refractariedad al tratamiento. Una estrategia terapéutica a fin de erradicar las LSCs consiste en interferir con su capacidad de auto-renovación induciendo su diferenciación. Hemos reportado en líneas celulares de leucemia mieloide aguda (AML) que el MRP4/ABCC4 regula los niveles de AMPc intracelular y su bloqueo tanto farmacológico como por shRNA, determina la inhibición de la proliferación y la inducción de diferenciación celular. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar la implicancia de la exclusión de AMPc vía MRP4 en la proliferación e inducción de diferenciación de las LSCs con el fin de fortalecer la postulación del MRP4/ABCC4 y la regulación de los niveles de AMPc como blanco terapéutico eficaz. Para ello, utilizando como modelo la línea celular de AML KG1a, detectamos por citometría de flujo que estas células contienen alrededor de 70% de LSCs (CD34+CD38-) y a su vez que expresan CD123, un marcador específico de LSCs. Luego de su separación por FACS se detectó en las LSCs la expresión de MRP4/ABCC4 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína. Finalmente, evaluamos la expresión de los marcadores de diferenciación CD38 y CD11b al tratar a las LSCs con forskolina 10 μ M (FK, activador de la adenilato ciclasa) y/o MK-571 50 μ M (MK, inhibidor de MRP4) por 48 h. El tratamiento con FK o con MK induce la expresión de CD38 ($p < 0,001$ o $p < 0,05$, respectivamente). Mas aún, el tratamiento conjunto (FK+MK) lleva no sólo a un aumento aún mayor en los niveles de CD38 ($p < 0,001$) sino también al incremento en la ex-

presión de CD11b ($p < 0,05$). En conclusión, el bloqueo del MRP4 y el incremento en los niveles de AMPc inducen la diferenciación de las LSCs. Así, el transporte de AMPc vía MRP4 podría ser considerado como blanco terapéutico para la erradicación de las LSCs.

604. (620) ROL DE LA VÍA DEL FGF2 EN CARCINOMAS MURINOS RESISTENTES A LA TERAPIA HORMONAL

Sahores A.; Wargon V.; Lanari C.; Lamb C.
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET.

Los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFRs) están desregulados en numerosas neoplasias. En trabajos previos demostramos que en muestras de tumores mamarios humanos hay una asociación significativa entre la expresión de FGFR2 y los receptores de estrógenos y una correlación entre la expresión de FGFR1 y un alto grado histológico. La mayoría de los carcinomas mamarios que expresan receptores hormonales responden inicialmente a la terapia endocrina, sin embargo, con el tiempo algunos desarrollan resistencia (resistentes adquiridos) y otros no responden desde el comienzo (resistentes constitutivos). En un modelo de cáncer de mama murino demostramos que en tumores sensibles a la terapia hormonal, el FGFR2 activado por la vía del receptor de progesterona (PR). Recientemente, observamos que las variantes resistentes tienen mayor expresión de FGF2 y FGFR1, respecto a los tumores sensibles, y estos, por otro lado sobreexpresan FGFR2. El objetivo es evaluar el rol de la vía de FGF2 en tumores resistentes. En cultivos primarios de células epiteliales hormono resistentes C4-2-HI, encontramos que el FGF2 (100 ng/ml) aumenta significativamente la proliferación celular ($p < 0,001$) medida por incorporación de ³H-timidina. Los inhibidores de FGFR, PD 173074 (0,1-1 μ M) y BGJ 398 (0,1-10 nM), inhibieron significativamente la proliferación celular basal e inducida por FGF2. Se obtuvieron resultados similares en una variante tumoral con resistente adquirida (C4-HIR) y en otra constitutiva (C7-HI). Estamos investigando el efecto de bloquear las vías de PR y FGFR2 sobre el crecimiento tumoral en tumores resistentes en comparación a tumores sensibles. Estos resultados contribuyen a entender el rol de la vía de FGFR en la resistencia y promueven el uso de inhibidores de la vía de FGFR en combinación con la terapia hormonal convencional con el fin de retrasar el desarrollo de la resistencia hormonal.

605. (632) ROL DE LA QUINASA P38 EN LA MODULACIÓN DE LA TRANSICIÓN QUIESCENCIA/PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE MAMA MURINO F3II

Capobianco C.¹; Gabri M.¹; Bragado P.²; Aguirre Ghiso J.²; Alonso D.¹; Gómez D.¹; Farina H.¹
Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes¹; Laboratory of Signaling and Metastasis, Mount Sinai School of Medicine, USA².

Las metástasis se originan a partir de células tumorales diseminadas que usualmente transitan por un periodo de *dormancy*. Los mecanismos involucrados en la transición *dormancy*/proliferación son desconocidos, y su identificación es importante para el descubrimiento de blancos terapéuticos para prevenir la recurrencia luego de periodos libres de enfermedad. Las quinasas ERK y p38 han sido sugeridas como centrales en la regulación del proceso de *dormancy*: una tasa de activación p38/ERK alta resultaría en la inducción de la quiescencia, mientras que una tasa baja provocaría la entrada en proliferación. En línea con estas hipótesis, previamente demostramos que el tratamiento con el inhibidor de p38 SB203580 reduce el tiempo de latencia de tumores F3II, y aumenta el número de metástasis espontáneas. El objetivo de este trabajo fue valorar el efecto de la modulación de p38 en el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de una línea de carcinoma de mama y su rol en la regulación de la expresión y activación de diferentes proteínas clave. Para los estudios *in vivo*, ratones con tumores subcutáneos fueron sometidos a una cirugía parcial. Durante diez días consecutivos post-cirugía se administró SB203580 i.p. en una concentración de 10 mg/kg. Esto provocó

el desarrollo de recidivas más grandes comparado con el grupo control ($p < 0.01$). Adicionalmente, se trataron monocapas de F3II con SB203580 a distintas concentraciones, lo que provocó un aumento en la activación de ERK, en la expresión de integrinas $\beta 5$ de membrana y en su capacidad de adhesión ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la inhibición de la actividad de p38 provoca una serie de cambios en las células (ej. aumento en su capacidad de adhesión, activación de señales proliferativas) que le permitirían sentir y adaptarse de manera más fácil a un nuevo entorno de crecimiento, generando así tumores más agresivos. En conclusión, la actividad de p38 resultaría clave en la regulación de la quiescencia tumoral en carcinomas mamarios.

606. (635) MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DE UNA FTALOCIANINA DE ZN(II) LIPOFÍLICA EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON

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

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica (IQIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; BIONIMED, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

Las ftalocianinas (Pc) son compuestos fotosensibilizadores de potencial utilidad como antitumorales en ensayos de terapia fotodinámica. En la búsqueda de Pc sintéticas con potente actividad antiproliferativa, evaluamos las propiedades fototóxicas de una Pc lipofílica (Pc9) incorporada en micelas de poloxamina en la línea celular CT26 (carcinoma de colon murino). A partir del análisis de curvas dosis-respuesta se estimó un valor de IC_{50} (concentración que inhibe el 50% la viabilidad celular) de 6.7 ± 0.6 nM. Con el fin de esclarecer el mecanismo de acción examinamos, en primer lugar, la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Demostramos un incremento de 1.60 ± 0.38 veces ($p < 0.01$) en la producción de ROS a una concentración ~ 10 nM de Pc9 (tiempo 0 post-irradiación). Asimismo, detectamos un aumento de la viabilidad celular ($29 \pm 6\%$) a una concentración 10mM del antioxidante Trolox, sugiriendo la participación de ROS en el efecto fototóxico de Pc9. Por ensayos de microscopía de fluorescencia con naranja de acridina, un colorante que emite fluorescencia cuando se internaliza en organelas ácidas, observamos un aumento de la permeabilidad de la membrana lisosomal inmediatamente luego de la irradiación. La presencia de núcleos picnóticos sugirió el comienzo de una respuesta apoptótica. También detectamos la liberación temprana de cathepsina D al citosol por ensayos de Western blot. En conclusión, las primeras evidencias del estudio del mecanismo de muerte celular inducido por Pc 9 en células CT26 indican que la ftalocianina vehiculizada en micelas de poloxamina se comporta como un potente compuesto fototóxico, que induce la producción de ROS, aumenta la permeabilidad de la membrana lisosomal y favorece la liberación de proteasas al citosol. Estudios posteriores permitirán determinar el tipo de muerte celular y la secuencia de eventos desencadenados luego de la alteración lisosomal.

607. (637) CUANTIFICACIÓN DE GLUTATION S TRANSFERASA PLACENTARIA POR RT-QPCR EN HÍGADO PRENEOPLÁSICO DE RATA

Nicolovich M.¹; De la Vega E.¹; Frontini V.¹; Venera G.^{1,2} IUNIR¹; Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

La Glutathion S Transferasa placentaria (GSTp) es un marcador temprano de neoplasia hepática en ratas y pertenece a una familia de enzimas que participan en reacciones de detoxificación, regulación de proteínas kinasas, proliferación, apoptosis y mecanismos de resistencia a drogas citotóxicas. En este trabajo se compara la expresión génica del GSTP1 por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real precedida de retrotranscripción (RT-qPCR)

con el estándar de detección y semicuantificación inmunohistoquímica (IH) de GST -p en focos de hepatocitos alterados (FHA) en modelo de iniciación (I) - promoción (P) de preneoplasia hepática determinada por el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa utilizando el anticuerpo policlonal anti rata GST-p. Las muestras de un estudio previo procedieron de 3 grupos de 5 ratas Wistar macho adultas: C: Control; IP: Modelo; IP+Promotor: Modelo + ATP. Los hígados se extrajeron bajo anestesia. Trozos de tejido se procesaron para IH, el resto se conservó a $-85^{\circ}C$ hasta la extracción del ARN con Trizol LS. Para la retrotranscripción se utilizaron Superscript II y "random hexamers". Se diseñaron "primers" específicos para amplificar el cDNA por qPCR. La expresión relativa respecto al control del GSTP1 por RT-qPCR para los grupos IP e IP+ATP fue 3,37 y 11,30 respectivamente y se corresponde con las variaciones de la IH de estudios previos de 0,62 y 4,63 para los mismos grupos expresado como porcentaje de hígado de FHA. La RT-qPCR es una opción para detectar cambios en la expresión de GSTP1 como marcador de preneoplasia hepática por ser un método más rápido y simple que la técnica IH.

608. (644) DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE STXBP5-AS1 EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Mestre B.; Navas E.; Bruno M.

Laboratorio de Neurociencias, Universidad Católica de Cuyo, Mendoza

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia hematológica consecuencia de la transformación maligna de los precursores linfoides de la línea B o T. Es la neoplasia más frecuente en oncología pediátrica, presentando una incidencia anual de aproximadamente 4-5 casos nuevos por cada 100.000 niños menores de 15 años, y a pesar de tener una incidencia menor en pacientes adultos es una de las principales causas de mortalidad dentro de las neoplasias hematológicas. Si bien el tratamiento de la LLA constituye uno de los grandes éxitos de la medicina actual, hasta el 25% de los niños y más del 50% de los adultos sufren una recaída de la enfermedad lo que empeora muy significativamente su pronóstico. La epigenética es la disciplina científica que estudia cambios en la expresión génica que no se deben a alteraciones en la secuencia de ADN. En los últimos años se ha determinado que diversas alteraciones epigenéticas, tales como metilación del ADN, deacetilación de histonas y pequeños ARN no codificantes, pueden jugar un papel fundamental en la patogénesis de la LLA. Los RNAs no codificantes largos (lncRNAs), por definición, son todos aquellos que tienen una longitud superior a 200 nucleótidos. Algunos son intergénicos (lincRNAs) y otros son intrónicos, pero la mayoría son complementarios a otros ARNs codificantes o no codificantes. Existe un gran número de lncRNAs (entre 7000 y 23000 en las células humanas), pero se conocen pocos y los estudiados muestran una gran variedad funcional. Nuestro objetivo principal es determinar el patrón de lncRNAs en pacientes con LLA. Luego de un screening inicial encontramos que STXBP5-AS1, un lincRNA ubicado en el cromosoma 6 que aún no ha sido estudiado, está epigenéticamente regulado y se encuentra alterado en pacientes con esta neoplasia. Pudimos observar que en pacientes con leucemia linfoblástica aguda la expresión de este ARN no codificante se encuentra disminuida debido a una metilación errónea del ADN.

609. (648) RELACIÓN ENTRE FENOTIPO MALIGNO Y EFECTO DEL GEN INTERFERÓN OMEGA EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO FELINO

Villaverde M.¹; Targovnik A.²; Miranda M.²; Glikin G.¹; Finocchiaro L.¹

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"¹; Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

El carcinoma mamario felino (CMF) es una patología altamente frecuente en la especie, que se presenta de manera agresiva con fenotipo infiltrante-destructor, con metástasis en ganglios linfáticos, pulmón y pleura. Por otro lado, la aplicación sistémica

de la proteína del interferón-omega felino (FeIFN ω) es una terapia aprobada por la Unión Europea y Japón para uso veterinario en el tratamiento de patologías de origen viral (incluyendo el parvovirus canino) y ciertas neoplasias felinas (comercializado como Virbagen Omega, Virbac). Nuestro laboratorio se propuso establecer un modelo de CMF para evaluar el posible efecto antitumoral de la lipofección del gen FeIFN ω . Hasta el momento, se lograron establecer exitosamente tres variantes fenotípicas de carcinoma mamario, AIRB, AIRA y AIRA10 a partir de una neoplasia espontánea. Se caracterizaron como receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo y, distintos grados de expresión de Her2/neu. Las líneas AIRA y AIRA10 presentaron características de mayor agresividad que AIRB (mayor% de núcleos Ki67⁺ y menor tiempo de duplicación, $p < 0,01$), siendo AIRA10 la única línea que presentó capacidad tumorigénica (ensayo de agar blando). Encontramos que la expresión endógena del gen FeIFN ω tiene una alta efectividad citotóxica (ensayo de fosfatasa ácida) en las células de CMF, similar al agregado exógeno de ≈ 3000 UI/ml de la proteína recombinante, siendo la sensibilidad de AIRB>AIRA>AIRA10 ($p < 0,01$). Esta repuesta se relacionó de manera directa con: (i) aumento de especies oxidantes (DCF, $p < 0,01$), (ii) mayor permeabilidad de membrana (IP, $p < 0,01$), (iii) caída del potencial mitocondrial (JC-1, $p < 0,01$) y (iv) mayor incorporación de Ca²⁺ extracelular (Fura2-AM, $p < 0,05$). Por lo tanto, logramos establecer un modelo de ca mamario que representa al subgrupo refractario a la terapia hormonal y que resultó sensible a la lipofección del gen FeIFN ω , presentando una respuesta diferencial según el fenotipo maligno de las líneas establecidas.

610. (653) EL FGF2 ACTIVA AL RECEPTOR DE ESTROGENOS ESTIMULANDO EL CRECIMIENTO TUMORAL EN MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE MAMA

Guillardoy T.; Gorostiaga M.; Lanari C.; Giulianelli S.
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET.

El factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), induce proliferación celular y crecimiento tumoral en modelos humanos (MCF7 y T47D) y murinos (C4-HD y C4-HI) de cáncer de mama. Demostramos previamente que dicha acción del FGF2 es mediada por el receptor de progesterona en algunos modelos y al menos en parte, por el receptor de estrógenos alfa (RE α) involucrando su activación transcripcional en ensayos con genes reporteros bajo el control transcripcional de secuencias respondedoras al RE α (ERE-Luc). El objetivo del trabajo fue estudiar con más profundidad la activación ligando-independiente del RE α por FGF2 a nivel de fosforilación, expresión génica y reclutamiento del receptor sobre promotores de genes endógenos. Observamos que el FGF2 fue capaz de estimular las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK, las cuales serían responsables de fosforilar al RE α en dos sitios específicos, Ser118 y Ser167 ($p < 0,001$) en células T47D y MCF7. En ensayos de *Real-time PCR*, demostramos que la expresión de dos genes modulados por el RE α , *MYC* y *pS2/TFF1*, resultó significativa ($p < 0,01$) luego de 45 minutos de incubación con FGF2 en células MCF7. Dicho incremento fue bloqueado utilizando el antiestrógeno puro ICI 182.780 ($p < 0,01$). Además, el FGF2 indujo la asociación nuclear del RE α con el coactivador FOXA1, y el reclutamiento de ambas proteínas a secuencias regulatorias (ERE) en el promotor de *pS2/TFF1* en células MCF7 ($p < 0,01$), luego de realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (*ChIP*). Los resultados muestran que el RE α tiene una participación clave en la proliferación celular y en el crecimiento tumoral mediado por FGF2 en cáncer de mama experimental, que involucran su activación ligando-independiente a nivel genómico. La señalización FGF2/FGFR podría estar involucrada en mecanismos de resistencia al tratamiento endocrino en cáncer de mama.

611. (702) DIÁLOGO RECÍPROCO ENTRE CÉLULAS TUMORALES Y TREGS REGULA LADO POR PROGESTÁGENOS EN CÁNCER DE MAMA

Dalotto T.; Cerliani J.; Croci D.; Mendez-Huergo S.; Rabinovich G.; Salatino M.
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET.

El sistema inmune ejerce un continuo control sobre la aparición y eliminación de células tumorales. Las terapias de reemplazo hormonal con progestágenos sintéticos han provocado un incremento en la aparición de neoplasias mamarias, sugiriendo una asociación entre el tratamiento hormonal y la transformación maligna. Con el fin de dilucidar si los progestágenos regulan a los componentes del microambiente tumoral promoviendo la progresión tumoral, utilizamos el tumor mamario 4T1 e inocularon ratones Balb/c con medroxiprogesterona (MPA) o progesterona (Pg), solos o con el inhibidor de progestágenos, mifepristona (Ru). El tratamiento con MPA o Pg no impactó sobre el volumen tumoral pero resultó en un aumento en el número de micro- y macrometástasis pulmonares ($p < 0,01$) y se vio acompañado por un aumento en la frecuencia de células T regulatorias Foxp3⁺ (Tregs) *in vivo* (ganglios drenantes e intratumorales; $p < 0,01$) e *in vitro* ($p < 0,05$). El mayor infiltrado de Tregs estuvo asociado a un aumento en la expresión del marcador de extravasación, CD44. El tratamiento con MPA o Pg indujo en el microambiente tumoral un mayor número de linfocitos T "exhaustos" PD1⁺TIM3⁺ que a su vez tenían una menor capacidad de proliferación antígeno-específica, medida por CFSE. El Ru revirtió todos los efectos *in vivo* del MPA ($p < 0,05$) pero no de la Pg. Particularmente al analizar las células del tumor primario observamos que el MPA indujo un aumento en la frecuencia de la población tipo *stem* CD44⁺CD24^{low} ($p < 0,05$), asociada a un fenotipo más invasivo. El cultivo de Tregs provenientes de animales tratados con MPA con células 4T1 promovió un aumento de la invasión *in vitro* ($p < 0,05$) y de las características asociadas a la transición epitelio-mesenquimal como la expresión de Snail. Nuestros resultados indican la existencia de un diálogo recíproco entre células tumorales y Tregs regulado por progestágenos, el cual favorece un microambiente tumoral inmunosupresor y un fenotipo invasivo en cáncer de mama.

612. (738) EFECTO DE AGENTES LIGANDOS DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS ARLICOS (AHR) SOBRE LA PROLIFERACIÓN, APOPTOSIS Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE RIÑÓN HUMANO

Luzzani G.; Callero M.; Loaliza Pérez A.
Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto antitumoral del derivado de Aminoflavona utilizado en ensayos clínicos (AFP 464) y del Benzotiazol (5F203) en un panel de células de cáncer renal humano. Se evaluó la citotoxicidad de ambos agentes por el método de MTS en presencia o ausencia del inhibidor de AhR, α -naftoflavona (α -NF). Nuestros resultados demostraron que AFP 464 (0.1-1 μ M) inhibe el crecimiento celular con respecto al control de manera dosis dependiente en las líneas TK-10 (49,42 \pm 4,77%), SN12-C (46,11 \pm 7,4%) y Caki-1 (50,11 \pm 2,44%), pero no en células de la línea ACHN (26,15 \pm 2,21%). Utilizando α -NF, el efecto citotóxico fue parcialmente reducido (TK-10: 20 \pm 16%, SN12-c: 40 \pm 6%, Caki-1: 30,49 \pm 2,07%). El 5F203 (0.1-10 μ M) también inhibe el crecimiento celular de manera dosis dependiente en las líneas TK-10 (45,2%), SN12-C (71,11%) y Caki-1 (60,06%), pero no en células de la línea ACHN (0%). Utilizando α -NF, el efecto citotóxico fue reducido (TK-10: 1%, SN12-c: 29,83%). Se estudió el efecto de estos agentes sobre la migración celular en las líneas sensibles SN12-C, TK-10 y Caki-1. Al cabo de 12 h de tratamiento se evaluó el porcentaje de superficie de herida abierta respecto del control, encontrándose que ambos agentes carecían de efecto. El estudio por citometría de flujo del ciclo celular mostró que AFP 464 produce arresto en la fase S en las líneas TK-10 y SN12-C, este efecto no se observó en células ACHN. Por otro lado, el 5F203 indujo apoptosis demostrado por el aumento de las células en estado Sub-G0 en las líneas Caki-1 y SN12-C y arresto en la fase G2/M en la línea Caki-1. En la línea resistente ACHN no hubo cambios en el ciclo celular por tratamiento con 5F203. Los resultados confirman que la vía de señalización de AhR sería un nuevo blanco molecular y AFP 464 y 5F203 posibles nuevos agentes para el tratamiento de cáncer de riñón.

613. (759) PROPIEDADES ANTI-METASTÁSICAS DE UN NUEVO INHIBIDOR DE LA GTPASA RAC1 OBTENIDO POR DISEÑO RACIONAL

González n.¹; Cardama G.¹; Comin M.²; Alonso D.¹; Gómez 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.

La GTPasa Rac1 perteneciente a la superfamilia de Ras juega un papel relevante en diversos procesos celulares vinculados con la invasión y metástasis tumoral. Rac1 se encuentra sobreactivada en diversos tipos de cáncer humanos en particular el cáncer de mama. Previamente en nuestro laboratorio se desarrolló un inhibidor específico de Rac1 (ZINC69391) mediante una metodología de *Screening Virtual* basado en *Docking*. A partir de este compuesto se llevó adelante el diseño racional de análogos con el objetivo de obtener compuestos novedosos con mayor actividad biológica. Se sintetizó *de novo* un primer grupo de análogos dentro de los cuales se seleccionó el compuesto 1A-116 como un análogo más potente que ZINC69391. El presente trabajo tuvo como objetivo central estudiar las propiedades anti-metastásicas del compuesto 1A-116 en un modelo murino singénico. El estudio de posibles formulaciones para la administración *in vivo* del compuesto demostró una baja solubilidad del mismo en medio acuoso, por lo que fue necesario optimizar una formulación acuosa. La protonación en medio ácido de los grupos radicales ionizables del compuesto demostró ser la alternativa más adecuada, al obtenerse la disolución del compuesto. En esta nueva formulación el compuesto 1A-116 mostró un mayor efecto anti-tumoral *in vitro*, viéndose disminuido 9 veces el valor de IC50 en células de carcinoma mamario F3II en comparación con el compuesto diluido en DMSO (36 µM en DMSO vs. 4 µM en la nueva formulación). El estudio del efecto anti-metastásico de 1A-116 mostró una reducción de la colonización metastásica pulmonar del 60% a una dosis de 3mg/kg/día, demostrando una dosis efectiva 8 veces menor que el compuesto parental ZINC69391 (3 vs. 25 mg/kg/día respectivamente). Estos resultados demuestran que el compuesto novedoso 1A-116 presenta efecto anti-metastásico *in vivo* en un modelo de carcinoma mamario murino y sugieren su potencialidad como agente para el tratamiento de tumores mamarios.

614. (790) EFECTO DE IMIQUIMOD SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES TRANSFORMADAS MURINAS COMO MODELO DE TUMOR VASCULAR

Alegre N.; Rocco R.; Wainstok R.; Gazzaniga S.
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Imiquimod (IQ) es una imidazoquinolina sintética modificadora de la respuesta inmune local que se emplea para el tratamiento de ciertas patologías cutáneas. Su efectividad está asociada a la adecuada activación del microambiente. Sin embargo, el efecto citotóxico directo sobre células tumorales es poco conocido, y menos aún para hemangiomas. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de IQ sobre la viabilidad, migración y estado del citoesqueleto de células endoteliales transformadas H5V que generan tumores del tipo hemangioma, en ausencia de la actividad inmunomoduladora. Para ello, se trataron cultivos de H5V con concentraciones crecientes de IQ (1-10 µg/ml). Tras la exposición por 48 hs, se registró una mortalidad celular del 69% a concentraciones > 5 µg/ml, evaluado por exclusión del azul de tripan (p<0,05). Asimismo, se evaluó la apoptosis y necrosis celular. La migración se estudió mediante el ensayo de herida, obteniéndose una disminución del 54,3% con 5 µg/ml de IQ (p<0,05). Con el tratamiento de 1 µg/ml no se observaron diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con cambios observados a nivel de F-actina evidenciados mediante fluorescencia con faloidina-TRITC. El 64% de las células tratadas mostraron distintas modificaciones en el citoesqueleto. De las mismas, el 57,5% presentó actina perinuclear y reforzamiento en los procesos, mientras que el 6,5% restante mostró un vaciamiento cortical por acortamiento de los haces o foci citoplasmáticos. Las células control mostraron paquetes de actina distendidos y ordenados, o reticulados. En suma, estos resultados evidencian el potencial citotóxico directo de IQ sobre las células endoteliales transformadas evaluado a diferentes niveles.

615. (801) ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CORE DEL GENOTIPO 1B Y 2C DEL VIRUS HEPATITIS C (HCV) SOBRE MARCADORES DE HEPATOCARCINOGENÉISIS

Gentile E.; Cuestas M.; Castillo A.; Delfino C.; Oubiña J.; Mathet V.
Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: La elevada tasa de persistencia del virus hepatitis C (HCV) es uno de los principales factores de riesgo de hepatopatía crónica y hepatocarcinoma. La inflamación crónica y el efecto de citoquinas sobre la fibrosis y la proliferación hepatocitaria son algunos de los mecanismos patogénicos principales. Se ha documentado en la literatura internacional que la proteína del *Core* de HCV exhibe potencial transformante *in vitro*. Diversos estudios han demostrado la influencia de los genotipos 1a y 1b del HCV tanto en el curso evolutivo como en la respuesta a la terapéutica, pero hasta el presente no existen reportes en la literatura sobre el comportamiento biológico del genotipo 2c. **Objetivo:** Estudiar los efectos de la expresión de la proteína *Core* de HCV de los genotipos 1b y 2c sobre los niveles de expresión del ARNm de *telomerasa (h-Tert)* y *bax*. **Diseño del Estudio:** Se transfectaron transitoriamente células Huh7.5 con vectores que codifican para la proteína *Core* de los genotipos 1b y 2c de HCV. Se verificó la expresión de las variantes de la proteína *Core* por *western blot* tras 24 y 72 h de expresión transitoria y se evaluaron mediante RT-PCR-Multiplex semicuantitativa, los niveles de ARNm de *telomerasa (h-Tert)*, *bax* y β -*actina*. El análisis estadístico se realizó usando el test *t* de Student y los resultados se expresaron como la media \pm desvío estándar (p < 0,05). **Resultados:** Se observó una disminución en los niveles de los ARNm tanto de *h-Tert* como de *bax* en las líneas celulares que expresaron transitoriamente *Core* del genotipo 1b y 2c de HCV durante 24 h. Por el contrario, se documentó un aumento de los mismos luego de 72 h de expresión de las proteínas antes mencionadas. **Conclusiones:** El efecto de la expresión de la proteína *Core*, de ambos genotipos de HCV, sobre la expresión de *bax* y *h-Tert* tendría potenciales implicancias en la hepatocarcinogénesis viral.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 3

616. (72) RESUMEN CRÍTICO PARA EL IMPACTO FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES PUNTUALES EN VHL

Tedesco L.¹; Fuertes M.¹; Bonfiglio J.^{1,2}; Barontini M.³; Silberstein S.^{1,2}; Wu Y.⁴; Renner U.⁴; Stalla G.⁴; Holsboer F.⁴; Arzt E.^{1,2}
Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)-CONICET - Partner Institute Of The Max Planck Society¹; Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE)-CONICET, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina³; Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Alemania⁴.

HIF es el factor de transcripción principal en la respuesta adaptativa a hipoxia. En normoxia, su actividad está principalmente regulada a través de la estabilidad de las subunidades HIF-alfa, reconocidas por el supresor tumoral VHL, que media su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma. Existen patologías dadas por la aparición de mutaciones a lo largo de VHL, que afectan su actividad, aumentando la actividad de HIF en normoxia. Previamente demostramos que RSUME aumenta la estabilidad de HIF-1alfa, inhibiendo la ubiquitinación mediada por VHL. Además, se observó RSUME en tumores humanos deficientes de VHL. En este trabajo estudiamos el efecto de RSUME en el establecimiento del fenotipo mutante de VHL en el síndrome de von Hippel-Lindau Tipo 2. Utilizando el reportero de estabilidad de HIF-1alfa, ODD-LUC, en células RCC-786-O transfectadas con mutantes representativas del síndrome VHL

Tipo 2 (Tyr112His, Arg167Gln y Leu188Val), demostramos que la sobre-expresión de RSUME elimina la función parcial de las mutantes de VHL ($p < 0,05$), y al silenciarlo, la actividad de las mutantes de VHL es similar a VHL *wild type* (WT). Estudiamos el efecto de RSUME sobre la función de VHL en el desarrollo tumoral mediante la inyección de ratones nude con clones derivados de células RCC-786-O, que expresan tanto VHL WT o VHL Leu188Val junto con silenciamiento de RSUME o su control (shRSUME, shScramble). Para VHL WT y Leu188Val, el silenciamiento de RSUME produjo una reducción del crecimiento tumoral ($p < 0,05$). Asimismo, por análisis de imágenes en cortes de dichos tumores, el silenciamiento de RSUME mostró una clara reducción de los niveles de HIF-2 α , VEGF y vascularización tumoral (CD31) ($p < 0,05$). Concluimos que RSUME resulta crítico para el impacto funcional de las mutantes de VHL estudiadas, siendo RSUME un posible blanco terapéutico para patologías asociadas a la desregulación de HIF por disfunción de VHL. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11)

617. (167) EL PROCESO DE FOSFORILACION REGULA EL ROL BIOLÓGICO DE ZEB1

Perrone A.; Llorens M.; Cabanillas A,
Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Químicas, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba.

ZEB1 es un factor de transcripción importante para el desarrollo normal celular y el cáncer, especialmente en la transición epitelio-mesenquimatoso (EMT) que inicia el proceso de metástasis. ZEB1 se encuentra diferencialmente fosforilada en distintos tipos celulares, pero aun el rol de la fosforilación es desconocido. Estudios previos de gen reportador y EMSA nos permitieron demostrar que una menor fosforilación de ZEB1 incrementa su unión a DNA y la represión transcripcional de sus genes blanco y que su dominio carboxi terminal ZD2 contiene 4 fosfositios claves (T851, S852, S853, T867). El análisis funcional de mutantes en ZD2 mostro que la activación de PKC o ERK (a través de IGF-1) previene la represión transcripcional por ZD2. Además, clones GFP-ZD2 muestran que IGF-1 es suficiente para alterar la localización nuclear de ZD2. Nuestro interés fue expandir el significado de la fosforilación de ZEB1 a toda la proteína. ZEB1 mutado en los cuatro sitios mencionados reprimió más la actividad de genes blanco que wtZEB1. Curiosamente, la represión inducida por la mutación simple T867A fue similar a la de wtZEB1 sugiriendo que los cuatro sitios son necesarios para inducir el efecto y que habría una activación cooperativa de los mismos. Inmunofluorescencias de células CHO transfectadas con ZEB1-T867A o ZEB1-T851A/S852A/S853A/T867A mostraron que las mutantes fueron no respondedoras a IGF-1 (permanecieron nucleares). Ensayos de genes reporteros con mutantes (m) mZD2-T867A, mZD2-T867E (fosfomimetica) y mZEB1-T867A mostraron que IGF-1 indujo su efecto a través de T867 y que ZEB1 tiene otros sitios potencialmente respondedores a IGF-1. Los resultados confirman la dependencia del rol biológico de ZEB1 con su estado de fosforilación, y también soporta la hipótesis de una activación cooperativa de las vías de PKC y MAPK sobre los fosfositios identificados. La regulación de ZEB1 por quinasas permitiría a ZEB1 servir como factor integrador de señales externas.

618. (334) DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN CÉLULAS ERITROIDES Y NEURONALES

Chamorro M.; Maltaner R.; Vittori D.; Nesse A.
IQUIBICEN, CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Actualmente existe suficiente evidencia de la acción neuro-protectora y no hematopoyética de la eritropoyetina carbamilada (cEpo). En trabajos previos, demostramos que cEpo es capaz de unirse al heteroreceptor REpo-R β c (subunidad beta-common del receptor de GM-CSF) y generar la fosforilación de Jak2, tanto

en células neuronales (SH-SY5Y) como en eritroides (UT-7). Sin embargo, en éstas últimas, a diferencia de Epo, cEpo fue incapaz de regular el ciclo celular y la expresión de p27^{Kip1} factor inhibitorio de la proliferación. Ello sugiere que la vía de señalización desencadenada por la unión de cEpo al heteroreceptor se encontraría bloqueada, impidiendo así la activación celular. Debido a esto, nuestro objetivo fue continuar estudiando los mecanismos involucrados con el fin de explicar la acción diferencial de Epo y cEpo. Los estudios de la vía de señalización de proliferación de células UT-7 mostraron que cEpo es incapaz de mantener fosforilados a los factores de la vía Akt/FOXO3a/ERK por el mismo tiempo que Epo, ya que la intensidad de las bandas (*Western blotting*) fue significativamente menor que con Epo a los 15 min y más aún a los 60 min (pAkt/Akt: cE60' vs. E60', $P < 0,05$), (pFOXO3a/FOXO3a: cE60' vs. E60', $P < 0,01$). En relación a la vía antiapoptótica, a diferencia de Epo, cEpo no indujo la expresión del factor antiapoptótico Bcl-xL en células eritroides, mientras que en células neuronales ambas eritropoyetinas activaron los factores antiapoptóticos Bcl-xL y Bcl-2. Además, la expresión de la proteína fosfatasa 1B (PTP1B), relacionada con la disminución de la activación celular por Epo, aumentó en presencia de cEpo (cE vs. E, $P < 0,05$). Concluimos que, la mayor inducción de PTP1B por cEpo provocaría una rápida desactivación de la señalización, lo que permitiría explicar la incapacidad de cEpo para activar factores antiapoptóticos y de proliferación celular (Akt/FOXO3a/ERK), así como inhibir la expresión de p27^{Kip1}, generando el arresto del ciclo de células eritroides.

619. (359) VIA DE NOTCH Y SU MODULACION COMO POSIBLE BLANCO TERAPEUTICO EN MEDULOBLASTOMA

Anselmino N.; Alonso M.; Fernandez N.; Baldi A.; Davio C.; Shayo C.; García C.²
Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Los tumores de SNC son el segundo cáncer más prevalente en niños y la principal causa de muerte asociada a esta enfermedad, siendo el meduloblastoma (MB) el tumor más frecuente. La terapia actual se centra en las diferencias entre células normales y tumorales. Diversas vías de señalización están alteradas en MB, entre ellas la vía de Notch. La sobreexpresión de Notch1 (N1) inhibe el crecimiento tumoral mientras que Notch2 (N2) lo favorece. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las vías de señalización involucradas en la activación de N1 y N2. Utilizamos células HEK293 y células Daoy de MB transfectadas con un plásmido control o los fragmentos intracelulares N1 (NICD1) y N2 (NICD2) y analizamos la expresión de diversos componentes de la vía de señalización. Se evaluó por WB la expresión de STAT3, pAKT, pERK y PTEN y por PCR los ligandos Jagged2 y Delta-like1 y los genes blanco Hes1 y Hes5. En células HEK293 la sobreexpresión de NICD1 aumenta pSTAT3Y705 y pAKT e induce la expresión de Jagged2, Hes1 y Hes5. NICD2 aumenta pSTAT3Y705 y PTEN y la expresión de Hes1, Hes5, Jagged2 y Delta-like1. Tanto NICD1 como NICD2 disminuyen la fosforilación de ERK. Resultados similares se obtuvieron para la línea celular Daoy. En ensayos en agar blando con células Daoy NICD1 inhibe la formación y el crecimiento de colonias, mientras que NICD2 se comporta de forma similar al control. El tratamiento de células Daoy con inhibidores de la vía PI3K/AKT (Ly294002 o Wortmanina) no afectó la fosforilación de ERK. Sin embargo, los inhibidores de la vía de ERK (PD98059 y UO126) produjeron una disminución en la fosforilación de AKT, lo que sugeriría que ERK regularía la vía de PI3K/AKT. La expresión de componentes diferentes de las vías de señalización inducida por N1 y N2 podría explicar los efectos opuestos reportados. El conocimiento de las vías involucradas en la activación de N1 y N2 permitirá comprender el proceso de tumorigénesis y realizar una terapia antitumoral más efectiva.

620. (390) AUTOFAGIA: ¿CAUSA O CONSECUENCIA DE LA TOXICIDAD DEL MANGANESO?

Gorojod R.; Alaimo A.; Miglietta E.; Kotler M.

Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-Oncología, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

El manganismo es una enfermedad neurodegenerativa producida por sobre-exposición crónica a manganeso (Mn). Se ha sugerido que los lisosomas juegan un rol importante en el metabolismo de este metal y en su toxicidad. En este sentido, las ROS generadas por el Mn podrían comprometer la integridad de la membrana lisosomal afectando también la compleción de la vía autofágica. Esta última vía, a su vez, puede cooperar con el daño lisosomal llevando a estas organelas componentes celulares cuya degradación contribuya a aumentar el estrés. En este trabajo estudiamos el rol de la vía autofágica-lisosomal en un modelo de apoptosis inducida por Mn en células C6 de astrocitoma de rata. Los resultados indican que la incubación con Mn 750µM induce un aumento en el tamaño de las vesículas ácidas a 6 y 24hs ($p < 0,001$). Los niveles de la proteína LC3-II se vieron afectados así como también los correspondientes a otras proteínas relacionadas con la autofagia: el Mn generó un aumento en los niveles de Beclina-1, pERK y pJNK y una disminución en pAkt. Los inhibidores de las vías de PI3K clase III (3-MA 10mM y wortmanina 10nM), ERK (PD98059 25µM) y JNK (SP600125 20µM) no lograron prevenir la muerte celular. Por otra parte, los inhibidores de las enzimas lisosomales Catepsina D (Pepstatina A 10µM) y Catepsina B (Ca-074 Me 1µM) fueron capaces de prevenir completamente la muerte ($p < 0,001$) en tanto que con el inhibidor de la v-ATPasa (Bafilomicina A1 0,1nM) este efecto resultó parcial (20%, $p < 0,001$). Por lo tanto, si bien la inducción de la autofagia no estaría contribuyendo con la muerte, la permeabilización de la membrana lisosomal sería un proceso relevante en la toxicidad del Mn. El conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la muerte celular inducida por este metal podría contribuir a nuevas estrategias terapéuticas para el manganismo y otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

621. (495) REGULACIÓN DE LA TIROSINA QUINASA SRC MEDIANTE LA ACTIVIDAD DEL CANAL DE CLORURO CFTR

Massip Copiz M.; Clazure M.; Valdivieso A.; Santa Coloma T.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Pontificia Universidad Católica Argentina, UCA- CONICET.

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva muy frecuente. Es causada por mutaciones en el canal de cloruro CFTR, siendo la más frecuente la delección de una fenilalanina en la posición 508. Anteriormente encontramos que la expresión y activación de SRC estaba aumentada en células FQ y que LPS (lipopolisacárido bacteriano) tenía un rol diferencial en dicha activación. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar las vías de señalización involucradas en la estimulación por LPS y corroborar en otros modelos celulares este aumento de la actividad de SRC. Inicialmente se utilizaron células IB3-1 (con la mutación deltaF508) y S9 (IB3-1 corregidas que expresan CFTR wt) a las cuales se las trató con LPS e inhibidores de las vías de p38 MAPK, NF-κB, MEK 1/2 y JNK 1/2/3. Mediante Western Blots se observó un aumento diferencial de SRC en las células IB3-1 (FQ) comparadas con las S9, luego del tratamiento con LPS, y una disminución de este aumento al ser tratadas con los 4 inhibidores. Posteriormente, se utilizó otro modelo celular para poder corroborar estos resultados: se transfectoron células CaCo2, que expresan CFTR wt, con ARNs de interferencia, los cuales inhibieron la expresión del CFTR en diferente grado. Mediante WB se observó que la actividad de SRC era mayor en las líneas celulares transfectadas que mostraban mayor inhibición del CFTR. A su vez, las células control mostraban un aumento de la actividad de SRC al ser tratadas con el inhibidor de la actividad del CFTR (Inh-172). Paralelamente se está estudiando el posible rol diferencial de la IL-11 en la regulación de SRC. En conclusión, la inhibición de la actividad o expresión del CFTR produce un incremento en la actividad de SRC y las células FQ poseen mayor

sensibilidad que las células normales frente a la estimulación por LPS. Agradecimientos: Subsidios ANPCYT (PICT-2007-00628, PICT-2012-1278), CONICET (PIP 2009-2011, PIP 2012-2014) y UCA. Becas CONICET (MMMC, MC) y UCA (AGV).

622. (599) MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR EL ANÁLOGO TUMORAL DE PTH EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO

Calvo N.; Martín M.; Russo de Boland A.; Gentili C.
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

El péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP, también conocido como su análogo tumoral) se encuentra normalmente en el feto y en la mayoría de los tejidos adultos. Su expresión se correlaciona con la severidad del carcinoma de colon. En trabajos previos observamos que en la línea celular Caco-2 derivada de adenocarcinoma de colon humano PTHrP favorecería la progresión del ciclo celular aumentando la expresión de la quinasa Cdk6 y disminuyendo la de las proteínas inhibitorias del ciclo celular p27Kip1, p15INK4B y p53 a través de la vía de señalización de las MAPquinasas ERK1/2. El objetivo del presente trabajo fue profundizar los mecanismos moleculares involucrados en la modulación por PTHrP de la expresión de moléculas relevantes para la progresión del ciclo celular. Para tal fin las células Caco-2 fueron pre-incubadas con los inhibidores de p38 MAPK (SB203580) o de PI3K (LY294002) y luego tratadas con PTHrP (10^{-8} M, 1 y 24 horas), seguido de análisis por Western blot de la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular. Se observó que la inhibición de la actividad de p38 MAPK y de PI3K revirtió la respuesta hormonal. Además la tinción de los núcleos con iodo de propidio y la medición del contenido de ADN por citometría de flujo revelaron que el tratamiento con PTHrP durante 24 horas disminuye el número de células en la fase G0/G1 y las aumenta en las fases S y G2/M. En conjunto estos resultados indican que PTHrP favorece la progresión del ciclo celular de las células intestinales Caco-2 modulando la expresión de proteínas reguladoras del ciclo a través de las vías de señalización de las MAPKs y PI3K/Akt. La comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el efecto mitogénico de PTHrP podría contribuir para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas con el fin de inhibir la acción de la hormona en células de cáncer de colon.

623. (669) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR GLUCOCORTICOIDE POR LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE TIPO 1

Granja-Galeano G.¹; Domínguez-Rubio A.²; Zappia C.¹; Fitzsimons C.³; Franchi A.²; Monczor F.¹
Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, Holanda³.

Los receptores a cannabinoides (CB) y a glucocorticoides (GR) se coexpresan en diversas áreas del sistema nervioso central incluyendo el hipocampo, una estructura involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria. Se ha sugerido que el sistema CB participa en la regulación de la actividad del GR en dicha área, por lo que el objetivo de nuestro trabajo es estudiar el efecto de la activación del receptor CB de tipo 1, acoplado a Gi, sobre la actividad transcripcional del GR. Para ello, células de neuroblastoma N2A que expresan ambos receptores se transfectoron con un sistema reportero de la actividad del GR (TAT3-LUC) y se evaluó la respuesta a Dexametasona (Dex) en presencia y ausencia de ligandos del CB1. La respuesta a Dex disminuyó tanto en presencia de los agonistas ACPA, CP55940, HU210, que reducen los niveles de AMPc, como de los agonistas inversos AM251 y O2050, que aumentan los niveles del mismo. Para investigar el rol de las subunidades Gβγ, se sobreexpresaron distintas isoformas (β1, 2, y γ2, 5 y 11) y sólo la sobreexpresión de

□2 provocó una disminución en la respuesta a Dex (48%; $p < 0,001$). Con el fin de validar el efecto del CB1 sobre la actividad del GR *in-vivo*, se estudió por qPCR la expresión de dos genes regulados por el GR, GILZ y SLC19A, en el hipocampo de ratones CD1 con fenotipo salvaje y KO CB1^{-/-}. Los ratones se trataron vía *i.p.* con 0,1 ml de vehículo o Dex 0,54 mg/ml durante 6h. La inyección de Dex provocó un aumento del 100% en la expresión de ambos genes en los ratones salvajes, mientras que el aumento fue del 150% en los ratones CB1^{-/-} ($p < 0,05$), indicando que la presencia del CB1 ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad del GR en el hipocampo. Los resultados indican que la señalización del CB1 inhibe la actividad del GR, y que dicha inhibición involucraría a las subunidades $\gamma 2$, y no al AMPc, sugiriendo la existencia de un nuevo mecanismo molecular por el cual el sistema CB podría regular la actividad genómica del GR en el SNC

624. (802) REGULACIÓN DUAL DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA MULTIDROGA 4 (MRP4/ABCC4) MEDIADA POR AMPc

Carozzo A.¹; Shayo C.²; Davio C.¹; Fernandez N.¹.

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET².

MRP4 excluye una amplia variedad de compuestos exógenos y endógenos y se encuentra asociado al grado de malignidad y diferenciación en distintos tumores. Dicho transportador resulta crucial en la regulación de los niveles intra y extracelulares de AMPc (AMPci/e) implicados en los procesos de progresión tumoral. Por lo tanto, nos propusimos evaluar si el AMPc regula a su vez la expresión de MRP4. Utilizando como modelo la línea celular tumoral pancreática AR42J, observamos que el tratamiento con dbAMPc y Forskolina aumenta los niveles de ARNm de MRP4. Estos resultados fueron confirmados utilizando una construcción reportera conteniendo al promotor de MRP4 río arriba del cDNA de luciferasa. Sin embargo, el tratamiento con AMPc condujo a una disminución en la actividad del promotor. Dado que PKA y EPAC representan los blancos tradicionales del AMPc, evaluamos el papel de estas proteínas en la regulación de MRP4, utilizando construcciones dominantes negativas o salvajes. Los resultados indican que EPAC2 media los efectos positivos sobre la actividad del promotor. Consistentemente, la presencia de una construcción Rap-GAP bloqueó en un 50% el efecto positivo de dbAMPc, sugiriendo a la actividad GEF de EPAC2 como la mediadora de la inducción de la expresión de MRP4 por el AMPc. Dado que el tratamiento de las células con AMPc conduce a un incremento en los niveles de pERK evaluamos el papel de esta vía en el efecto negativo de AMPc sobre la actividad del promotor. El tratamiento con PD98059 (inhibidor de MEK) aumentó la actividad del promotor y bloqueó la represión causada por AMPc. A su vez, la activación de la vía por EGF resultó en una menor actividad transcripcional, indicando que la vía de MEK/ERK media el efecto negativo de AMPc sobre la expresión de MRP4. Estos resultados sugieren la existencia de una regulación a nivel transcripcional de MRP4 mediada por el balance entre el AMPc y AMPce, y sugieren un mecanismo de regulación recíproco entre MRP4 y AMPc.

625. (804) LA SOBREENEXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE MEMBRANA OXER1, CON ALTA AFINIDAD PARA PRODUCTOS DE LA 5-LIPOXIGENASA, INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES ESTIMULADA POR AMPc

Leone M.; Neuman M.; Maloberti P.; Cornejo Maciel F. Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Departamento de Bioquímica Humana Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La regulación hormonal de la esteroidogénesis involucra al ácido araquidónico, precursor de los productos lipoxigenados necesarios para la inducción de la proteína StAR y activación de la esteroidogénesis, independientemente del estímulo que desencadena la respuesta. En otros sistemas, 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 5-oxo-ETE, 5-HpETE y 5-HETE, productos de la 5-lipoxigenasa. En estudios previos demostramos la presencia del receptor OxeR1 en células esteroidogénicas humanas de la línea H295R productoras de mineralocorticoides. Farmacológicamente demostramos que el OxeR1 estaría involucrado, al menos en parte, en la acción del 8Br-AMPc, análogo permeable del segundo mensajero. El objetivo de este estudio fue identificar al OxeR1 como mediador de la respuesta hormonal. Para ello, el ADNc del OxeR1 obtenido de células adrenocorticales humanas H295R fue clonado en un vector de expresión. Esta construcción se utilizó para transfectar células esteroidogénicas murinas de Leydig en cultivo de la línea MA-10. Por western blot con anticuerpos que reconocen a la forma humana del receptor, se verificó que la transfección de esta construcción produce un aumento de los niveles del OxeR1. En las células que sobreexpresan el OxeR1 se determinó la respuesta al estímulo con 8Br-AMPc, registrando un incremento significativo en la producción de progesterona medida por RIA (transfección control 245±2 vs transfección ADNc OxeR1 299±13 ng progesterona/ml, $P < 0,05$). En conclusión, este trabajo demuestra que los productos lipoxigenados actúan a través de receptores de membrana en la regulación de la síntesis de esteroides mediada por AMPc.

CARDIOVASCULAR 3

626. (17) MICROPARTÍCULAS ALGÍNICO-ATENOLOL OBTENIDAS MEDIANTE SECADO POR ATOMIZACIÓN. RELACIONES PRODUCTO-PROCESO DE INTERÉS FARMACÉUTICO

Ceschan N.; Bucalá V.; Ramírez Rigo M. Planta Piloto de Ingeniería Química.

En ensayos exploratorios previos se obtuvieron micropartículas (MP) mediante secado por atomización (SA) de dispersiones acuosas de atenolol (At, fármaco básico) y ácido algínico (AA, polielectrolito aniónico mucoadhesivo) en distintas proporciones relativas: 0.3, 0.6 y 0.9g_{At}/g_{AA}. Los componentes de las MP forman un complejo iónico con alta potencialidad para la administración inhalatoria de At (antihipertensivo de baja biodisponibilidad oral). Considerando que el diseño óptimo de materiales requiere establecer relaciones de relevancia tecnológica y biofarmacéutica entre calidad del producto, proceso de obtención y aplicación propuesta, este trabajo analiza el efecto de la composición de la formulación AA-At y del proceso de SA sobre las propiedades de las MP obtenidas. Para ello se evaluó: a) potencial electrocinético de las dispersiones acuosas, b) rendimiento del SA, c) contenido de At en las MP y d) temperatura de transición vítrea (Tg) de los productos. Todas las dispersiones a atomizar presentaron alto potencial electrocinético negativo (entre -37.23 y -42.73mV) considerándose físicamente estables y aptas para su atomización en continuo. El SA se llevó a cabo manteniendo la concentración de sólidos totales (1.6%p/v) y las condiciones operativas constantes. Los rendimientos del SA fueron adecuados (e.g., en la suspensión conteniendo 0.6g_{At}/g_{AA} se colectó el 66% del material sólido atomizado), siendo todos ellos significativamente mayores a los obtenidos para materiales puros (AA: 37%, At: 29%). Las MP presentan alta eficiencia de cargado. La concentración de At en las mismas fue de 0.5, 0.9 y 1.7g_{At}/g_{AA}. Estos resultados indican que la composición del producto resultó diferente al material atomizado, lo que se asocia a un pegado diferencial de AA a la cámara de secado. La Tg aumentó con el contenido de At en las MP. Este incremento se debe al efecto antiplastificante que At ejerce sobre la estructura de AA ocupando el volumen libre entre las cadenas.

627. (181) VARIABILIDAD DE REGISTROS CARDIOLÓGICOS Y RESPIRATORIOS A TRAVÉS DE DIAGRAMAS DE POINCARÉ, EN SUJETOS NORMALES Y EN PACIENTES CON DAÑO CEREBRAL

Miguel M.¹; De Vito E.^{1,2,3}; Arce S.¹; Escobar M.³; Morel Vulliez G.³; De Negri C.^{1,2}.

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; Centro del Parque³.

Introducción: La variabilidad de los patrones cardíacos (PC) y respiratorios (PR) pueden estudiarse por los diagramas de Poincaré, un método gráfico que permite cuantificar la distribución de una nube de puntos midiendo su desvío estándar transversal (SD1) y longitudinal (SD2) asociados a la variabilidad a corto y largo plazo respectivamente del parámetro en estudio. El objetivo fue analizar la variabilidad del PC, a través del intervalo RR, y del PR, por el intervalo respiratorio (Ttot), en normales (N) y pacientes con estado vegetativo persistente (EVP) por daño cerebral. La hipótesis es que los EVP presentarían menor variabilidad del PR y del PC respecto a los N. **Material y Método:** Registros de flujo aéreo (~1 h) en N (n 19) y en EVP (n 20). Los registros de PC se realizaron a través de un Holter cardíaco de 24 hs mientras se realizaba el registro respiratorio dentro de ese lapso. Se seleccionaron los PR con Ventilación estacionaria según criterio 2 y de ellos, se tomaron los Ttot según criterio 1 (D'Negri et al, Medicina 2011; 174 (S.III)). El análisis de Poincaré se basó en 4 descriptores establecidos: media, SD1, SD2, cociente SD2/SD1. Se aplicó el test Mann-Whitney ($p < 0.05$). **Resultado:** En el RR, son mayores la media, SD1 y SD2 en N. En el RR 24hs, se repite en media y SD2. En el Ttot, no hay diferencias. Se comparó promedio de las varianzas del RR y del Ttot para cada grupo. En N, el promedio de varianza en el RR fue (0.0030 ± 0.0020) seg2, y en el Ttot= (0.53 ± 0.35) seg2. En EVP, el promedio de varianza en el RR fue (0.00033 ± 0.00047) seg2 y en el Ttot= (0.15 ± 0.098) seg2. Se observa que los EVP tienden a presentar una menor varianza en el RR y en el Ttot respecto de los N. **Conclusión:** El RR mostró menor variabilidad en los EVP, a corto y largo plazo. El análisis de RR y Ttot muestra además que existe una tendencia a agrupamiento de acuerdo a las varianzas de cada grupo. Esta rigidez en los PR y PC podría tener significación pronóstica.

628. (195) ALTERACIONES VASCULARES MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES INDUCIDAS POR UNA DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC DURANTE LA VIDA FETAL Y EL CRECIMIENTO

Mendes Garrido F.; Gobetto N.; Juriol L.; Dasso M.; Brunello F.; Wenk G.; Caniffi C.; Elesgaray R.; Costa A.; Tomat A.; Arranz C.
Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química y Metalurgia del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET.

La deficiencia de zinc durante el crecimiento induce alteraciones cardíacas y renales en el adulto. En este trabajo evaluamos la presión arterial sistólica (PAS) y las alteraciones vasculares en ratas machos (m) y hembras (h) sometidas a una deficiencia moderada de zinc. Ratas Wistar hembras recibieron dieta baja en zinc (B, 8ppm) o control (C, 30ppm) durante la preñez hasta el destete (día 21). Las crías continuaron con dieta B o C durante 60 días post-destete (BBm y BBh, CCm y CCh, BCm y BCh). A los 81 días de vida se determinó la PAS por el método tail-cuff y se estudió la morfología de la aorta torácica y arterias coronarias; la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en aorta usando [¹⁴C] L-Arginina; la relajación con acetilcolina de anillos de aorta precontractados con fenilefrina. **Análisis estadístico:** ANOVA de dos factores, test a posteriori Bonferroni ($n=6$ /grupo). Los animales BBm mostraron elevada PAS ($p < 0.01$) que probablemente indujo un remodelado hipertrófico hacia la luz en arterias coronarias. No se observaron cambios morfológicos en la aorta, pero esta presentó menor actividad de NOS ($p < 0.01$). La dieta control luego del destete (BCm) no corrigió estas alteraciones. Las hembras BB y BC no presentaron alteraciones en la PAS ni en la morfología vascular, aunque mostraron una disminución en la actividad de NOS ($p < 0.01$) y en la relajación de la aorta frente a la acetilcolina ($p < 0.01$). Esto sugiere una disfunción endotelial que afectaría la capacidad de los vasos de conductancia de responder adecuadamente ante cambios en el flujo sanguíneo y las fuerzas de rozamiento. El zinc es un micronutriente importante para el

desarrollo y la función arterial. Su deficiencia durante la vida fetal y el crecimiento genera cambios en los vasos sanguíneos que contribuirían a la programación de la enfermedad cardiovascular en la adultez. Se observan diferencias de género en las alteraciones cardiovasculares en respuesta a esta injuria nutricional.

629. (285) FUNCIÓN MITOCONDRIAL CARDÍACA EN ENDOTOXEMIA AGUDA: EFECTO DE (-)EPICATEQUINA

Pereyra L.^{1,2}; Vanasco V.^{1,2}; Marchini T.¹; Fraga C.^{1,2}; Galliano M.^{1,2}; Álvarez S.^{1,2}.
Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET¹ Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la disfunción mitocondrial estaría asociada al funcionamiento cardíaco en endotoxemia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de (-)-epicatequina (EC) dietaria sobre la disfunción mitocondrial cardíaca en este modelo. Ratas hembra Sprague-Dawley de 180 g fueron alimentadas con una dieta enriquecida con EC (100mg/kg/día) durante 4 días. Luego de este pretratamiento, los animales fueron inyectados ip con LPS (10 mg/kg) para producir endotoxemia aguda. Los grupos experimentales estudiados fueron: control (C), EC (E), LPS y LPS + EC (PLS + E). Los estudios se realizaron 6 h luego del tratamiento con LPS. El pretratamiento con EC previno el aumento observado, debido al proceso endotoxémico, en los niveles de cardioplipina oxidada (40%) y la disminución observada en la actividad del complejo I mitocondrial (20%, $C: 187 \pm 22$ umol/min.mg prot, $p < 0.05$). El pretratamiento con EC no previno el aumento observado en los niveles sanguíneos de NO-Hb y la disminución observada en la respiración mitocondrial en estado 3, control respiratorio y potencial de membrana mitocondrial. En conjunto, estos resultados muestran que una dieta enriquecida en EC mejora la función mitocondrial cardíaca en la endotoxemia, preservando los niveles de lípidos esenciales mitocondriales de la oxidación y la actividad del complejo I mitocondrial.

630. (302) EFECTOS DEL EJERCICIO MODERADO E INTENSO SOBRE LA HIPERTROFIA CARDÍACA Y LA FUNCIÓN VENTRICULAR EN RATONES

Wilensky L.¹; González G.¹; Dannunzio V.¹; Cassaglia P.¹; Pérez V.¹; Casanova V.²; Cicale E.²; Morales C.¹; Gelpi R.¹.
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Bioterio Central, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires².

Son conocidos los beneficios del ejercicio, en términos generales, sobre diferentes aspectos cardiovasculares. Sin embargo, esto dependería de la intensidad del ejercicio realizado. Por lo tanto, el objetivo fue evaluar el efecto de un protocolo de ejercicio moderado y otro intenso sobre la hipertrofia miocárdica, la función ventricular basal, la reserva miocárdica y la producción de lactato en ratones. Usamos Ratones machos FVB (3 meses) en tres grupos: 1) Sedentario (Sed): sin ejercicio; 2) Ejercicio moderado (EM): nadan durante 90 minutos/día, 6 días/semana y 3) Ejercicio intenso (EI): nadan 90 minutos/2 veces por día, 6 días/semana. A las 4 semanas fueron anestesiados y los corazones fueron aislados y perfundidos (Langendorff). Se evaluó la hipertrofia, función ventricular basal y en respuesta al Isoproterenol (ISO, 56 ng/kg), y el lactato en plasma. El cociente peso VI/longitud de la tibia fue en el Sed: 5.4 ± 0.4 , EM: 5.4 ± 0.2 y EI: 6.9 ± 0.2 ($p < 0.05$, EI vs Sed y EM). El inotropismo y la relajación isovolúmica en condiciones basales fueron similares entre grupos. El ISO incrementó la $+dP/dt_{max}$ 49±9% en Sed; 39±11% en EM; y 24±5% en EI ($p < 0.05$, EI vs Sed). El ISO disminuyó el t_{93} (índice de relajación) 10.43±2.03% en Sed; 6.52±1.54% en EM y 4.33±1.73% en EI ($p < 0.05$, EI vs Sed). La producción de lactato fue Sed: 4.0 ± 0.3 , EM: 4.9 ± 1.3 y EI: 7.8 ± 1.0 mmol ($p < 0.05$, Sed vs EI). El ejercicio intenso a diferencia del ejercicio moderado produce un efecto deletéreo sobre la reserva inotrópica y lusitropica, sin modificar la función ventricular basal. Este hecho podría limitar la capacidad de respuesta adaptativa del miocardio a diferentes situaciones de

estrés. El aumento de lactato en plasma sugiere que los animales con ejercicio intenso estuvieron en condiciones de anaerobiosis. Este efecto deletéreo no se observa frente a un ejercicio de menor intensidad, mostrando también menor hipertrofia cardíaca y en la producción de lactato que el ejercicio intenso.

631. (332) EL GPR30 EMERGE COMO EL NUEVO RECEPTOR DE MEMBRANA QUE MEDIA LOS EFECTOS NO- GENÓMICOS DE ALDOSTERONA EN CORAZÓN

De Giusti V.; Orłowski A.; Ciancio M.; Gonano L.; Vila Petroff M.; Aiello E.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de la Plata.

El cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cardíaco (NBC) es, junto al intercambiador Na^+/H^+ (NHE), uno de los principales mecanismos alcalinizantes de los miocitos. En corazón, Aldosterona (Aldo) aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y activa al NHE por mecanismos no-genómicos mediados por el receptor de mineralocorticoide (MR). Recientemente, el receptor de membrana acoplado a proteína G (GPR30) emergió como el mediador de ciertos efectos rápidos de Aldo en músculo liso vascular. Hasta el presente no se han reportado efectos de Aldo sobre el NBC, siendo el objetivo del presente trabajo investigar dicho efecto. Para calcular la actividad del NBC se utilizaron miocitos ventriculares aislados de ratas Wistar y se realizaron dobles pulsos de amonio (el primer pulso es el control del segundo) en un medio extracelular con bicarbonato y el inhibidor del NHE (HOE 642 $10\mu\text{M}$). Los datos se expresan como porcentaje de flujo de HCO_3^- y * indica $p < 0.05$ vs control. Aldo 10 nM aumentó la actividad del NBC $44 \pm 11\%$ ($n=5$), efecto prevenido con Eplerenona ($1\mu\text{M}$, bloqueante del MR; $14 \pm 9\%$, $n=4$), pero no con Cicloheximida ($10\mu\text{M}$, inhibidor de la síntesis proteica; $36 \pm 3\%$, $n=4$), demostrando que es un efecto rápido y no-genómico. Adicionalmente, el efecto de Aldo fue prevenido tanto con Apocinina ($300\mu\text{M}$, inhibidor de la NADPH oxidasa; $8 \pm 12\%$, $n=4$) como con MPG (2 mM , secuestrador de ROS; $-0.2 \pm 12\%$, $n=4$), implicando a los ROS en la activación del NBC por Aldo. Sorprendentemente, la activación del NBC por Aldo también fue prevenida preincubando a los miocitos con G15, un bloqueante selectivo del GPR30 ($1\mu\text{M}$; $-8.5 \pm 3\%$, $n=5$), sugiriendo la participación de tal receptor en el efecto de Aldo sobre el NBC. Consistentemente, la presencia de G1 (agonista del GPR30) activó al NBC ($1\mu\text{M}$, $85 \pm 17\%$, $n=7$), efecto que, de forma similar a lo ocurrido para Aldo, fue prevenido con G15 ($18 \pm 10\%$, $n=5$), Eplerenona ($34 \pm 9\%$, $n=6$), cicloheximida ($-17 \pm 27\%$, $n=6$), MPG ($-29 \pm 9\%$, $n=7$) y Apo ($-16.2 \pm 8\%$, $n=7$). En experimentos paralelos, G1 aumentó la producción de ROS en miocitos aislados, efecto prevenido en presencia de G15 (control: 0.9 ± 0.2 ; $n=8$; G1: 1.91 ± 0.47 ; $n=11$; G1+G15: 0.63 ± 0.2 ; $n=6$). Nuestros resultados demuestran por primera vez que Aldo, por medio de la activación del receptor GPR30, estimula al NBC a través de un mecanismo rápido y no-genómico, que implica la producción de ROS. Pensamos que la participación del GPR30 en la vía de señalización de Aldo abre nuevos caminos en la investigación de los efectos de la hormona en el corazón.

632. (401) LA VIA AKT/ENOS/GSK-3 BETA ESTÁ INVOLUCRADA EN LA DISMINUCIÓN DEL TAMAÑO DEL INFARTO PRODUCIDA POR UN EXTRACTO ACUOSO DE ILEX PARAGUARIENSIS

González Arbeláez L.¹; Fantinelli J.¹; Schinella G.²; Mosca S.¹

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de la Plata¹; Cátedra de Farmacología Básica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de la Plata².

En experimentos previos demostramos la acción beneficiosa de un extracto acuoso de *Ilex paraguayensis* (IP) sobre el atontamiento miocárdico. El objetivo de esta investigación fue examinar los efectos de la administración de dicho extracto en un modelo de isquemia regional estudiando los mecanismos implicados. Corazones aislados de ratas Wistar y perfundidos según la téc-

nica de Langendorff fueron sometidos a un período de 40 min de oclusión coronaria (producida por ligadura de la arteria descendente anterior) seguido de un período de reperfusión de 60 min. Otro grupo de corazones fueron tratados durante los primeros 10 minutos de la reperfusión con una dosis de 25 mg/ml de IP. Se midió el tamaño del infarto (TI), por medio de la tinción con sales de tetrazolio (TTC), y se evaluó la función miocárdica postisquémica. En el tejido miocárdico se determinó la concentración de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el nivel de glutatión reducido (GSH) y la actividad citosólica de SOD como indicadores del estado oxidativo. La expresión de eNOS, Akt, ERK1/2, p90RSK y GSK-3beta fueron determinadas por western blot. El tratamiento con IP disminuyó significativamente el TI ($20 \pm 3\%$ vs $38 \pm 3\%$ en corazones isquémicos no tratados) y mejoró la recuperación miocárdica postisquémica. Las TBARS disminuyeron, el nivel de GSH se preservó parcialmente y la actividad de SOD disminuyó. El contenido de eNOS, Akt y GSK-3beta aumentaron significativamente después del tratamiento con IP ($24 \pm 4\%$, $41 \pm 2\%$ y $19 \pm 5\%$, respectivamente), mientras que ERK1/2 y p90RSK no se modificaron. El presente estudio demuestra que la administración de IP sólo en la reperfusión ejerce efecto cardioprotector disminuyendo la muerte celular y el daño oxidativo generados por la isquemia-reperfusión. Estos efectos serían mediados por la vía Akt-eNOS-GSK-3beta.

633. (402) DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y SUS CONSECUENCIAS EN EL REMODELADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR

Gualco L.; Oberkersch R.; Rasente R.; Egitto P.; Calabrese G.

Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El estrés del Retículo Endoplásmico (RE) es un promotor relevante de la patología vascular. La hipoxia, inductora de estrés del RE, incrementa la expresión del RNAm de la metaloProteinasa de matriz (MMP)-2. Nuestro objetivo general es estudiar la participación del estrés del RE en el remodelado de la matriz extracelular vascular (MEX). En esta primera etapa estudiamos la actividad de las MMPs endoteliales frente a la hipoxia inducida por cobalto. Endotelio microvascular murino fue sometido a concentraciones crecientes de CoCl_2 (0, 250, 500 y $1000\mu\text{M}$) y tiempos variables de incubación (4, 6 y 24 horas), a 37°C y CO_2 al 5%. Sobre las muestras se estudió: 1) actividad metabólica celular mediante la técnica de exclusión del azul tripán y del MTT; 2) activación celular a través de la translocación al núcleo del NFkB por inmunofluorescencia y 3) la actividad de las MMP-2 y 9 por zimografía en los sobrenadantes de los cultivos. La actividad metabólica celular mostró un descenso significativo, por ambos métodos, a 500 y $1000\mu\text{M}$ de CoCl_2 , durante 24 horas ($p < 0.05$; 0 vs 500 y 0 vs $1000\mu\text{M}$, CoCl_2 μM). Se evidenciaron, a altas dosis, cambios en la morfología y pérdida de la adherencia al soporte. Las inmunofluorescencias no revelaron cambios en la translocación del NFkB al núcleo. La actividad de las MMP-2 y 9 mostró un ligero incremento a $250\mu\text{M}$, mientras que a $1000\mu\text{M}$ se evidenció una disminución significativa en la actividad de MMP-9 ($p < 0.05$, 0 vs $1000\mu\text{M}$, CoCl_2 μM). Por lo tanto, la hipoxia inducida por $250\mu\text{M}$ CoCl_2 durante 24 horas: 1) no estimula la actividad metabólica celular, 2) no produce un incremento en la activación celular medida a través de la translocación de NFkB y 3) favorecería el remodelado de la matriz extracelular vascular a través de MMP-2 y 9. La injuria endotelial con CoCl_2 permitiría desarrollar estudios que relacionen el remodelado de la MEX con los mecanismos de estrés del RE.

634. (474) PARTICIPACIÓN DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3 KINASA (PI3K) EN LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA ROSUVASTATINA EN CORAZONES SUJETOS A ISQUEMIA – REPERFUSIÓN

Vélez D.¹; Torresin E.¹; Tartaglia S.¹; Hermann R.¹; Varela A.^{1,2}; Marina-Prendes M.^{1,2}.

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química y Meta-

bolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONCIET, Universidad de Buenos Aires².

Anteriormente demostramos que los corazones perfundidos con rosuvastatina (R) mejoraban su recuperación funcional, mientras que el empleo de wortmanina (W, 100nM), inhibidor de la PI3K, anulaba los efectos beneficiosos de la R. El objetivo del siguiente trabajo fue evaluar la participación de la vía PI3K en los efectos cardioprotectores de la R sobre la funcionalidad mitocondrial y el daño celular. Se emplearon corazones perfundidos Langendorff provenientes de ratas hembras Wistar (250–300 g de peso corporal) alimentadas ad libitum. Los mismos fueron sometidos a 25 min de isquemia (I)-60 min de reperfusión (Rep). La R (3µM) se empleó en el medio de perfusión 10 min antes de la I global total (R1) o durante toda la Rep (R2). La W se suministró 5 min antes de la R previo a la I o durante toda la Rep. El daño tisular se evaluó mediante la liberación de creatina quinasa (CK) al medio durante los primeros 10 min de Rep. La determinación de la funcionalidad mitocondrial se realizó finalizada la Rep (60 min). La estadística se hizo con ANOVA (n=6/grupo). Las mitocondrias provenientes de corazones tratados con R presentaron una mayor capacidad de síntesis de ATP (ATP moles/µg de proteínas/min.10⁻¹²), el empleo de W anuló las diferencias entre los grupos experimentales: Control (C) 1.82±0.12, C+W en estabilización 2.06±0.20, C+W en reperfusión 1.98±0.23, R1 8.89±0.22*, R2 9.3±0.31*, R1+W 1.5±0.33, R2+W 2.09±0.32 (*p<0.05 vs C, C+W estabilización y reperfusión, R1+W, R2+W). El tratamiento con R (R1 y R2) redujo los niveles de CK (U/gh) liberados al medio de reperfusión, el empleo de W revirtió el efecto de la R: C 60±5.0, C+W en estabilización 62±4.8, C+W en Rep 61±5.6, R1 32±3.0*, R2 28±6.2*, R1+W 50±8.0, R2+W 63±6.0 (*p<0.05 vs C, C+W estabilización y Rep, R1+W, R2+W). Los resultados sugieren la participación de la PI3K en la mejor respuesta funcional mitocondrial y en el menor daño tisular determinado en los corazones perfundidos con R (R1, R2).

635. (547) LRP1 SE EXPRESA DIFERENCIALMENTE EN SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y PRESENTA NIVELES DISMINUIDOS EN MONOCITOS CLÁSICOS DE PACIENTES CON LESIÓN ATEROESCLERÓTICA CAROTÍDEA RESPECTO A INDIVIDUOS SANOS

Albertini R.¹; Ferrer D.²; Amigone J.¹; Tinti M.¹; Collino C.²; Capra R.¹; Chiabrando G.².

Hospital Privado Centro Médico de Córdoba¹; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba².

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria donde los monocitos de sangre periférica (MSP) participan en el inicio y desarrollo de la placa de ateroma. Los MSP se clasifican en tres subpoblaciones, por expresión diferencial de CD14 y CD16, como clásicos (C), intermedios (I) y no clásicos (NC). LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) controla la migración de macrófagos y proliferación de células musculares lisas vasculares en el desarrollo de lesión aterosclerótica (LA). LRP1 es expresado en MSP, pero se desconoce si lo hace a nivel de todas las subpoblaciones y si la expresión se modifica en pacientes con LA en relación con sujetos normales. El principal objetivo de este trabajo fue establecer el nivel de expresión de LRP1 en SM en sujetos sanos y en pacientes con LA carotídea. A través de un ensayo propio de citometría de flujo se midió la expresión de LRP1 a nivel de la superficie celular en SM en individuos sanos (FS 10 años Hard <1%; n=22 [11F-11M]; media=33,0 ± DE=9,3 años) y en pacientes con LA carotídea (Eco-Doppler placa positiva o engrosamiento de íntima-media >1 mm; n=72 [50F-22M]; 50,1±6,7 años). En individuos sanos, la expresión de LRP1 en MIF (por mean intensity fluorescence) fue significativamente mayor (p<0,0001) en monocitos C (media=101; IC95%=79-124) y monocitos I (106; 86-125) que en monocitos NC (59; 49-69), siendo la relación de expresión de LRP1 en C/NC= 1,68±0,47 y en C/I=0,95±0,24. En

pacientes con LA, LRP1 mostro una significativa disminución (p<0,05) en monocitos C (86; 77-96) respecto a individuos sanos, sin modificación en monocitos I (105; 95-115) y N-C (58; 53-63). La relación de LRP1 en C/NC y C/I fue significativamente menor (p<0,05) en pacientes con LA respecto a sanos. En conclusión: i) LRP1 es diferencialmente expresado en SM; ii) la expresión de LRP1 es menor en monocitos C de pacientes con LA que en sanos; y iii) el nivel de expresión de LRP1 en MSP podría ser utilizado como un biomarcador de enfermedad aterosclerótica.

636. (567) EL AUMENTO DEL CALCIO INTRACELULAR DISMINUYE LA CONDUCCIÓN VENTRICULAR E INCREMENTA LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE LA SERINA368 DE LA CONEXINA 43: POSIBLE SINERGISMO ENTRE LA CALCINEURINA Y LA PROTEÍNA QUINASA C

Orlowski A.¹; Waheed A.²; Salvage S.²; Michael A.²; Fry C.²; Jabr R.²; Aiello E.¹.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata¹; Biochemistry and Physiology, University of Surrey, Gran Bretaña².

Una de las causas de la generación de arritmias ventriculares es una propagación anormal del potencial de acción debido a una disminución de la velocidad de conducción (VC). Esto es originado principalmente por un incremento en la resistencia de las uniones gap (Rj). En el ventrículo izquierdo las uniones gap están compuestas por fosfoproteínas ricas en serina conocidas como conexinas (Cx), en particular la isoforma Cx43. La conductancia de la Cx43 se encuentra regulada mediante su estado de fosforilación. Uno de los sitios más estudiados es Ser-368, el cual al ser fosforilado por PKC reduce su conductancia. Las arritmias ventriculares están asociadas a un incremento del [Ca²⁺]_i, el cual es capaz de incrementar la actividad de la serina-treonina proteína fosfatasa, calcineurina (Cn). Previamente hemos demostrado, en músculos papilares de ventrículo izquierdo, que un incremento del [Ca²⁺]_i por el marcapaseo rápido o por disminución del Na⁺ extracelular, provoca la reducción de la VC, y dicho efecto era abolido por la presencia del inhibidor de Cn, ciclosporina A (CyA). Sin embargo, hasta el momento no esta claro el rol de la Cn sobre la Rj. Los inhibidores de la Cn no tuvieron efecto sobre la Rj basal ([Ω.cm], Control: 327±149, n=8; CyA: 327±176, n=8; AIP: 304±95, n=4), mientras que el inhibidor de PKC, celeritrina [CHE, 2mM] la disminuyó ([Ω.cm], Control: 392±83, n=5; CHE: 203±46, n=5. *p<0.01). El aumento del [Ca²⁺]_i provocó un incremento de la Rj que fue prevenido por CyA y CHE ([Ω.cm], Control: 404±128, n=8; ↑[Ca²⁺]_i: 936±244, n=8; CyA: 520±101, n=8; CHE: 558±121, n=5. *p<0.01). Además, se encontró un aumento de la fosforilación Cx43-Ser-368 que fue prevenida por la presencia de ambos inhibidores ([u.a.], Control: 0.05±0.02, n=6; ↑[Ca²⁺]_i: 0.89±0.41, n=6; CyA: 0.16±0.1, n=6; CHE: 0.07±0.05, n=6. *p<0.05). En conclusión, el incremento de [Ca²⁺]_i está asociado a un incremento en la fosforilación de Cx43-Ser368 y un incremento en la Rj. El sitio Ser-368 sólo puede ser fosforilado por PKC. En condición basal este sitio parece estar enmascarado por el sitio pSer-365, el cual al ser desfosforilado por calcineurina permite que la Ser-368 pueda ser fosforilada por PKC aumentando la Rj.

637. (587) LA ACTIVACIÓN DE LA QUINASA P38 (P38) LUEGO DEL ESTIRAMIENTO DEL MIOCARDIO LIMITA LA FOSFORILACIÓN DEL INTERCAMBIADOR NA+/H+ (NHE1) MODULANDO NEGATIVAMENTE LA SEGUNDA FASE DE FUERZA (SFF)

Díaz R.; Villa-Abrille M.; Zavala M.; Ennis I.; Pérez N.; Cingolani H.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

El estiramiento miocárdico induce un aumento rápido de fuerza (mecanismo de Frank-Starling) seguido de uno lento o SFF. La SFF se cancela por bloqueo de receptores AT1 de angiotensina II (AngII), antioxidantes e inhibición del NHE1. Esto ha permitido sugerir que es la expresión mecánica de un mecanismo autocrino de liberación de AngII que lleva a la activación redox-sensible del

NHE1, aumentando el Na⁺ intracelular y consecuentemente el Ca²⁺ responsable de la SFF. Dado que en músculo liso vascular la inhibición de p38 aumenta la actividad del NHE inducida por AngII hipotetizamos que su inhibición aumentaría la SFF. Usamos músculos papilares aislados de rata y los estiramos de 92 a 98% de su longitud máxima. La SFF, que aumentó 17±2% más que la fase rápida inicial (n=6, p<0.05), se incrementó a 29±2% (n=6, p<0.05 vs. SFF control) al inhibir p38 (10µM SB202190) y se acompañó de un aumento en la actividad (fosforilación) de p38 (34±2% vs. control no estirado, n=4, p<0.05), y de un incremento mayor en la fosforilación de ERK1/2 (en% del control no estirado: 166±16, estirado, n=3 vs. 232±14, estirado+SB202190, n=3, p<0.05). A fin de determinar si p38 disminuía la actividad del NHE1 medimos la velocidad de recuperación de pH intracelular por el NHE1 calculando extrusión de H⁺ ($J_{H^+}(\text{mmol/L/min}) = dpH/dt \times b$) luego de una carga ácida (pulso de amonio en medio sin HCO₃Na). El J_H control, 2.35±0.25 (n=5) aumentó a 3.70±0.39 (n=4, p<0.05) al inhibir p38 indicando mayor actividad del NHE1. Consistentemente, la fosforilación del NHE1, estimada por la fosforilación del sitio de unión a la proteína 14-3-3, fue mayor al inhibir p38 (en% del control no estirado: 119±2, estirado, n=4 vs. 148±9, estirado+SB202190, n=4, p<0.05). Los resultados sugieren que el aumento de la actividad de p38 por estiramiento disminuye las quinasas que fosforilan al NHE1, disminuyendo su actividad y limitando la respuesta inotrópica.

638. (657) PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FORMACIÓN Y VASCULARIZACIÓN DE LAS PLACAS DE ATEROMA

Lucero A.¹; Quesada I.²; Redondo A.^{1,2}; López M.¹; Cifuentes M.³; Pagano P.³; Castro C.^{1,2}

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo¹; Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza, Argentina²; VMI, University of Pittsburgh, Estados Unidos³.

El complejo de la NADPH oxidasa (Nox) cataliza la formación de especies reactivas del oxígeno en la pared vascular, que desempeñan un papel clave en la aterogénesis. Hasta la fecha, las terapias antioxidantes en general, han sido decepcionantemente negativas. Se estudió el efecto de la inactivación específica de Nox2, una de las subunidades del complejo Nox, en el desarrollo y vascularización de las placas de ateroma. Ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE-KO) fueron alimentados con dieta grasa (15,8% de materia grasa, 1,25% de colesterol), durante dos meses y luego tratados con un péptido inhibidor específico de Nox2 (Nox2DSTAT) o una quimera de la secuencia Nox2 (Scramble). Los péptidos (10mg/kg/día) fueron inyectados ip durante 15 días. Se midió la actividad de la Nox vascular, el desarrollo de placas de ateroma y la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) mediante PCR a tiempo real. Nox2DSTAT redujo la actividad Nox en el tejido aórtico (P<0,02) y las placas de ateroma se redujeron significativamente en aorta y en arterias carótidas (P<0.05 vs scramble). El aumento de la expresión de VEGF en tejido arterial debido a la dieta grasa fue atenuado significativamente por el péptido Nox2DSTAT (P<0,001). Nuestros resultados sugieren que el péptido inhibidor de Nox2 tiene un potente efecto sobre la vascularización y el desarrollo de las placas de ateroma. Teniendo en cuenta estos resultados, es atractivo especular que moléculas pequeñas, inhibidoras selectivas y específicas de diferentes Nox tendrían ejercer un efecto beneficioso en la patología vascular.

639. (733) TEJIDO ADIPOSO EPICARDICO: NUEVO ACTOR EN LA VULNERABILIDAD DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA

Mikszowicz V.¹ Morales C.² López G.¹; Póveda R.³; Schreiber L.³; Rubio M.³; Berg G.¹

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica-INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; División Cirugía Cardíaca, Hospital de Clínicas José De San Martín, Buenos Aires³.

El tejido adiposo visceral epicárdico (TAE), por su aposición con el corazón podría estar directamente relacionado al riesgo cardiometabólico. Las metaloproteasas (MMPs), involucradas en la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica, están implicadas en el remodelamiento del tejido adiposo, sin embargo, su comportamiento es desconocido en TAE. Objetivos: evaluar la composición y comportamiento del TAE y establecer asociaciones con MMPs vinculadas a la placa aterosclerótica. Sujetos y métodos: se obtuvo TAE y TA subcutáneo (TAS) de pacientes con enfermedad coronaria (EC, n=9) sometidos a cirugía de revascularización y pacientes derivados a cirugía cardiovascular no coronaria (control, n=9), en el momento de la cirugía. Se evaluó actividad de MMP-2 y -9 por zimografía, tamaño celular y densidad vascular. Resultados: EC presentó mayor actividad relativa (AR) de MMP-2 en TAE (AR: 1,97±0,59) que en TAS (AR: 1,38±0,27, p=0,05) y que en TAE de controles (AR: 1,43±0,26 p=0,04), sin diferencias en MMP-9; TAE y TAS de controles no mostraron diferencias en actividad de MMPs. El tamaño de los adipocitos es menor en TAE respecto a TAS (2,99±0,25 vs 5,81±1,33 x10³µm², p<0,05), sin embargo en EC el TAE presentó mayor densidad vascular que el TAS (6,20±1,91 vs 3,87±1,21 vasos/campo, p<0,05). Actividad de MMP-2 correlacionó con densidad vascular en TAE y TAS (r=0,77 y r= 0,71; p<0,05). Conclusiones: este trabajo preliminar muestra por primera vez el aumento en la actividad de MMP-2 en TAE de EC, asociada con la mayor densidad vascular. Este aumento podría vincularse al mayor riesgo cardiometabólico afectando directamente la vulnerabilidad de la placa.

640. (756) EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON CARVEDILOL EN RATAS CON DESNERVACIÓN SINOARÓTICA

Del Mauro J.¹; Santander Y.¹; Bertera F.¹; Carranza A.¹; Donato M.²; Gorzalczy S.¹; Taira C.¹; Höcht C.¹

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

El carvedilol ha demostrado reducir de manera aguda la variabilidad a corto plazo de la presión arterial en ratas con deservación sinoaróptica (DSA). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento a largo plazo con carvedilol sobre la presión arterial, la variabilidad a corto plazo de la presión arterial y el daño de órgano blanco en ventrículo izquierdo y aorta torácica en el modelo de la labilidad de presión. Se incluyeron 12 ratas Wistar macho sometidas a deservación sinoaróptica, las cuales fueron tratadas durante 8 semanas con una única administración diaria de carvedilol 30 mg/kg o agua de bebida. Al final del tratamiento se realizó la medición de la presión arterial y de su variabilidad a corto plazo y la evaluación ecocardiográfica. Se determinó el peso del ventrículo y de la aorta torácica y se realizaron preparados histológicos sobre ambos tejidos. El tratamiento oral con carvedilol redujo la presión arterial sistólica de ratas DSA en comparación con el control (126±5 vs. 142±11 mmHg, p<0,05). La variabilidad de la presión arterial fue significativamente inferior en ratas DSA tratadas con carvedilol en comparación con el control (Desvío estándar: 2,9±0,5 vs. 6,0±0,5; p<0,05). No se documentaron diferencias significativas en el peso del ventrículo izquierdo y de la aorta torácica entre las ratas DSA tratadas crónicamente con carvedilol respecto del grupo control. Tampoco se encontraron diferencias en los parámetros ecocardiográficos entre el grupo carvedilol y el control. Los estudios histológicos evidenciaron menor cantidad de tejido conectivo en ratas tratadas con carvedilol en comparación con el grupo control. En conclusión, el tratamiento crónico con carvedilol reduce de manera significativa la presión arterial y la variabilidad de la presión arterial a corto plazo en ratas con DSA, disminuyendo el grado de fibrosis del ventrículo izquierdo.

641. (812) EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DEL INTERCAMBIADOR NA/CA (NCX) ES LA CAUSA INICIAL Y DETERMINANTE DE LA DISMINUCIÓN DE LA CONTRACTILIDAD EN LA EVOLUCIÓN HACIA LA INSUFICIENCIA CARDÍACA (IC) DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)

Mundiña-Weilenmann C.; Rodríguez J.; Vélez Rueda O.; Di Carlo M.; Salas M.; Said M.; Vittone L.; Palomeque J.; Mattiazzi A.
Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.

Aunque se conoce que el Ca intracelular (Ca_i), está alterado en corazones de SHR, no hay consenso acerca de los mecanismos subcelulares que determinan su evolución a la IC. Se discuten 3 posibles candidatos: disminución de SERCA2a o bomba de Ca del retículo sarcoplasmático (RS), aumento del NCX, que normalmente extruye Ca del miocito y pérdida diastólica de Ca por los canales de Ca del RS (RyR2). Previamente observamos en SHR, una sobreexpresión temprana del NCX y una disminución tardía de la SERCA2a, sin cambios en los RyR2. Sin embargo, no pudimos establecer una relación causal entre estas alteraciones y la IC. El objetivo de este trabajo es conocer el mecanismo inicial y determinante de la disminución de la contractilidad en la evolución de las SHR a la IC. Se usaron ratas SHR y Wistar normotensas (W) de 3 a 15 meses (mo). Entre 12 y 18 mo, detectamos 2 poblaciones diferentes de SHR: una con signos de IC [edema pulmonar, disminución significativa en el acortamiento medio ventricular (SHRIC)] y otra sin signos de IC (SHRS). En miocitos aislados, el transitorio de Ca y el contenido de Ca del RS (Fura-2), medido por aplicación de cafeína (RScaf), fue menor en SHRIC que en SHRS. En SHRIC hubo una disminución significativa de la constante de tiempo de la caída del RScaf, índice de mayor actividad del NCX (2,16±0,26 seg SRHIC, n=9 vs. 3,16± 0,15 seg n=21, SHRS) asociado a una mayor expresión del NCX con respecto a W de la misma edad (202,2±27,5% SRHIC, n=3 vs. 114,4±4,9% SHRS, n=3, p<0,05). En un grupo de SHRIC que pudo ser seguido hasta los 21-24 mo, observamos signos significativamente más severos de IC que en SHRIC 12-18 mo, asociados a una disminución de la expresión de la SERCA2a (p<0,05). **Conclusiones:** 1. La mayor expresión/actividad del NCX, constituye la causa inicial de la disminución de contractilidad que conduce a la IC en SHR. 2. La menor expresión de la SERCA es un fenómeno tardío asociado a mayor caída de la contractilidad y signos severos de IC.

642. (817) ROL DEL DÉFICIT DE GALECTINA 3 SOBRE LA EVOLUCIÓN DEL INFARTO DE MIOCARDIO EXPERIMENTAL EN RATONES

Cassaglia P.¹; González G.¹; Fernandez M.²; Noli Truant S.²; Wilensky L.¹; Volberg V.¹; Malchiodi E.²; Morales C.¹; Gelpi R.¹
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Objetivo: Galectina 3 (Gal3) es una b-galactosidasa unida a lectina ampliamente expresada en el sistema inmune y otros tejidos. Sin embargo, no es conocido el rol de la Gal-3 en el remodelamiento (RV) y la función ventricular post-infarto de miocardio (IM). Hipotetizamos que el déficit de Gal-3 empeora el remodelamiento y la función ventricular luego del IM en ratones. **Métodos:** Ratones C57 y Gal3KO fueron sometidos a la ligadura permanente de la arteria coronaria o sham y divididos en 4 grupos: 1) C57 Sham; 2) Gal3KO Sham; 3) C57+IM; y 4) Gal3KO+IM. A los 7 días, se realizó ecocardiografía y luego se realizó la eutanasia. **Resultados:** (Media±ESM)

	C57 Sham (5)	Gal3 KO Sham (5)	C57+IM (8)	Gal3 KO+IM (8)
TIM (%)			40 ± 5	67 ± 5 *
PC/Pa (mg/g)	5.1 ± 0.2	4.7 ± 0.2	5.4 ± 0.3	6.8 ± 0.5 *†
PP/Pa (mg/g)	4.9 ± 1.2	6.1 ± 0.1	5.6 ± 0.7	11.4 ± 2.3 *
DDVI (mm)	3.7 ± 0.3	3.2 ± 0.3†	4.2 ± 0.1	4.9 ± 0.3 †
DSVI (mm)	2.4 ± 0.1	3.3 ± 0.3	3.3 ± 0.1	4.2 ± 0.4 *†
FAC (%)	37 ± 4	30 ± 3	21 ± 2 †	15 ± 3 †

TIM: tamaño de infarto; Pa, PC y PP: peso del animal, corazón y pulmón respectivamente; DSVI y DDVI: diámetro sistólico y diastólico del VI; FAC: fracción de acortamiento, † p<0.05 vs C57Sham; * p<0.05 vs C57IM.

Conclusión: El déficit de Gal-3 aumentó el TIM, la dilatación ventricular y la hipertrofia cardíaca. Si bien estos resultados son preliminares y algunos no alcanzan significación estadística sugieren que el déficit de Gal3 exacerba la disfunción sistólica y el RV adverso a los 7 días post-IM.

GASTROENTEROLOGÍA 3

643. (290) ROL DE LA AQP8 MITOCONDRIAL (AQP8MT) HEPÁTICA EN LA RESPUESTA ADAPTATIVA A LA ACIDOSIS

Molinas S.^{1,2}; Soria L.¹; Marrone J.¹; Trumper L.^{2,3}; Marinelli R.¹

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)- CONICET, Universidad Nacional de Rosario¹; Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario²; Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR)³.

Diversos trabajos proponen que ante una acidosis, el hígado cambiaría su mecanismo predominante de detoxificación del NH₄⁺: disminuyendo la síntesis de urea (proceso que consume HCO₃⁻) en mitocondrias de hepatocitos periportales y aumentando la producción de glutamina en el citosol de hepatocitos perivenosos. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que AQP8mt hepática facilita la entrada de amoníaco a la mitocondria y su metabolización a urea vía ureagénesis, por lo cual hipotetizamos que esta proteína disminuye su expresión en respuesta a la acidosis, contribuyendo a la disminución de la ureagénesis. El objetivo fue evaluar el efecto de la acidosis sobre la ureagénesis y la expresión de AQP8mt hepática en distintos modelos experimentales. A ratas Wistar macho adultas se les administró NH₄Cl 0,28M/sacarosa 2% (A7) o sacarosa 2% (C7) en el agua de bebida durante 7 días (n=6). Este modelo induce una acidosis metabólica (pH sanguíneo: C7=7,40±0,01; A7=7,33±0,01; p<0,05). Estudios de inmunoblotting en mitocondrias aisladas de hígado mostraron que la expresión de AQP8mt disminuyó en A7 (-50%, p<0,05), coincidiendo con niveles menores de urea en homogenados hepáticos (-35%; p<0,05). Por otra parte, cultivos primarios de hepatocitos de rata se incubaron en medio de cultivo a pH 7,4 o pH 7,0 durante 40h (n=6). Se utilizó medio de cultivo sin glutamina (fuente intramitocondrial de NH₄⁺) y con el agregado de 1 mM NH₄Cl con el fin de evaluar solo la formación de urea a partir de NH₄⁺. Los hepatocitos incubados a pH 7,0 presentaron una disminución de AQP8mt (-30%, p<0,05) evaluada por inmunoblotting, asociada a una menor ureagénesis (-35%, p<0,05) y mayor concentración de NH₄⁺ (+29%, p<0,05) en el medio de cultivo. La viabilidad celular no se encontró afectada. Estos resultados sugieren un rol de AQP8mt en la respuesta de los hepatocitos a la acidosis, contribuyendo a la disminución de la ureagénesis a partir de NH₄⁺ para mantener la homeostasis ácido-base.

644. (301) BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL PANCREÁTICA EN UN MODELO ANIMAL DE PANCREATITIS AGUDA

Vanasco V.^{1,2}; Marchini T.^{1,3}; Magnani N.^{1,3}; Alvarez S.^{1,2}; Vaccaro M.^{1,4}

Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular¹; Fisiocósmica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires³; Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires⁴.

En la pancreatitis aguda (PA) se produce una alteración en el flujo autofágico, favoreciendo el daño celular y la progresión de la enfermedad. Las mitocondrias aportan ATP y otras moléculas necesarias en el proceso autofágico, por lo que una bioenergética mitocondrial normal sería necesaria para el mantenimiento del flujo autofágico en respuesta a la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue analizar la bioenergética mitocondrial y su

relación con el proceso autofágico en páncreas en un modelo de PA. Se trataron ratas Sprague-Dawley hembras de 45 días, con ceruleína (CAE) 50mg/kg i.p. a intervalos de 1h. Los grupos tratados estudiados fueron: CAE1, animales inyectados con una única dosis y sacrificados luego de 1h; CAE3, animales inyectados con 3 dosis y sacrificados a las 3h; CAE24, animales inyectados con 6 dosis y sacrificados a las 24h. Simultáneamente con cada grupo CAE, se realizaron los grupos control siguiendo el mismo protocolo pero inyectados con solución fisiológica (vehículo). Los animales CAE3 y CAE24 muestran el consumo de O₂ mitocondrial en estado 3 disminuido, en un 30 y 40% respectivamente (valor control: 40 ± 5 ng-at O/min.mg prot.; p<0,05). Este resultado se ve reflejado en una disminución en el control respiratorio mitocondrial (valor control: 5,5). La producción de ATP se observó disminuida para todos los grupos CAE, siendo esta diferencia mayor en los animales del grupo CAE3 (valor control: 140 ± 18 nmoles ATP/min mg prot.; p<0,01). A partir de estos resultados se puede inferir que la función bioenergética mitocondrial se afecta tempranamente durante la PA, pudiendo favorecer la alteración del flujo autofágico y, en consecuencia, el daño celular característico de esta enfermedad.

645. (431) CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS EN "SÁNDWICH DE COLÁGENO" (CPHS): UN NUEVO MODELO "IN VITRO" PARA EL ESTUDIO DE ALTERACIONES DE TRANSPORTE CANALICULAR INDUCIDAS POR AGENTES COLESTÁSICOS

Miszczuk G.; Barosso I.; Zucchetti A.; Boaglio A.; Pellegrino J.; Sánchez Pozzi E.; Roma M.; Crocenzi F.
Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe.

Los modelos celulares polarizados para el estudio de las alteraciones de transportadores canaliculares en colestasis, como las duplas aisladas de hepatocitos, poseen bajo rendimiento celular y corta vida útil (6-7 hs). Los CPHS forman una red de pseudo-canalículos que conservan durante varias semanas su capacidad funcional y metabólica. Se evaluó su utilidad para estudiar alteraciones funcionales del transportador canalicular Mrp2 inducidas por los agentes colestásicos modelo estradiol 17β-D-glucuronido (E17G) y taurolitocolato (TLC). Hepatocitos aislados con collagenasa fueron sembrados en placas de 6 pocillos recubiertas con 100 μl de colágeno gelificado (3 mL/pocillo, 4,5 x10⁵ cél/mL) con medio DMEM adicionado con suero fetal bovino, antibióticos, dexametasona, insulina y glucosa. A las 24 hs, se agregó una segunda capa de colágeno, renovándose el medio. Al día 3, se expusieron los CPHS a E17G (25-200 μM) o TLC (1-2,5 μM) por 30 min sobre una platina termostatazada en un microscopio de epifluorescencia. Finalmente, se agregó cloro-metilfluoresceína-diacetato (2,5 μM), precursor del sustrato fluorescente de Mrp2 glutatión-metilfluoresceína, tomándose fotografías digitales cada min, por 10 min. Se seleccionaron 70-100 pseudocanalículos y se midió la intensidad promedio de fluorescencia, graficándose la misma vs. tiempo y ajustándose los datos por regresión lineal (pendiente = "velocidad inicial de transporte" - VIT). E17G y TLC disminuyeron VIT en forma concentración-dependiente (Control=22,6±1,2; E17G: 25 μM=19,2±2,3; 50 μM=15,1±1,3; 100 μM= 14,1±0,2*; 200 μM=12,3±1,1*; TLC: 1 μM=19,2±1,8; 1,5 μM=13,0±1*; 2 μM=11,5±0,3*; 2,5 μM=6,7±1,3*; *p<0,05 vs. control, n=3-10). Concluimos que los CPHS son un modelo factible de ser usado para estudiar las alteraciones funcionales secretoras en colestasis, en particular cuando se requieren altas cantidades de proteína (ej.: Western Blot), o suficiente vida útil para modular la expresión génica (ej.: "knockdown" con ARNi).

646. (677) EL USO DE CELULAS ESTROMALES MESENQUIMALES SOBREEXPRESANDO EL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMIL INSULINA-I COMO ESTRATEGIA TERAPEUTICA EN LA FIBROSIS HEPATICA AVANZADA

Fiore E.; Bayo Fina J.; García M.; Malvicini M.; Lloyd R.; Rizzo M.; Piccioni F.; Peixoto E.; Atorrasagasti C.; Alaniz L.; Aquino J.*; Mazzolini G.*
Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral.

La cirrosis o fibrosis hepática avanzada es la primera causa de trasplante hepático en la Argentina. Las células mesenquimales estromales (MSCs) migran selectivamente hacia sitios de lesión e injuria y podrían ser utilizadas como vehículo de genes terapéuticos. Se ha demostrado que el factor de crecimiento similar insulina-I (IGF-I) induce efectos antifibróticos; sin embargo, su aplicación terapéutica ha tenido hasta el momento una eficacia limitada. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto, y los mecanismos de acción involucrados, de la aplicación de MSCs modificadas genéticamente para sobreexpresar IGF-I en un modelo experimental de fibrosis hepática murino establecido mediante aplicación crónica de tioacetamida. MSCs de médula ósea de ratones Balb/C fueron infectadas con adenovirus para expresar exógenamente IGF-1 (AdIGF-1-MSCs) o GFP (*Green Fluorescent Protein*; AdGFP-MSCs). Se utilizaron 3 grupos experimentales: AdIGF-1-MSCs, AdGFP-MSCs y vehículo. Mediante inmunohistoquímica (IHQ) se pudo comprobar un reclutamiento de MSC en el hígado al día de su infusión. Por tinciones histológicas, análisis morfológico y aplicación del método de *Knodell* pudo observarse una reducción en el grado de fibrosis hepática en ratones tratados con AdGFP-MSCs, efecto que fue significativamente mayor en los tratados con AdIGF-1-MSCs. Los niveles de expresión de *Col1a* y *TGF-β*, genes asociados al proceso fibrogénico, fueron consistentes con ese patrón. Por otra parte se observó una inducción temprana en la expresión de IGF-1, HGF, TWEAK, y PCNA, genes relacionados con la regeneración hepática y/o la hepatoprotección. Nuestros resultados sugieren la existencia de mecanismos tempranos que estarían involucrados en el efecto antifibrótico de las MSCs. Dicho efecto se ve potenciado cuando las MSCs son modificadas genéticamente para expresar IGF-I.

647. (710) LA ENDOTELINA 3 PREVIENE LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTROGENOS EN LA RATA

Rodríguez M.*; Martinefski M.*; Tripodi V.*; Vatta M.*; Bianciotti L.^{1,2}

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹; Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Cátedra de Control de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴.

En estudios previos demostramos que las endotelinas 1 (ET-1) y 3 (ET-3) inducen coleresis en la rata en dosis que no modifican ni la presión venosa portal ni el flujo sanguíneo portal. Ambas ETs a través del receptor ETB incrementan el flujo biliar ácido biliar dependiente e independiente e estimulan la inserción en la membrana plasmática de los principales transportadores hepáticos involucrados en la génesis de la secreción biliar (*Clin Sci.*, 125: 521, 2013). En virtud a que estos estudios indican un potencial efecto beneficioso de las ETs en la colestasis hepatocelular, en el presente estudio evaluamos el papel de la ET-3 en un modelo animal de colestasis inducida por administración de estradiol-17β-D-Glucuronido (E17G). Se utilizaron ratas SD (250g) a las que se les infundió ET-3 1μg/kg/h y a los 30 min de la infusión de administró E17G o vehículo recogiendo muestras de bilis cada 5 min durante los primeros 30 min y luego cada 10 min por 60 min. Otro grupo de animales fue previamente tratado con BQ-788 (antagonista selectivo del receptor ETB) siguiendo luego el mismo protocolo experimental. En las muestras recogidas se determinaron distintos ácidos biliares por electroforesis capilar. Los animales tratados con E17G mostraron una marcada reducción del flujo biliar a los 10 min que no fue observada en los animales que se infundieron con ET-3. Los animales tratados con BQ788 + ET-3 no mostraron diferencias significativas en el flujo biliar respecto a los tratados con E17G solo, lo que indicaría que el efecto de ET-3 está mediado por activación del receptor ETB. Por otra parte la ET-3 también modificó el perfil de ácidos biliares excretados en relación a los animales colestáticos, observándose modificaciones principalmente en la excreción de ácido litocólico y ursodeoxicólico. Estos resultados indican que la ET-3 a través del receptor ETB previene la colestasis inducida por E17G en la rata.

648. (798) AVANCES EN EL ESTUDIO DE HEMOCROMATOSIS: IMPLICANCIA DE LA EVALUACIÓN DE LA COENZIMA Q10

Martinefski M.¹; Samassa P.¹; Yamasato F.²; González Ballerga E.²; Sorda J.²; Daruich J.²; Tripodi V.³
Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Sección Hepatología, División Gastroenterología, Hospital de Clínicas José De San Martín, Universidad de Buenos Aires²; Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

El hierro es esencial para una amplia variedad de funciones biológicas a nivel celular y sistémico, como transporte de oxígeno y actividad de varias enzimas. Por otro lado, como metal de transiciones potencialmente tóxico para células y tejidos. En la hemocromatosis hereditaria (HH) se produce una acumulación tisular excesiva de hierro, el cual cataliza la formación de radicales de oxígeno promoviendo la lesión celular en un ambiente de franco estrés oxidativo, generando a nivel hepático fibrosis y, eventualmente, cirrosis y hepatocarcinoma. Las flebotomías periódicas es el tratamiento de la HH. La Coenzima Q10 (CoQ10), compuesto esencial en el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, es considerado el único antioxidante liposoluble sintetizado *de novo* en células animales. Recientemente, se ha planteado la hipótesis de que la depleción de CoQ10 sería un marcador de daño oxidativo, así como un factor que contribuye al agravamiento de ciertas enfermedades. En este estudio se incluyeron 35 pacientes con criterios diagnósticos clínicos, bioquímicos e histológicos de HH sin tratamiento y 20 sujetos normales, a los que se estudió los niveles plasmáticos de CoQ10 y el metabolismo del hierro. La determinación de CoQ10 se realizó por microHPLC-UV. Los niveles de CoQ10 en pacientes con HH, independientemente del estadio histológico, resultaron significativamente inferiores respecto de los controles (0.28 ± 0.02 vs 0.70 ± 0.07 $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$, $p < 0.001$). Los resultados obtenidos sugieren que la CoQ10 sería un marcador eficiente de estrés oxidativo y justifica el estudio de su posible rol terapéutico asociado a la flebotomía en HH.

GENÉTICA 3

649. (171) DESARROLLO DE ANTICUERPO INHIBIDOR CONTRA EL FVIII ASOCIADO A MUTACIONES NONSENSE EN PACIENTES CON HEMOFILIA A (HA) SEVERA (S)

Marchione V.; Radic C.; Abelleyro M.; Larripa I.; De Brasi C.; Rossetti L.
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-Conicet, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

HA es uno de los desórdenes de coagulación más común, con una incidencia de 1 cada 5000 varones, debida a mutaciones en el gen del factor FVIII (*F8*) de coagulación. La mayoría de los pacientes son tratados eficientemente con concentrados de FVIII, sin embargo, alrededor del 20–30% de los que tienen HAS desarrollan anticuerpos neutralizantes contra FVIII (inhibidores), lo que hace que la terapia sea inefectiva. El riesgo de desarrollo de inhibidor está influenciado por factores ambientales y genéticos, siendo el tipo de mutación causal el más importante y las grandes deleciones, inversiones y las mutaciones *nonsense*, las de mayor riesgo. En estas últimas el riesgo en la cadena liviana (CL: residuos 1649_2332) es mayor que en la cadena pesada (CP: residuos 1_1648). El objetivo del presente trabajo es analizar la hipótesis que un segmento L2 (residuos 2125_2332) dentro de la CL, podría ser expresado a partir del gen *F8B* (cuyo primer exón ubicado en el intrón 22 de *F8* se une en marco con los exones 23-26 de *F8*) y por eso, mutaciones *nonsense* en L2 podrían suprimir completamente la expresión de la región C-terminal de FVIII, mientras que mutaciones en L1 (residuos 1649_2124) permitirían su expresión a partir del gen *F8B* intacto proveyendo epítopes para inducir tolerancia al FVIII exógeno. Se analizaron las mutaciones *nonsense* de la base de

datos de HA, HADB (HAMSTeRS) ($n=436$) observándose un riesgo relativo OR (CI95) de 4.3 (2.7-6.7) CL/CP ($P < 0.0001$) asociado al desarrollo de inhibidor, el mismo análisis en nuestra serie ($n=29$) no mostró diferencias significativas OR (CI95) de 1.886 (0.4–8.6) CL/CP ($P=0,4107$); sin embargo se observó un riesgo de inhibidor heterogéneo al analizar las regiones L1 y L2 que constituyen la CL en nuestra serie ($n=13$) OR (CI95) de 12.00 (0.8–181.1) L2/L1 ($P=0.053$), hipótesis *F8B*. La evaluación L2/L1 en la HADB ($n=217$) mostró un OR neto de hipótesis nula, de 0.9819 (0.6–1.7) L2/L1 ($P=0,9478$) para rechazar la hipótesis *F8B*.

650. (238) MUJERES PORTADORAS SINTOMÁTICAS DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y CLÍNICA

Luce L.¹; Radic P.²; Ferreira V.³; De Brassi C.²; Szijan I.¹; Giliberto F.¹
Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Genética Molecular de Hemofilia, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina²; Laboratorio de Genética Molecular Diagnostica (GENOS S.A.)³.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad ligada al cromosoma X, causada por mutaciones en el gen de la distrofina. Se caracteriza por degeneración muscular progresiva y muerte temprana. La DMD afecta a varones, siendo las mujeres portadoras asintomáticas en la mayoría de los casos. Se reportaron mujeres sintomáticas con translocación entre el cromosoma X y un autosoma o con una inactivación sesgada del X normal. Se estudiaron 6 mujeres portadoras sintomáticas y dos asintomáticas con el fin de identificar la alteración molecular en el gen de distrofina y evaluar el sesgo de inactivación de los cromosomas X. Se realizaron estudios de segregación de microsatélites STRs-(CA)_n, MLPA y detección del patrón de inactivación del cromosoma X. Las pacientes mostraban una debilidad muscular suave pero progresiva y los niveles de creatin kinasa (CK) aumentados. La proteína distrofina estaba presente en niveles más bajos que los normales o ausente en muchas fibras musculares. La segregación de STRs reveló un patrón hemicigota en tres pacientes sugiriendo la presencia de una deleción en el gen, lo cual fue confirmado por MLPA, este método mostró además una duplicación genética en otra paciente. El ensayo de inactivación del cromosoma X reveló un patrón de inactivación sesgado en las mujeres sintomáticas, mostrando un cromosoma X normal inactivo en un 90% aproximadamente de las células. Por otro lado se observó un patrón de inactivación al azar, con un porcentaje similar de inactivación para ambos cromosomas en las mujeres sin sintomatología. Nuestros resultados apoyan la hipótesis del patrón sesgado de inactivación del cromosoma X en el caso de mujeres con distrofinopatía.

651. (330) ESTUDIO MOLECULAR DE HIPOACUSIAS EN LA ARGENTINA. ABORDAJE MULTIGENICO

Buonfiglio P.¹; Lotersztejn V.²; Paoli B.³; Elgoyhen A.¹; Dalamon V.¹
Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)-CONICET¹; Servicio de Genética, Hospital De Clínicas "José de San Martín"²; Servicio de Otorrinolaringología Infantil, Hospital De Clínicas "José de San Martín"³.

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, EYA1 y EYA4. Se analizaron 517 muestras de ADN de pacientes no relacionados (111 familiares y 406 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*, *EYA1* y *EYA4*. Se detectaron variaciones de secuencia en 185 de los 517 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. La mayoría de las mutaciones fueron no truncantes y se evaluó que los pacientes con dos mutaciones truncantes mostraron peor severidad de la hipoacusia. Cuatro de las mutaciones identificadas en *GJB2* resultaron nuevas: c.233 insG, p.Ala78Ser, p.Val190Asp y p.Cys211Tyr. Se identificaron también dos variaciones de secuencia en el gen *EYA1* en dos casos de hipoacusia sindrómica. 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.

652. (361) ALELO DOBLE MUTADO [IVS2+5G>A; P.V281L] EN PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA NO CLÁSICA POR DEFICIENCIA DE 21 HIDROXILASA. IMPLICANCIAS EN EL CONSEJO GENÉTICO

Marino R.¹; Ramírez P.¹; Pasqualini N.¹; Pérez Garrido N.¹; Rocco C.¹; Escobar M.²; Rivarola M.¹; Belgorosky A.¹
Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"; Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires².

Introducción: p.V281L es la mutación más frecuente del gen *CYP21A2* en pacientes con la forma no clásica (NC) de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa (21OHD). En un estudio previo (Marino y col. *Clin Endocrinol* 2011), mediante secuenciación del gen *CYP21A2* en tres pacientes portadores de p.V281L detectados mediante el screening de las 11 mutaciones más frecuentes y cuyo fenotipo era más severo que el esperado por el genotipo (forma clásica), se detectó una alteración intrónica en el mismo alelo portador de p.V281L [IVS2+5G>A; p.V281L] en los tres casos. Objetivo: Determinar la frecuencia de la alteración IVS2+5G>A en alelos portadores de p.V281L [IVS2+5G>A; p.V281L] en 64 pacientes con la forma NC 21OHD con genotipo homocigota para p.V281L detectado por el screening de las 11 mutaciones más frecuentes. Métodos: Detección de la mutación IVS2+5G>A mediante secuenciación automática. Resultados: Se detectó la presencia de un alelo doble mutado [IVS2+5G>A; p.V281L] (1/128 alelos frecuencia 0.78%). Además un haplotipo formado por 17 marcadores bialélicos del intrón 2 que comparten los tres pacientes [IVS2+5G>A; p.V281L] de nuestro previo estudio también fue detectado en este nuevo alelo doble mutado. La mutación IVS2+5G>A se encuentra asociada al mismo haplotipo (HH1) en los 4 casos, con una frecuencia significativamente más alta que la esperada con respecto a la frecuencia observada en un grupo control de 6,86% (7/102 alelos control) ($p=0.0001$ Test exacto de Fisher). Por lo tanto, se puede especular que las dos mutaciones aparecieron juntas en un mismo haplotipo ancestral, sugiriendo un efecto fundador. Conclusiones: En nuestra población el análisis para detectar una segunda mutación en alelos p.V281L tiene implicancias en los pacientes con forma NC 21OHD detectados mediante métodos basados en PCR, ya que una genotipificación incompleta podría erróneamente identificar a estos individuos como portadores de un alelo menos severamente afectado llevando a un mal asesoramiento genético. Además este alelo doble mutado debería ser analizado en otras poblaciones.

653. (429) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA CON EL GEN CYP21A2 DUPLICADO

Fernández C.¹; Delea M.¹; Buzzalino N.¹; Pasqualini T.³; Alba L.¹; Castro T.¹; Dain L.^{1,2}
Centro Nacional de Genética Médica¹; Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET²; Servicio de Pediatría Hospital Italiano de Buenos Aires³.

Alrededor del 95% de los casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita se deben a la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa. La enzima es codificada por el gen *CYP21A2*, el cual se ubica en el módulo *RCCX*, compuesto por los genes *STK19*, *C4*, *CYP21* y *TNX*. La mayoría de los cromosomas poseen el módulo duplicado en tándem con 2 genes *C4*, un gen *CYP21A2* y un pseudogen *CYP21A1P*, que comparten 98% de identidad de secuencia. En un trabajo previo se buscaron las mutaciones más frecuentes del gen y se caracterizó la región *RCCX* en 238 pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa. Se identificaron 16 haplotipos, entre ellos uno poco frecuente, con una duplicación del gen. En este trabajo presentamos la genotipificación de los 7 pacientes con ese haplotipo. Luego de la búsqueda de las mutaciones más frecuentes, se habían supuesto los siguientes genotipos en los pacientes: 1 y 2 (hermanos, sólo 1 con sintomatología) p.V281L/p.Q318X; 3: c.290-13A>G (I2)/p.Q318X; 4: p.I172N/I2-p.Q318X; 5: I2-p.Q318X/ND; 6 y 7 (hermanos): p.V281L/p.V281L. La identificación de la duplicación del gen, permitió determinar que los pacientes 3, 4 y 5 poseían las mutaciones I2 y p.Q318X en *cis*, cada una en una copia del *CYP21A2* del cromosoma con la duplicación del gen, y que 6 y 7 poseían la p.V281L en todas las copias del gen. Mediante secuenciación de las 3 copias del *CYP21A2*, se determinó que el paciente 3 poseía la mutación p.H466fs. En los pacientes 1 y 2, una de las copias contenía la secuencia salvaje, lo que permitió re-definir el genotipo en estos pacientes. Los cromosomas con la duplicación del gen complican el diagnóstico molecular, dado que por PCR se obtiene un falso positivo en portadores de la duplicación del gen heterocigota. La identificación errónea de un alelo salvaje como patológico, es crítico para el diagnóstico molecular y el consejo genético. Para evitar estos errores, es recomendable analizar la estructura de la región *RCCX*.

654. (628) ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN DE TPO EN DEFECTOS DE ORGANIFICACION DEL YODO

Belforte F.^{1,2}; Osorio Larroche C.^{1,2}; Olcese C.²; Citterio C.^{1,2}; Targovnik H.^{1,2}; Rivolta C.^{1,2}
Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹; Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Los defectos de organificación de yodo representan el 10% de los casos de hipotiroidismo congénito (HC), el cual posee una prevalencia de 1/2200 y un modo de herencia autosómico recesivo. Con el objeto de extender la búsqueda de nuevas mutaciones en el gen de tiroperoxidasa (TPO) se estudió una población de 40 pacientes con diagnóstico de HC, bocio y test de descarga de perclorato positivo. Se amplificaron por PCR el promotor y los 17 exones de TPO y sus regiones intrónicas flanqueantes. Los productos fueron analizados por SSCP y aquellos con migración diferencial fueron secuenciados. Para el estudio de deleciones-duplicaciones se realizó MLPA y Long-PCR. Mediante estudios "in silico" se evaluó la estructura 2^{na} y 3^{ra} de las proteínas mutadas y se exploró su grado de conservación evolutiva en distintas especies. Las nuevas variantes se evaluaron poblacionalmente por SSCP y RFLP. Se encontró un paciente doble heterocigota para la mutación conocida 1187insGGCC; p.R396fsX472(exón 8) y para una nueva mutación: c.1772 C>T, p.T561M(exón 10). Otro caso presentó una nueva mutación heterocigota c.2332G>A, p.V748M(exón13) en *cis* con una deleción de exón 12 completo en el alelo paterno y variante rara de secuencia c.2006 A>G p.M706V(Exón 12) en el materno. Un tercer paciente evidenció la mutación c.2332G>A, p.V748M(exón13) en *cis* con la mutación descrita c.2505_2511insC, p.C808LfsX879(exón 14), evidenciando por MLPA una duplicación de exón 9 completo en el alelo alternativo. Se encontró también un paciente con una única mutación heterocigota descrita c.2395 G>A, p.E799K. Adicionalmente

se hallaron dos polimorfismos descriptos: c.2263 A>c, p.T755P; c.2376 C>T, p.R762R y uno nuevo g.IVS 12 +16 c>t. Las técnicas de biología molecular empleadas constituyen una herramienta útil para la comprensión de la fisiopatología molecular del hipotiroidismo neonatal. Por otra parte contribuirán al diagnóstico temprano y al adecuado asesoramiento genético a las familias afectadas.

655. (724) COPROPORFIRIA HEREDITARIA: DOS NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA COPROPORFIRINOGENO OXIDASA

Medina N.^{1,3}; Colombo F.^{1,2}; Melito V.^{1,2}; Battle A.¹; Rossetti M.^{1,2}; Parera V.¹

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Hospital de Clínicas José de San Martín¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Servicio de Neurología, Hospital General de Agudos "Ramos Mejía", Buenos Aires³.

La Coproporfirina Hereditaria (CPH) es una enfermedad metabólica producida por una deficiencia en la Coproporfirinógeno III oxidasa (CPO), sexta enzima del camino metabólico del hemo. La CPH es una porfiria mixta, los pacientes pueden presentar síntomas abdominales y/o cutáneos. Bioquímicamente, la actividad disminuida de la CPO produce la acumulación hepática de coproporfirina y su excreción aumentada por orina y heces. Durante los ataques, el porfobilinógeno (PBG) y el ácido delta aminolevulínico (ALA) urinarios están aumentados. La CPH es muy poco común, incluso entre las porfirias, en Argentina hemos diagnosticado sólo 17 familias. El gen que codifica para la CPO humana (CPOX) contiene 7 exones y abarca 14kb del DNA genómico. Hasta hoy, se han caracterizado 64 mutaciones en CPOX: 43 sustituciones nucleotídicas, 4 mutaciones de splicing, 6 pequeñas deleciones, 7 pequeñas inserciones, 1 indel y 3 grandes deleciones. Se estudiaron bioquímicamente y genéticamente 8 miembros pertenecientes a dos familias no relacionadas con CPH. Se cuantificaron las porfirinas totales en orina y heces, con su patrón de excreción, ALA y PBG en orina y las porfirinas plasmáticas. El DNA genómico se aisló de sangre periférica utilizando el kit "illustra blood genomicPrep" (GE). Los 7 exones del gen CPOX incluyendo las regiones intrónicas adyacentes, se amplificaron en 5 fragmentos, con los primers correspondientes y se secuenciaron automáticamente (Macrogen). Se detectaron 2 mutaciones nuevas: una deleción de una base en el exón 3 (c.754-755 delC) y un rearrreglo en el exón 1 que origina una duplicación y una posterior deleción. De los 8 sujetos estudiados, 4 resultaron tener CPH sintomática en tanto que los 4 restantes no heredaron la mutación familiar. Éste es el segundo estudio genético en pacientes con CPH en quienes se han detectado 2 mutaciones aún no descritas, que sumadas a las 4 anteriores (SAIC, 2003) confirma la heterogeneidad genética de esta porfiria.

656. (839) HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR. ESTUDIO DE LOS EXONES 2, 4, 6, 7 Y 9 DEL GEN LDLR Y CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE NUEVA C.170A>C

Bañares V.¹; Pastene E.¹; Pucci M.³; Tavella M.³; Schreier L.²

Centro Nacional de Genética Médica¹; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; PROPIA³.

La Hipercolesterolemia familiar (HF) heterocigota se caracteriza por elevados niveles de colesterol de LDL en plasma y riesgo alto de enfermedad cardiovascular temprana. Genéticamente se origina por mutaciones en el receptor de las LDL (LDLR) principalmente, a la fecha no se conocen las variaciones genéticas presentes en nuestra población. Objetivo, caracterizar los 5 exones del LDLR con mayor cantidad de mutaciones reportadas en poblaciones afines en un grupo de pacientes argentinos con alta sospecha clínica de HF. Muestra: pacientes adultos de ambos géneros con HF score ≥ 6 (Programa Internacional OMS, MEDPED Holanda), 12 (11 y 1 familiar). Métodos: PCR, secuenciación

directa de los exones 2, 4, 7 y zonas intrónicas flanqueantes. Las variantes observadas se chequearon por lo menos en duplicado. Secuencia de referencia, *genomic reference sequence*, NCBI. En el análisis bioinformático se utilizaron los programas Polyphen-2, SIFT y VMD. Resultados: Media LDL 316,5 \pm 19,6 mg/dl con grados variables de adhesión a diferentes tratamientos. Se identificaron 4 variantes genéticas: c.1060+7T>C, alelo C en homocigosis en las 12 muestras; c.1060+10G>C, 2(16.7%) CC, 9(75.0%) CG y 1(8.3%) GG, ambos snp en el intrón 7; y en el exón 2, c.81C>T, p.cys27cys descripto en las poblaciones china y marroquí, en 1 paciente y su familiar y C.170A>C, p.Arg57Ala, no descripta, localizada en el repeat 2 de la proteína, cambia un aa polar por uno hidrofóbico. El alineamiento de secuencia múltiple mostró que es una aa altamente conservado y estructuralmente está en la zona activa. Se predice un efecto dañino, score 1, sensitivity 0,0 especificity 1,00. No se observaron variantes en los exones 4, 6 y 9. Conclusiones, los dos snp comunes mostraron una distribución acorde con otras poblaciones caucásicas. Describimos dos variantes raras, una polimórfica, y una nueva, que tendría un efecto causal respecto de la HF.

NEFROLOGÍA 3

657. (194) VARIACIONES EN EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA RENAL EN UN MODELO DE PROGRAMACION FETAL POR DEFICIT MODERADO DE ZINC

Gobetto M.²; Jurio L.²; Mendes Garrido F.²; Radionovas V.²; Cardelli Alcade D.²; Dasso M.²; Veiras L.²; Costa M.²; Tomat A.²; Arranz C.²

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química y Metalurgia del Fármaco (IQUIMEFA) CONICET².

Hemos demostrado que el déficit de zinc en la gestación y el crecimiento provoca en ratas bajo peso al nacer y alteraciones de la función y morfología cardiovascular y renal. Estudiamos el impacto de este modelo de programación fetal en el sistema renina-angiotensina renal (SRA-R), y si existen diferencias entre sexos. Ratas Wistar preñadas recibieron dieta baja en zinc (B: 8 ppm) o dieta control (C: 30ppm) hasta el destete de sus crías. Un grupo de crías macho (m) y hembra (h) de madres B continuaron con dieta B hasta la adultez (81 días de vida) (Bbm y Bbh). Otro grupo continuó con la dieta C (Bcm y Bch). Las crías de madres C continuaron con dieta C (Ccm y Cch). Se midió la presión arterial sistólica (PAS, método *Tail-cuff*) cada 15 días desde los 35 días de vida hasta la adultez. Luego se sacrificaron, y en tejido renal se determinaron: densidad y distribución de receptores AT1 y angiotensina II (AII) mediante inmunohistoquímica, y expresión de ARNm de enzima convertidora de angiotensina (ECA) por RT-PCR. Los resultados se analizaron por ANOVA de dos vías, test posthoc de Bonferroni (n=6 por grupo). Los grupos Bbm y Bcm presentaron valores mayores de PAS que sus controles desde los 50 días de vida (p<0.05 vs Ccm), no hallando diferencias entre hembras. Los grupos Bb y Bc, m y h, tuvieron mayor marcación de AT1 en corteza y médula (p<0.05 vs Ccm/Cch). Bbm y Bcm tuvieron mayor AII (p<0.05 vs Ccm) no encontrando diferencias en h. La expresión de ARNm de ECA renal fue mayor en Bbm (p<0.05) respecto a Ccm, sin observarse diferencias entre las h. Estos resultados sugieren que el inadecuado aporte de zinc durante las etapas tempranas de la vida, así como en la adultez, activaría los componentes del SRA-R, generando un aumento de la PAS, y contribuyendo al desarrollo de alteraciones renales previamente descriptas en ratas macho adultas. Las hembras parecerían ser menos sensibles a esta injuria nutricional.

658. (537) EXPRESIÓN RENAL DEL TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS 5 EN RATAS TRATADAS CON CISPLATINO. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON N-ACETILCISTEÍNA

Bulacio R.; Torres A.

Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, CONICET.

El cisplatino (Cpt) es un fármaco antineoplásico que se utiliza para tratar diferentes tipos de tumores sólidos. A pesar de su efectividad, sus aplicaciones clínicas se ven limitadas por ser nefrotóxico. La N-acetilcisteína (N) es un compuesto antioxidante que disminuye la nefrotoxicidad causada por Cpt. El transportador de aniones orgánicos 5 (Oat5) se localiza en las membranas apicales de las células del túbulo proximal renal. Hemos descrito modificaciones en la expresión renal de Oat5 en presencia de diferentes patologías. En este trabajo se evaluó el efecto del pre-tratamiento con N sobre la función renal, la expresión renal y la excreción urinaria de Oat5 (Oat5u) en ratas Wistar macho adultas tratadas con Cpt. Grupos experimentales: Control (C, n=16), ratas tratadas con Cpt 5 mg/kg, i.p., 4 días antes (Cpt, n=6), tratadas con N 500 mg/kg/día, i.p. por 4 días (N, n=4), tratadas con Cpt y N (Cpt+N, n=6). Se determinó nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina en plasma (Crp) y actividad de fosfatasa alcalina (FAO) en orina, por espectrofotometría; Oat5u y su expresión en membranas apicales renales (Oat5m) por Immunoblotting. Resultados: BUN(mg/dL):C=12,9±0,6, Cpt=137,3±11,1^{a,c,d}, N=14,6±2,5^b, Cpt+N=28,7±4,6^{a,b}; Crp(mg/L):C=6,3±0,2, Cpt=50,3±3,3^{a,c,d}, N=6,9±0,1^b, Cpt+N=10,5±0,9^b; FAo(Ul/gCr):C=148±11, Cpt=263±21^{a,c,d}, N=139±16^b, Cpt+N=102±19^b; Oat5o(%):C=100±5, Cpt=318±12^{a,c,d}, N=12±1^{a,b,d}, Cpt+N=44±4^{a,b,c}; Oat5m(%):C=100±3, Cpt=50±3^{a,c}, N=98±4^{b,d}, Cpt+N=41±4^{a,c}. ANOVA plus Newman-Keuls, P<0,05. (a) vs C; (b) vs Cpt; (c) vs N; (d) vs Cpt+N. El pre-tratamiento con N previno el daño renal y el aumento de Oat5u inducido por Cpt, pero no modificó Oat5m. La disminución de Oat5u en las ratas Cpt+N con respecto al grupo Cpt no se debería a una disminución del número de moléculas de Oat5 sobre la membrana apical, lo cual disminuiría la cantidad excretada hacia orina, sino a probables alteraciones en su síntesis proteica y/o en su tráfico exosomal hacia orina.

659. (764) ESTUDIO LONGITUDINAL DE FILTRADO GLOMERULAR Y MARCADORES VASCULARES EN ESTADIOS PRECOZES DE LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSOMICA DOMINANTE (ADPKD)

Martínez M¹; Oddo E.¹; Forcada P.²; Palmitano J.³; Arrizurieta E.¹; Martín R.^{1,2}; Azurmendi P.¹; Fraga A.¹

Laboratorio de Riñón Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Universidad de Buenos Aires, CONICET¹; Hospital Universitario Austral²; Gastroenterología, Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Universidad de Buenos Aires³.

La microalbuminuria es considerada como índice precoz de progresión de enfermedad renal; sin embargo, existe poca información sobre las alteraciones renales y el remodelamiento vascular en estadios tempranos de ADPKD con función renal conservada. En trabajos previos, definimos un valor de corte para la excreción de albúmina urinaria (UACR) por encima del límite superior de los controles (6.8 mg albúmina/g de creatinina) y se encontró asociación entre dichos niveles con diferencias en el volumen renal total (VRT), espesor de la íntima media carotídea (IMT) - marcador de remodelamiento vascular. Para evaluar la progresión temporal de estos parámetros realizamos un seguimiento longitudinal de 6 años en 15 pacientes ADPKD normotensos (28.1 ± 1.3 años), clasificados según el valor de corte en normo (nUACR) e hiper (hUACR) albuminúricos. Se determinó UACR, VRT, IMT y filtrado glomerular estimado por MDRD (FGe). El FGe cayó 14 ± 8 ml/min/1.73m², siendo más pronunciada en los hUACR que en los nUACR (21 ± 12 vs. 2 ± 3, p<0.02). Los VRT iniciales y finales fueron mayores en los hUACR vs nUACR (504 ± 49 y 1511 ± 228 vs 318 ± 30 y 830 ± 159 ml, p<0.05, respectivamente), al igual que su crecimiento anual (165 ± 37 vs 85 ± 34). La UACR no modificó sus valores durante el período de seguimiento (22 ± 9 vs 22 ± 15). IMT tampoco mostró cambios en el grupo total (0.53 ± 0.03 basal vs 0.55 ± 0.02 mm) ni analizado por UACR. Los resultados muestran una caída del FGe acompañado con un aumento del VRT, y estos cambios se asocian a una hUACR, persistente, en ausencia de progresión del remodelamiento vascular.

660. (788) SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES VASCULARES DURANTE LA

PROGRESIÓN A LA CRONICIDAD EN UN MODELO EN RATA

Chiquilito F.¹; Melendi S.¹; Seyahian A.¹; Araoz A.¹; Lago N.²; Ochoa F.¹; Zotta E.¹

Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

En la Argentina, el SUH constituye la causa más frecuente de falla renal aguda en niños. El 30% puede presentar secuelas renales con evolución a la cronicidad. Previamente describimos en un modelo subletal de SUH en ratas el desarrollo de una glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) con una transformación epitelio mesenquimática (EMT) de las células tubulares. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar las alteraciones vasculares durante la evolución a la cronicidad. Se utilizaron tres grupos de ratas Sprague-Dawley de 150-200 g. Grupo 1 fue inyectado por vía intraperitoneal con 0,25 mL de sobrenadante de cultivo bacteriano de *E-coli* recombinante que expresa Stx2 (1,66 µgStx2/Kg, dosis subletal); grupo 2, se agregó enalapril en el agua de bebida (50 mg/Kd/d) y el grupo 3 (control) recibió 0,25 mL de solución salina. Se realizaron estudios funcionales, histológicos, e inmunohistoquímicos (IHQ) a 1 semana y 3 meses. En orina se detectaron valores alterados de proteinuria que mejoraron con la administración de enalapril. Por IHQ se detectó a la semana angiotensina II a nivel citoplasmático tubular y en el polo vascular glomerular a diferencia del control que marco en región basolateral tubular y endotelio. A los 3 meses la marcación se caracterizó por señal periglomerular que se modificó luego del tratamiento con enalapril. El estudio de los vasos mostro alteración en la relación luz/pared que disminuyó en el grupo experimental en forma tiempo dependiente. El enalapril mejoró la relación, sin llegar a valores controles, pero destacándose la presencia de hialinosis, mientras que las tratadas solo con toxina mostraron principalmente engrosamiento de la media. Teniendo en cuenta nuestros resultado previos, la respuesta renal en el tiempo a los efectos de sStx2 se relaciona tanto con factores no hemodinámicos como una EMT, aumento de TGF-β1, desarrollo de fibrosis intersticial y GEFS, como a efectos hemodinámicos mediados por angiotensina II.

FISIOLOGÍA CELULAR 3

661. (129) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE CANALES TRPC EN LA ARTERIA UMBILICAL HUMANA MANTENIDA A LARGO PLAZO EN CONDICIONES NO PROLIFERATIVAS

Roldán Palomo A.¹; Lafourcade M.¹; Moncada M.¹; Valdez J.¹; Flores L.²; Milesi V.¹

Grupo de Investigación en Fisiología Vascular (GINFIV), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata¹; Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata².

Canales catiónicos del tipo TRPC han sido descritos como sensores de estiramiento en el músculo liso vascular y su expresión puede ser modulada por diferentes tipos de estímulos crónicos. Hipotetizamos que la arteria umbilical humana (AUH) mantenida a largo plazo en condiciones no proliferativas, podría cambiar el patrón de expresión de TRPC y su función como sensor de estiramiento. Para ello se evaluó la expresión a nivel de mRNA de las subunidades de canales TRPC, mediante qPCR en anillos vasculares control (evaluados al momento de la extracción de la AUH) y en anillos incubados en medios de cultivo comerciales sin suero fetal bovino: DMEM glucosa fisiológica (5,5 mM, grupo GF) y DMEM alta glucosa (25 mM, grupo AG); ambos mantenidos por 144 hs a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%. El rol funcional se evaluó mediante un protocolo que permite medir el desarrollo de fuerza isométrico en respuesta a estímulos mecánicos. Diferentes anillos reciben un estímulo de estiramiento inicial de 1; 2; 3 o 3,5 gramos en ausencia de Ca²⁺, posteriormente se agrega 2,5 mM Ca²⁺ al medio extracelular y se mide el desarrollo de fuerza. Observamos que en la AUH sin incubar, existe una correlación

positiva y lineal entre el grado de estiramiento del anillo (x) y la magnitud de la fuerza desarrollada (y) ($y=115x+185$; $R^2=0,91$; $n=42$) indicativo de que existe un flujo de Ca^{2+} dependiente del grado de estiramiento de la pared vascular. Esta relación lineal desaparece en presencia de $GdCl_3$ inhibidor de canales TRPC ($n=10$) y en el grupo GF ($n=5$) y AG ($n=10$). La evaluación a nivel de mRNA muestra que los subtipos TRPC1, 3 y 4 se mantienen constantes mientras que el TRPC6 disminuye significativamente en los grupos incubados ($n=3$). Concluimos que en la AUH, los canales TRPC6 estarían involucrados en la respuesta al estiramiento de la pared vascular y las condiciones de incubación a largo plazo alteran su expresión en ambos medios de cultivo.

662. (229) ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DEL TRPV4 EN CÉLULAS RENALES EXPUESTAS A UN FLUJO HIPOTÓNICO: ESTUDIO COMPARATIVO EN CÉLULAS QUE EXPRESAN O NO AQP2

Pizzoni A.; Di Giusto G.; Fernández J.; Rivarola V.; Capurro C.; Ford P.

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los túbulos colectores del riñón están expuestos a cambios en la osmolaridad y el flujo tubular. Previamente, describimos que en ausencia de flujo luminal, la expresión de AQP2 facilita la entrada de calcio, necesaria para la activación de los mecanismos rápidos de regulación del volumen en respuesta a hipotonía (RVD) mediante una interacción funcional con el canal de calcio TRPV4. Ante un flujo luminal hipotónico observamos un aumento del RVD, independientemente de la expresión de AQP2, siendo este incremento mayor en las células que no expresan AQP2. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el aumento del RVD inducido por el flujo implicaba la activación de canales de K^+ y si esta respuesta era mediada por el TRPV4. Medimos volumen y calcio por microscopía de fluorescencia en 2 líneas celulares que expresan o no AQP2, perfundidas con una solución hipotónica (4 ml/min; 200 mOsm). Demostramos que el incremento del RVD observado en ambos tipos celulares debido a la perfusión, fue inhibido en presencia de $BaCl_2$ (10^{-4} M). Observamos además que en ausencia de AQP2 existe una mayor proporción de células que aumentan sus niveles de calcio (WT: 33% vs AQP2: 15%, $p<0.05$). A fin de evaluar si la baja respuesta al flujo se debía a un menor número de cilios primarios (organela implicada en el sentido de flujo) realizamos experimentos en células confluentes con mayor expresión del mismo. Sin embargo la respuesta fue observada en un menor número de células. Por otra parte la activación específica del TRPV4 (4 aPDD) luego de la perfusión fue observada solo en las células AQP2 (64%). Concluimos que independientemente de la expresión de AQP2 el incremento del flujo luminal induce un aumento del RVD por un mecanismo que involucra la activación de canales de K^+ sensibles a Bario con baja participación del TRPV4. Sin embargo la activación/inhibición del complejo funcional AQP2-TRPV4 podría depender del grado de crecimiento y de las variaciones en el fluido luminal.

663. (692) HSF-1 UN NUEVO FACTOR QUE REGULA EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN ADIPOCÍTICO

Toneatto J.; Lombardi A.; Muñoz-Bernart M.; Charo N.; Piwien-Pilipuk G.

Instituto de Medicina y Biología Experimental (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. El aumento de la masa de tejido adiposo es la resultante de su hipertrofia e hiperplasia, esta última debida a un aumento de la adipogénesis. Por este motivo es crítico dilucidar los factores que regulan dicho proceso ya que pueden resultar en nuevos blancos terapéuticos. Hemos descrito recientemente que la inmunofilina de alto peso molecular FKBP51 sufre una dinámica relocalización mitocondria-núcleo regulada por la vía AMPc-PKA. Extendiendo el estudio de

los factores con capacidad de regular la diferenciación adipocítica nos focalizamos en el HSF-1 (del inglés *Heat Shock Factor*), debido a que se desconoce su grado de participación en dicho proceso. El HSF-1 es un factor de transcripción que se encuentra latente en el citoplasma y que frente a diferentes tipos de estrés, trimeriza y transloca a núcleo para regular la expresión de distintos grupos de genes que van desde los que codifican a las distintas chaperonas, así como el de citoquinas o factores involucrados en el control del ciclo celular. Empleando inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal observamos que el HSF-1 se localiza en el núcleo cuando fibroblastos embrionales de ratón (MEFs) son inducidos a diferenciarse. Dicha localización es transitoria, a las 48 hs se lo detecta nuevamente en el citoplasma. Ya en el adipocito el HSF-1 se encuentra tanto en citoplasma como en el núcleo, de modo similar a lo descrito para FKBP51. De manera relevante, datos preliminares indican que las MEFs HSF-1-/- no se diferencian en adipocitos, señalando un importante rol regulatorio de este factor de transcripción en el proceso de adipogénesis.

664. (715) SALIDA DE ATP DE ERITROCITOS HUMANOS INFECTADOS CON PLASMODIUM FALCIPARUM

Alvarez C.¹; Schachter J.²; Muanis Persechini P.²; Pinheiro A.²; Schwarzbaum P.¹

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; IBCCF, UFRJ, Brasil².

En glóbulos rojos humanos (GR) el incremento de la concentración de AMP cíclico induce la salida de ATP, siendo la panexina 1 una de las principales vías de liberación. El ATP extracelular (ATPe) resultante puede actuar sobre receptores purinérgicos del endotelio vascular, promoviendo la relajación del calibre vascular en la microcirculación. *Plasmodium falciparum*, un agente etiológico de la malaria, se aloja en GR y los pacientes infectados exhiben problemas microvasculares. Estos podrían asociarse con una liberación alterada de ATP de los GR y/o con cambios en la acumulación extracelular del mismo. Evaluamos la cinética de liberación de ATP inducida por AMPc en GR infectados con *P. falciparum* a través de la cuantificación de la concentración ATPe en los tres estadios intra-eritrocíticos (anillo, trofozoito y esquizonte). Se indujo la salida de ATP dependiente de AMPc utilizando una mezcla (3V) conteniendo isoproterenol, forskolina y papaverina. El agregado de 3V en GR no infectados produjo un aumento agudo de la concentración de ATPe hasta un máximo. En GR infectados la respuesta aguda fue similar, pero la amplitud aumentó con la parasitemia. Para los tres estadios en alta parasitemia (5-12,5%), los niveles de ATPe post-estímulo fueron 5-6.5 veces mayores que en GR no infectados. Se estudió la salida de ATP en presencia de carbenoxolone y mefloquina, dos bloqueantes de pannexina 1. La preincubación con 100 μ M carbenoxolone o 100 nM mefloquina redujo la salida de ATP en 83-84% en GR no infectados y 67-74% en GR infectados en estadio trofozoito (parasitemia de 94%). Nuestros resultados sugieren que la salida de ATP mediada por panexina 1 es estimulada por la invasión del parásito, con consecuencias potenciales sobre la microvasculatura. Estamos evaluando posibles aumentos en la tasa de degradación de ATPe por ectonucleotidasas, lo que contrarrestaría el incremento en la concentración de ATPe inducido por un aumento en la liberación del nucleótido.

665. (837) NUEVA FUNCIÓN A NIVEL CITOPLASMÁTICO DE HP (HETEROCROMATIN PROTEIN)1₁, PROTEÍNA HASTA EL PRESENTE SÓLO DESCRIPTA EN EL NÚCLEO, Y SU ROL DURANTE LA MIOGÉNESIS

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

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET.

HP1₁ es una proteína nuclear no histónica que participa en el control de la transcripción a través de su interacción con la RNA polimerasa II y en la organización de la compactación de cromatina, entre otras funciones. Ello nos condujo a estudiar su distribución subnuclear así como a los factores que con ella

interactúan durante procesos de diferenciación tales como el miogénico. Empleando inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal llamativamente observamos que, HP1 γ se localiza no sólo en el núcleo sino también en el citoplasma de mioblastos murinos C2C12. Luego de 4 días de inducida su diferenciación, HP1 γ sigue localizada en el citoplasma adoptando un patrón filamentoso que colocaliza parcialmente con actina y β -tubulina, demostrándose mediante ensayos de inmunoprecipitación que ambas proteínas interactúan con HP1 γ . En cambio, HP1 α , otro miembro de la familia de las HP1 altamente homóloga, se encuentra presente exclusivamente en el núcleo tanto en mioblastos como en miotubos. Análisis por Western blot (WB) de las fracciones nucleares y citoplasmáticas de mioblastos y miotubos demuestra que HP1 γ se encuentra en ambas fracciones mientras HP1 α es sólo nuclear. En miofibrillas aisladas de músculo estriado de ratón, observamos que HP1 γ se localiza en las bandas I colocalizando parcialmente con actina. Fraccionamiento núcleo-citoplasmático de músculo estriado, cardíaco y liso de ratón evidencian, por análisis de WB, en todos los casos una banda mayoritaria de HP1 γ en la fracción citoplasmática. Para investigar la importancia funcional de HP1 γ durante el proceso de miogénesis, se generaron mioblastos C2C12 en los que se interfirió la expresión de HP1 γ de manera estable empleando shRNA. Las C2C12 HP1 γ -/- no se diferenciaron. En síntesis, HP1 γ no es una proteína exclusivamente nuclear, es necesaria para la diferenciación de los mioblastos y postulamos un nuevo rol para la misma en la formación/estabilidad y/o contractilidad de la fibra muscular esquelética.

NEUROCIENCIAS 3

666. (32) LA PROGESTERONA FAVORECE EL PROCESO DE OLIGODENDROGÉNESIS LUEGO DE UNA LESIÓN MEDULAR

Jure I.¹; González S.^{2,3}; De Nicola A.^{1,2}; Labombarda F.^{1,2} Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina²; Laboratorio de Nocicepción y Dolor Neuropático, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET Buenos Aires, Argentina.³

Las lesiones de médula espinal (SCI) producen desmielinización. Previamente hemos demostrado que luego de la transección de la médula espinal de rata, se produce un aumento de los precursores de oligodendrocitos (OPC), los cuales no se diferencian a oligodendrocitos maduros. Sin embargo, el tratamiento con progesterona (PROG) durante 21 días estimula la diferenciación de los OPC. Nos proponemos explorar el rol de la PROG sobre el proceso de diferenciación de OPC luego de SCI. Estudiaremos, mediante PCR en tiempo Real, la expresión de factores de transcripción que estimulan la oligodendrogenesis (Olig2, Olig1, Sox10, Mash1, Nkx 2.2), inhibidores de dicho proceso como es el factor de transcripción Hes-5 y el rol de las histonas deacetilasas (Hdac 1 y 2). También mediremos la expresión del RNAm de la proteína proteolipídica (PLP) como índice de mielinización. Tres días luego de SCI disminuye la expresión de Olig2, Olig1, Sox10, Mash1 respecto de animales intactos (CTL) ($p < 0.05$ o menos, SCI vs CTL, ANOVA). El tratamiento con PROG (16mg/kg/día) (SCI+PROG) aumenta la expresión de Olig2, Nkx2.2, Mash1 ($p < 0.05$ o menos, SCI vs SCI+PROG, ANOVA). Con respecto a Hes-5, la PROG no produce cambios en la expresión a 3 días. Luego de 21 días de SCI, la expresión de los factores estimuladores de la diferenciación, sigue por debajo de los niveles CTL ($p < 0.05$ SCI vs CTL, ANOVA) y el esteroide no modifica este parámetro ($p > 0.05$ SCI vs SCI+PROG, ANOVA). Sin embargo, el tratamiento con PROG disminuye la expresión de Hes-5 y de Hdac1 ($p < 0.05$ o menos, SCI vs SCI+PROG, ANOVA) y aumenta los niveles de ARNm de PLP ($p < 0.05$, SCI vs SCI+PROG). Esto nos permite concluir que la PROG favorece el proceso de diferenciación de OPC aumentando la expresión de los factores de transcripción que estimulan este proceso a tiempos cortos y a tiempos largos disminuyendo

la expresión del factor inhibidor Hes-5 y de proteínas que regulan procesos epigenéticos.

667. (43) RELACIÓN ENTRE EL CANAL DE CLORURO CFTR Y LA PROTEÍNA XSHROOM1 EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS

Palma A.; Marino G.; Galizia L.; Kotsias B. Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Universidad de Buenos Aires.

Existe una regulación entre el canal de cloruro CFTR y el canal de sodio ENaC localizados en la membrana apical de epitelios. xShroom1 es una proteína constitutiva en ovocitos de *Xenopus laevis*, que regula el canal ENaC modificando el número de canales insertos en la membrana. El objetivo del presente trabajo es estudiar si además existe una relación entre xShroom1 y CFTR, ya que de ser así esta proteína podría estar implicada en la regulación entre ambos canales. Los experimentos fueron realizados utilizando la técnica de "voltage clamp" en ovocitos de *Xenopus laevis*. Detectamos corrientes estimuladas por AMPc (forskolin + IBMX) en ovocitos inyectados con CFTR (-0.40 ± 0.14 uA, $n=13$), pero no en ovocitos inyectados con agua ($-3.929 \times 10^{-3} \pm 0.002$ uA, $n=9$, $p < 0.05$). Estas corrientes fueron bloqueadas con el inhibidor de canales de cloruro DPC (1mM). Luego evaluamos las corrientes de CFTR cuando la proteína xShroom1 es bloqueada. En ovocitos coinyectados con CFTR y una secuencia antisense de xShroom1 las corrientes fueron mayores (-0.95 ± 0.52 uA, $n=8$) que en ovocitos inyectados con CFTR y una secuencia sense de la proteína (-0.19 ± 0.12 uA, $n=10$, $p < 0.01$). La vida media del canal en la membrana plasmática se estimó midiendo la tasa de decaimiento de la corriente de cloruro en función del tiempo, luego de incubar los ovocitos con brefeldina A (inhibidor del transporte de proteínas a la membrana). El bloqueo de xShroom1 incrementó la vida media del canal en la membrana de 0.74 ± 0.18 hs a 2.49 ± 0.16 hs ($n=3$, $p < 0.01$). A partir de estos resultados podemos concluir que existe una relación entre CFTR y xShroom1. Además el bloqueo de xShroom1 produjo un aumento en la vida media del CFTR, indicando que el incremento observado en la corriente de cloruro no sería por un mayor transporte del canal a la membrana, sino que podría deberse a una reducción en la endocitosis del canal o a una disminución en la degradación del mismo por el proteasoma.

668. (147) DISTRIBUCION DE LOS RECEPTORES CB1 EN LA RETINA DE RATA LUEGO DE ILUMINACION CONTINUA

Soliño M.¹; López E.¹; Pinto A.²; Girardi E.¹; López-Costa J.¹ Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis" (IBCN)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

La iluminación continua (IC) de la retina de rata produce la degeneración de los fotorreceptores generando un modelo que remeda muchas características de enfermedades degenerativas de la misma (AMD y retinitis pigmentosa). Los endocannabinoides son neuromoduladores a demanda de la actividad neuronal presentes en la retina que además ejercen un papel en la respuesta inmune. Estos efectos son mediados por receptores acoplados a proteína G (CB1 y CB2) que han sido descritos en la retina. Agonistas CB1 han demostrado un papel neuroprotector en otros modelos de injuria retiniana. El objetivo de este trabajo es estudiar los cambios del receptor CB1 en la retina de rata luego de iluminación continua (IC) usando inmunocitoquímica (ICQ). Se emplearon ratas Sprague Dawley controles ($n=6$) y otras sometidas a IC (12000 lux) durante 1, 2, 5 y 7 días ($n=24$). Los ojos de las ratas controles (CTL) e iluminadas fueron fijados por inmersión y las secciones procesadas mediante ICQ empleando un anticuerpo policlonal de conejo anti-receptor CB1 (Cayman Chem). Las imágenes fueron cuantificadas utilizando el analizador de imágenes ImageJ y los datos fueron analizados estadísticamente con el programa GraphPad. En animales CTL se observó inmunoreactividad para el receptor CB1 (CB1-IR) en las capas de células ganglionares, nuclear interna, plexiformes externa e interna y una ligera reactividad en los segmentos externos de

los fotorreceptores. La CB1-IR se incrementó en todas las capas analizadas y en todos los tiempos estudiados durante la IC con un pico máximo a las 24hs. Los resultados muestran que el pico de expresión del receptor CB1 coincide con el momento de máximo stress oxidativo. Por esta causa, sostenemos que la modulación de este sistema de neurotransmisión estaría jugando un rol protector frente al daño inducido por IC. Postulamos que agonistas farmacológicos de CB1 son una herramienta potencial para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. (Subsidiado por CONICET PIP 1098 y UBACYT 20020100100329).

669. (153) TERAPIA GÉNICA HIPOTALÁMICA CON IGF-I EN RATAS HEMBRAS VIEJAS

Schwerdt J.¹; Hereñú C.¹; Rimoldi O.¹; Cónsole G.²; Luna G.²; Camihort G.²; Goya R.¹

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata¹; Cátedra de Histología B, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata².

En la rata hembra, el envejecimiento trae aparejada una progresiva degeneración y pérdida de neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) las que ejercen un control tónico inhibitorio sobre la secreción de prolactina (PRL). Estudios previos de nuestro laboratorio, con vectores adenovirales de primera generación, demostraron que la terapia génica de corto plazo (17 días) con el factor de crecimiento insulino similar tipo I (IGF-I) en el hipotálamo medio basal (MBH) de ratas de 28 meses de edad, fue efectiva para restaurar el número de neuronas TIDA y corregir la hiperprolactinemia crónica. El objetivo de este trabajo fue determinar si la terapia génica de largo plazo (4 meses) con IGF-I en el MBH de ratas viejas de 24 meses resulta efectiva para prevenir la hiperprolactinemia. Para tales fines construimos dos vectores adenovirales de tercera generación portadores de los transgenes IGF-I y DsRed2 (proteína fluorescente roja) denominados HDAd-IGF-I y HDAd-DsRed2, respectivamente. A diferencia de los vectores de primera generación, estos permiten una expresión mucho más prolongada de sus transgenes. Se implementó terapia génica neuroprotectora con IGF-I en ratas hembras jóvenes y viejas, las cuales fueron inyectadas en el hipotálamo con $8,45 \times 10^9$ PV de HDAd-IGF-I o HDAd-DsRed2 (control); también se adicionó un grupo intacto para ambas edades. Durante 4 meses se monitoreó la PRL sérica como índice de funcionalidad neuronal TIDA.

En los animales jóvenes el vector HDAd-IGF-I redujo los valores séricos de PRL ($p < 0,05$) con respecto a los grupos control e intacto. Por otro lado en las ratas viejas los grupos experimental y control mostraron una reducción de la PRL en relación con el grupo intacto ($p < 0,05$). Estos resultados parciales muestran en ratas viejas un efecto favorable del IGF-I en la prevención y reversión de la hiperprolactinemia crónica, con la observación de un efecto inespecífico a determinar en el grupo control, con respecto al grupo intacto.

670. (162) ACCIÓN DEL AGONISTA SINTÉTICO DMHCA SOBRE RECEPTORES HEPÁTICOS X EN EL CEREBRO

Coirini H.^{1,2}; Rey M.^{2,3}; Bruno M.²

Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET¹; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Cuyo, Mendoza²; Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan, San Juan³.

Los receptores hepáticos X (LXR) actúan como factores de transcripción y son cruciales para la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos. Su presencia ha sido descrita en el cerebro de roedores y participan activamente en la remoción de colesterol mejorando el déficit cognitivo, por lo que se consideran blancos prometedores para la implementación de nuevas terapias para la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer (EA). El N,N-dimetil-3beta-hidroxi-colenamida (DMHCA), es un agonista que no produce esteatosis hepática y podría ser un compuesto muy útil para el tratamiento de pacientes con EA. En el presente estudio evaluamos la acción del DMHCA sobre el cerebro in vivo. Se utilizaron 32 ratas macho (90d de edad) que fueron inyectadas

bajo anestesia en el IV ventrículo, con 5 µl de solución fisiológica, conteniendo, vehículo, 1, 5 ó 10 µg de DMHCA (Lateral: 0.16mm; Anterior:-0.09mm; Ventral: 0,34mm, Paxinos & Watson) y sacrificados a 6 ó 12 h post inyección. Corteza cerebral, hipocampo hipotálamo (HT) y cerebelo fueron extraídos y procesados para western blot. Se determinó la expresión de ABCA1 y GLUT2, dos genes activados por los LXR, utilizando anticuerpos específicos en las cuatro regiones. Para ABCA1 solamente se observó un aumento significativo en función de las dosis suministradas ($F(3,31)=5.2$ $p < 0.05$ ANOVA) en el HT. Este efecto fue más importante en los animales sacrificados a las 6h post inyección ($F(3,12)=12.8$ $p < 0.001$) observándose un aumento de 34% con la dosis mayor. No se observaron efectos significativos sobre la expresión del GLUT2 en ninguno de los tejidos a los dos tiempos explorados. El DMHCA es un agonista con una potencia relativamente importante a nivel periférico, sin embargo en las condiciones exploradas no se observó su acción en el cerebro, salvo en el HT. Más estudios son necesarios a fin de establecer una correcta relación de tiempo dosis y efecto.

671. (174) EFECTOS CONDUCTUALES DEL TRATAMIENTO CON FLUOXETINA EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO
Codagnone M.^{1,2}; Podestá M.^{1,2}; Uccelli N.^{1,2}; Traetta M.¹; Reinés A.^{1,2}

Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

El autismo se considera una sinaptopatía para la que aún no se ha descrito una terapia farmacológica capaz de tratar los síntomas nucleares. Dado que fármacos con blanco sináptico podrían ser efectivos, se ha propuesto a la fluoxetina (FLX) como posible candidato. Utilizando el modelo experimental de autismo por administración prenatal de ácido valproico (VPA) nos propusimos estudiar el efecto de la administración crónica de FLX en etapas tempranas del desarrollo sobre la conducta de los animales VPA. Los animales VPA y control (C) recibieron diariamente FLX (10 mg/kg; sc) o solución fisiológica (SF; sc) entre los días postnatales (DPN) 16-30 (C-SF, C-FLX, VPA-SF y VPA-FLX). La conducta se evaluó a DPN 31-35. La FLX corrigió el déficit observado en la actividad exploratoria en los VPA-SF (VPA-FLX vs C-SF, $p > 0,05$). Los animales VPA-FLX evidenciaron una hiperlocomoción similar a los VPA-SF evaluada en la periferia del campo abierto durante el primer intervalo. En relación a la conducta social de juego, el tratamiento con FLX disminuyó el número de pinning tanto en los animales C como VPA. Sin embargo, produjo selectivamente en los VPA una tendencia a la disminución en la latencia al primer pinning. En cuanto a las actividades sociales que no involucran conductas de juego, la FLX incrementó tanto en C como en VPA la latencia al primero de estos contactos sin modificar su número. Los resultados indican que la FLX produce beneficios en la actividad exploratoria, logrando que los animales VPA se desempeñen como los C, mientras que la interacción social y la actividad locomotora no parecen ser el blanco de acción principal del tratamiento. Estos hallazgos proveen herramientas para elaborar un enfoque más racional del uso de las terapias farmacológicas en patologías del espectro autista.

672. (247) ININGMUNOREACTIVIDAD PARA NESTINA EN HIPOCAMPOS DE PACIENTES CON EPILEPSIA TEMPORAL Y ESCLEROSIS HIPOCAMPAL TRATADOS QUIRÚRGICAMENTE

D'aleccio L.¹; Konopka H.¹; Agüero M.¹; Seoane E.²; Oddo S.²; Kochen S.¹

Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina².

Introducción: La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) afecta la plasticidad cerebral y la neurogénesis hipocámpal. Sin embargo existen controversias entre los modelos experimentales de epilepsia

aguda, en los cuales aumenta la expresión para diferentes marcadores de neurogénesis, y lo observado en los pocos trabajos realizados en modelos crónicos de pacientes con ELT y EH (esclerosis hipocampal), donde ocurriría lo contrario. **Objetivos:** Determinar la inmunoreactividad para nestina (marcador de neurogénesis y de precursores neuronales multipotenciales), en el tejido hipocampal de muestras de pacientes intervenidos quirúrgicamente. **Métodos:** Se estudiaron secciones histológicas de 16 pacientes con EH y ELT y material de archivo de 8 controles normales post mortem que fueron procesados simultáneamente por inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa) para nestina. Se realizó un análisis morfológico y cuantitativo, y se determinó la reactividad, el área reactiva y el número total de células reactivas en las capas del hipocampo (CA1/CA2/CA3/CA4), mediante análisis computarizado de imágenes (Image J). **Resultados:** Se encontraron células nestina positivas en las capas de neuronas piramidales (CA1/CA2/CA3/CA4), con una significativa reducción del número total de células nestina positivas, y una reducción significativa en el área reactiva en los hipocampos de pacientes con EH ($p < 0.01$). En la mayoría de las secciones con EH, se encontraron células nestina positivas de aspecto dismórfico, dispersas en el área del giro dentado. **Conclusión:** Si bien estos hallazgos podrían ser secundarios al proceso de esclerosis, también podrían estar relacionados con una reducción en los procesos de neuroplasticidad y neurogénesis hipocampal adulta, inducidos por las crisis de epilepsia a lo largo del tiempo. Futuros trabajos deberán continuar en esta línea, con el objetivo de ampliar los conocimientos y determinar las implicancias clínicas, cognitivas y conductuales de estos hallazgos.

673. (308) LA BIOSÍNTESIS DE ALLOPREGNANOLONA Y SUS EFECTOS EN EL DESARROLLO PUBERAL DE LA RATA HEMBRA

Giuliani F.^{1,2,3}; Escudero C.^{1,3}; García S.^{1,3}; Yunes R.^{1,2,3}; Laconi M.^{1,2,3}; Cabrera R.^{1,2,3}
Instituto de Investigaciones Biomédicas¹; Universidad de Mendoza²; Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza³.

La pubertad en la rata comienza con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y la consecuente liberación pulsátil y cíclica de las hormonas asociadas. Previamente reportamos que el neuroesteroide allopregnanolona (Allo) regula la secreción de GnRH y que su enzima de síntesis (3 α -HSOR) aumenta su expresión en la pubertad. Además observamos que la inhibición de 3 α -HSOR, durante periodos prepuberales altera la ulterior secreción de LH. Hipotetizamos que la síntesis de Allo sería un factor clave para el comienzo de la pubertad, por lo que evaluamos los efectos de la inhibición crónica de su biosíntesis sobre: 1) indicadores del comienzo de la pubertad; 2) el comportamiento sexual y valores séricos de progesterona; y 3) la actividad metabólica hipotalámica. Usamos ratas hembras sometidas a un esquema de inyecciones diarias (D31-D35) de indometacina 5 mg/kg i.p. o solución fisiológica (grupo control). Para (1) se midió la ganancia diaria de peso y se determinó el día de la apertura vaginal. Para (2) se sometió a las ratas a ensayos de lordosis/monta, con posterior medición de progesterona sérica por RIA. Para (3) se usaron hipotálamos de las ratas usadas en (2) o de ratas sacrificadas en D36 para ser ensayados mediante la técnica de reducción metabólica de MTT. Los resultados se expresaron como medias \pm SEM y analizaron mediante Test-T. Indometacina no modificó el tiempo de apertura vaginal ($p > 0,05$) ni la ganancia de peso corporal ($p > 0,05$). Sin embargo indujo una disminución en el comportamiento sexual ($p < 0,01$) y en los niveles de progesterona sérica ($p < 0,01$). Si bien no hubo diferencias significativas en la tasa metabólica hipotalámica de las ratas púberes ($p > 0,05$), los hipotálamos de las ratas D36 presentaron una actividad metabólica significativamente menor que su grupo control ($p < 0,05$). Concluimos que la biosíntesis de Allo en estadios prepuberales más que regular el comienzo de la pubertad regularía la eficiencia con la que este fenómeno se manifiesta.

674. (345) LOS RECEPTORES AT1 (R-AT1) DE ANGIOTENSINA II CEREBRAL ESTÁN INVOLUCRADOS EN CAMBIOS

NEUROADAPTATIVOS INDUCIDOS POR EXPOSICIÓN REPETIDA A ANFETAMINA (ANF)

Casarsa B.¹; Marinzalda M.¹; Marchese N.²; Paz M.²; Baiardi G.¹; Bregonzio C.²

Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, IIBYT-CO-NICET¹; Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba².

La exposición a psicoestimulantes induce cambios neuroadaptativos duraderos en el tiempo, que involucran numerosos sistemas de neurotransmisión, dentro de ellos el sistema renina angiotensina (SRA) cerebral, siendo angiotensina II (Ang II) el principal efector a través de sus receptores AT1 (R-AT1). Se ha descrito que la activación del SRA por depleción de sodio, presenta sensibilización cruzada con ANF. En nuestro laboratorio hemos observado que la exposición al psicoestimulante modifica respuestas estrechamente ligadas al SRA cerebral (apetito al sodio) y que los bloqueantes R-AT1 son capaces de prevenirlos 21 días post-ANF. Nuestro objetivo fue estudiar las respuestas fisiológicas y el patrón de activación neuronal 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. Se inyectó 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), los animales recibieron Ang II (400pmol/4ul icv.), inmediatamente se colocaron en cajas metabólicas, con acceso libre a agua y posteriormente se realizó la inmunomarcación de c-fos en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa. **Resultados:** La administración repetida de ANF aumentó el conocido efecto natriurético de Ang II intracerebral. La concentración de sodio en orina a las 2 y 24hs fue mayor a los 7 y 21 días post-ANF, vs control (Vehículo-Sal), el bloqueo de los R-AT1 previno esta respuesta a los 21 días post-exposición. De igual manera la exposición a ANF redujo la actividad neuronal inducida por Ang II icv., a los 7 y 21 días post-ANF, candesartán previno esta disminución a los 21 días post-ANF. Concluimos que los cambios neuroadaptativos inducidos por anfetamina, involucran alteraciones en el SRA cerebral, a través de la activación de los R-AT1.

675. (373) MODELO DE SOBREENEXPRESIÓN DE α -SINUCLEINA EN NEURONAS HUMANAS DERIVADAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS

Dimopoulos N.¹; Pozo Devoto V.²; García C.¹; Scassa M.¹; Falzone T.²; Sevlever G.¹

Laboratorio de Investigaciones Aplicadas en Neurociencia LIAN-FLENI¹; Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis" (IBCN)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

Desordenes neurodegenerativos como la Enfermedad de Parkinson (EP) son caracterizados por patologías axonales tempranas, presentando acumulación de organelas y proteínas que llevan eventualmente a la muerte celular. Estudios previos de casos de EP familiar sugieren que duplicaciones y mutaciones puntuales del gen de la α -Sinucleína (α -syn) llevan a fallas en la cadena respiratoria mitocondrial y a un consiguiente aumento en el estrés oxidativo. En este trabajo hemos desarrollado un modelo neuronal humano donde estudiar los posibles mecanismos inducidos por la sobreexpresión de α -sinucleína que llevan al inicio del fenotipo anormal mediado por disfuncionalidad mitocondrial. Dada la dificultad al reproducir la etiología de patologías neurodegenerativas y las limitaciones para modelar interacciones proteicas apropiadas en los modelos animales, utilizamos neuronas derivadas a partir de células madre embrionarias humanas (CMEH). La línea de CMEH, WA09 fue diferenciada al linaje neural utilizando un protocolo que incluye la formación de cuerpos embrioides, selección mecánica de neurosetas, la maduración de precursores neuronales en flotación y la diferenciación en adherencia post disgregación de los mismos (Zhang et al 2010). La

caracterización de los cultivos obtenidos a lo largo del protocolo fue realizada por qPCR e inmunoquímica utilizando marcadores de pluripotencia (Oct4, Nanog) y diferenciación neural (Pax6, Nestin, Map2, Tuj1, GFAP). La sobreexpresión de α -syn tanto WT como mutante (A53T y A30P) ha sido inducida en estos cultivos neuronales para estudiar los niveles de estrés oxidativo, la morfología neuronal y mitocondrial, así como la cinética mitocondrial en neuritas. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de α -syn y principalmente la de α -synA53T inducirían alteraciones tempranas en el estado mitocondrial que podrían aumentar los niveles de estrés oxidativo y la consecuente inducción de patologías neurodegenerativas.

676. (384) LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO INDUCE NEUROPROTECCIÓN EN UN MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL

Dorfman D.; Fernandez D.; Salido E.; Bordone M.; Aranda M.; Rosenstein R.
Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Universidad de Buenos Aires; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET.

La retinopatía diabética (RD) es una de las causas más frecuentes de ceguera irreversible. Recientemente demostramos que la exposición de ratas adultas a un ambiente enriquecido (AE) protege a la retina del daño retiniano inducido por isquemia aguda. Considerando que la isquemia juega un rol central en la etiopatogenia de la RD, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la exposición a un AE frente al daño retiniano inducido por diabetes experimental. Se utilizaron ratas *Wistar* macho adultas. Luego de una inyección de estreptozotocina (STZ, 60mg/kg) en forma intraperitoneal, las ratas albergaron en un ambiente estándar (AS) o AE por 10 semanas. 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 repositionaron 1 vez/día y reemplazaron totalmente semanalmente. Se analizó la función retiniana (registro de electroretinogramas (ERG)), la permeabilidad vascular (inyección de Azul de Evans), y los niveles del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (por *Western blot* e inmunohistoquímica) y de TNF α retinianos (por ELISA). En animales expuestos a un AS, la diabetes experimental indujo un aumento en la permeabilidad vascular, un aumento en la inmunomarcación y en los niveles de VEGF ($p < 0,01$ vs. control) y un aumento en los niveles de TNF α ($p < 0,01$ vs. control) a las 6 semanas post-inyección de STZ, sin afectar la estructura retiniana. Asimismo, la inyección de STZ indujo una caída significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG ($p < 0,01$ vs. control) a partir de las 6 semanas, que progresó en períodos posteriores. La exposición a AE revirtió significativamente la disfunción retiniana ($p < 0,01$ vs. AS), el aumento de la permeabilidad vascular, y en los niveles de VEGF ($p < 0,01$ vs. AS) y TNF α ($p < 0,01$ vs. AS). Estos resultados sugieren que la exposición a un AE podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la RD.

677. (442) CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA POR EL LUGAR ASOCIADO A LA DROGA EN PEZ CEBRA: CARACTERIZACIÓN COMPORAMENTAL Y MOLECULAR

Faillace M.^{1,3}; Bernabeu R.^{1,2}
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis" (ICBN)-CONICET, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

El condicionamiento de preferencia por el lugar (CPP) es un test utilizado para medir la preferencia por una droga. En estudios realizados en roedores se demostró que la nicotina induce un tipo de CPP sesgado, donde los animales poseen una preferencia inicial por uno entre dos compartimientos. El pez cebra también se ha utilizado como un modelo animal en el CPP de nicotina aunque con un diseño no sesgado. Sin embargo, los procedimientos sesgados resultaron más efectivos para estudiar los efectos

de la nicotina en roedores. Por consiguiente, en este trabajo se evaluó el CPP de nicotina de diseño sesgado en el pez cebra. Demostramos que los peces cebra desarrollaron un evidente CPP a la nicotina (grupo pareado). El grupo control, en el cual la nicotina fue administrada en ambos compartimientos al azar (grupo no pareado) no mostró cambios significativos en la preferencia por el lugar. Esto indicó que, el cambio de preferencia del grupo pareado no ocurrió como consecuencia de una reducción de la aversión al compartimiento inicialmente evitado. Se analizaron además, varios parámetros conductuales que evidenciaron que el pez cebra desarrolla una preferencia por la nicotina, aunque la droga fue administrada en un ambiente adverso. Asimismo, los resultados conductuales fueron apoyados por estudios moleculares. El análisis de PCR en tiempo real mostró un aumento significativo en la expresión de las subunidades alfa-6 y alfa-7, pero no alfa-4 y beta-2 en los cerebros de los peces cebra pareados con nicotina, mientras que los grupos controles no mostraron cambios significativos. Por otra parte, la fosforilación de CREB, un indicador de la actividad neuronal, acompañó la adquisición del CPP de nicotina. Los resultados sugieren que los peces cebra expuestos a la nicotina en un ambiente inicialmente hostil pueden desarrollar una preferencia por dicho lugar y este comportamiento es probablemente debido a los efectos recompensantes de la nicotina.

678. (458) REGULACIÓN GLUTAMATÉRGICA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EL CRECIMIENTO EN LA RETINA DE PEZ CEBRA

Lamberti M.¹; Venera G.^{2,3}; Faillace M.^{1,2}
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Universidad de Buenos Aires²; Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR)³.

La retina de pez cebra crece durante la vida del animal adicionando nuevas células a partir de una zona proliferativa germinal llamada zona ciliar marginal (CMZ). Este modelo animal permite estudiar los mecanismos de proliferación y diferenciación que generan todos los tipos celulares en la retina adulta. En la fase diurna, cuando el contenido retiniano de glutamato es menor, se demostró la existencia de un pico de proliferación en la CMZ. El glutamato media la transmisión de información desde los fotorreceptores a las células bipolares (CB) y de éstas a las células ganglionares (CG). Para examinar el efecto del glutamato sobre la proliferación celular en la CMZ, se inyectó intraocularmente, en la retina del pez cebra (*Danio rerio*), agonistas y antagonistas glutamatérgicos. Para determinar proliferación celular, se trataron las retinas *in vivo* con BrdU por 4 h previas al sacrificio de los peces. Se utilizó L-aspartato, que compete con la unión del glutamato a sus receptores y transportadores. Se bloqueó la despolarización de las CB de tipo ON con un agonista L-AP4 de los receptores mGluR6. Para bloquear la información entre los fotorreceptores y las CB OFF y las CB ON/OFF y las CG se inyectó un antagonista de los receptores AMPA: DNQX. Para antagonizar los receptores NMDA se administró APV. Por último, se adicionó TTX que bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje principalmente en las CG. Los tratamientos con L-Aspartato y DNQX incrementaron significativamente el número de células proliferativas en la CMZ. Por el contrario, las inyecciones intraoculares de L-AP4, APV no modificaron el número de células proliferativas en la CMZ. Al presente, se analizan los experimentos concernientes al tratamiento con TTX. Estos resultados sugieren un papel relevante de glutamato (posiblemente en respuesta al ciclo de luz/oscuridad) en la regulación de la actividad mitótica en la CMZ y por ende el crecimiento de la retina en el pez cebra adulto.

679. (485) DIMORFISMO SEXUAL EN LAS PROPIEDADES ANTINOCICEPTIVAS DE LA MORFINA: MODELO GENÉTICO PARA EVALUAR LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GABAB

Pedron V.¹; Varani A.^{1,2}; Balerio G.^{1,2}
Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-CONICET¹; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

En estudios previos de nuestro laboratorio observamos diferencias sexuales en el efecto antinociceptivo y en la expresión de c-Fos de ciertas áreas cerebrales de ratones salvajes, inducidas por la administración aguda de morfina (MOR). Además, evidenciamos la participación del sistema GABAérgico en estos efectos utilizando un abordaje farmacológico. Teniendo en cuenta estos resultados, el objetivo del presente estudio fue evaluar la posible participación de los receptores GABA_B en el efecto antinociceptivo de la MOR desde un abordaje genético utilizando ratones de ambos sexos knockout deficientes en la subunidad GABA_{B(1)} (KO GABA_{B(1)}) de los receptores GABA_B y sus respectivos wild-type (WT). Se determinaron los efectos antinociceptivos de la MOR (1, 3 y 9 mg/kg; sc) utilizando dos modelos experimentales: placa caliente e inmersión de la cola y se calcularon los %MIP (máxima inhibición posible). Luego, se extrajeron los cerebros para evaluar la expresión de c-Fos por inmunohistoquímica. En primer lugar, los resultados revelaron que la MOR indujo un efecto antinociceptivo dosis dependiente más intenso en los ratones machos que en las hembras WT (p<0,01). Por otro lado, el efecto antinociceptivo de la MOR (3 mg/kg; sc) se abolió en los ratones machos KO GABA_{B(1)} con respecto a sus WT, mientras que en las hembras KO GABA_{B(1)} no se observaron diferencias significativas entre los genotipos. En segundo lugar, los resultados evidenciaron una disminución dosis dependiente de la expresión de c-Fos en la corteza cingulata y en núcleo accumbens shell más intensa en ratones machos que en hembras WT, luego de la administración aguda de MOR. Esta disminución parecería ser aún más intensa en los ratones KO GABA_{B(1)} de ambos sexos. Estos resultados confirman el dimorfismo sexual y la participación de los receptores GABA_B en la respuesta antinociceptiva y en las alteraciones de la expresión de c-Fos inducidas por la administración aguda de MOR. UBACyT B016 y PIP 11420090100303

680. (511) HMGB-1 ES UN DAMP QUE PROMUEVE LA GLIOSIS REACTIVA IN VITRO: IMPLICANCIAS PARA LA PROPAGACIÓN DE LA NEUROINFLAMACIÓN

Lukin J.; Rosciszewski G.; Villarreal A.; Ramos A.
Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. de Robertis" (IBCN)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Luego de una injuria cerebral, las células de la glía responden con una reacción genérica denominada gliosis reactiva. Si bien se han demostrado efectos tanto benéficos como perjudiciales de la gliosis reactiva, la conversión de la glía hacia un fenotipo proinflamatorio induce neurodegeneración y expande la muerte neuronal. La difusión de mediadores DAMP (*Damage Associated Molecular Pattern*) como HMGB-1 desde las neuronas en necrosis en la zona del daño cerebral, cumpliría un rol fundamental en la expansión y perpetuación de la neuroinflamación a través de la activación de receptores Toll. Con el objetivo de analizar los efectos de HMGB-1 sobre la glía utilizamos cultivos de astrocitos corticales de rata obtenidos de neonatos conteniendo microglía o deprivados de ella expuestos a diferentes concentraciones de HMGB-1 recombinante (50, 500 o 2500 ng/ml por 24 hs). La exposición a HMGB-1 indujo un cambio en el fenotipo de los astrocitos hacia una morfología filamentosa, que se correlaciona con la gliosis reactiva, e indujo la activación del factor de transcripción NFκB en una forma dosis dependiente. Por otro lado, para analizar el rol que tiene HMGB-1 en la propagación de la inflamación, se expusieron astrocitos a HMGB-1 (500 ng/ml, 24h) y luego se recolectó medio condicionado (CM) durante 48h. La exposición de los astrocitos naïve al CM de astrocitos expuestos a HMGB1 produjo un aumento de la proliferación celular. Nuestros resultados indican que HMGB-1 induce la conversión de los astrocitos hacia el fenotipo reactivo y la activación de NFκB, que es el efector de los receptores Toll. La exposición a HMGB-1 induce la secreción de factores capaces de inducir un aumento en la tasa de división celular de astrocitos no expuestos a injuria. Este efecto podría tener fuertes implicancias para comprender la expansión de la gliosis reactiva que sucede luego de una injuria. Subsidios: PICT 2008-1590, PIP CONICET, UBACyT.

681. (557) SOBRECARGA AGUDA DE FE: EFECTO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ÁREAS CEREBRALES DE RATA

Reiteri R.¹; Piloni N.²; Hernando M.¹; Cervino C.¹; Puntarulo S.²
Facultad de Medicina, Universidad de Morón¹, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires-CONICET².

Se caracterizó el efecto de la sobrecarga aguda de Fe-dextrán sobre la capacidad antioxidante en corteza (C), hipocampo (H) y cuerpo estriado (CE), ya que el Fe es un catalizador activo de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Ratas Sprague Dawley fueron inyectadas con una dosis intraperitoneal de 500 mg Fe-dextrán /kg. Seguidamente, los cerebros de los animales fueron removidos a las 6 y 8 h pos-inyección (pi) y se separaron las tres áreas mencionadas. El contenido de Fe total a las 6 h pi en C, H y CE (363±39, 491±69, 595±14 pmoles/mg PF, respectivamente), resultó significativamente mayor con respecto a los valores control (106±10, 191±23, 150±9 pmoles/mg PF, respectivamente). El contenido de GSH disminuyó significativamente luego de 6 h (59%) y 8 h pi (27%) en C, sin modificaciones significativas en H y CE. Se observó un aumento significativo en la actividad de catalasa (CAT) en C a las 6 h pi (9,0±1,0 pmol/mg prot) y 8 h pi (7,9±0,7 pmol/mg prot) con respecto al valor control (3,3±0,3 pmol/mg prot). Además, la actividad de CAT mostró un aumento significativo en H luego de 6 h (4,1±0,2 pmol/mg prot) y 8 h pi (6,0±0,6 pmol/mg prot) con respecto al valor control (3,2±0,5 pmol/mg prot), y en CE luego de 8 h pi (9,0±1,0 pmol/mg prot) con respecto al valor control (6,2±0,3 pmol/mg prot). Estos resultados sugieren que en una intoxicación aguda, el contenido del Fe aumenta significativamente en todas las áreas cerebrales estudiadas. Así, la capacidad de actuar como agente catalizador de la generación de ROS, que conduciría a efectos deletéreos, resultaría atenuada por el posible efecto protector de las especies antioxidantes tanto de naturaleza enzimática (que aumentan su actividad) como no-enzimática (que son consumidos).

682. (565) ALTERACIONES TEMPRANAS Y AVANZADAS DE LA MICROGLÍA HIPOCAMPAL EN RATONES PDAPP-J20, MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Pavía P.^{1,2}; Beauquis J.^{1,2}; Pomilio C.^{1,2}; Vinuesa A.^{1,2}; Saravia F.^{1,2}
Laboratorio de Neurobiología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Medicina y Biología Experimental (IByME)-CONICET².

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la patología neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial. Los pacientes presentan un cuadro de demencia y múltiples cambios en el sistema nervioso central. Particularmente en el hipocampo y en la corteza cerebral, se forman placas amiloides (PA), depósitos de proteínas, lípidos y otros componentes que provocan una reacción inflamatoria local, afectando la estructura y la función neuronal y glial. Dado que la inflamación es un factor principal en la etiología de la EA, nos propusimos estudiar alteraciones microgliales tempranas y su progresión durante el avance de la patología. Utilizamos ratones transgénicos (Tg, PDAPP-J20) de 3 a 15 meses (m) de edad portando el transgen de la APP humana con las mutaciones *Swe* e *Ind* y sus hermanos no Tg (NTg) como controles. Mediante inmunohistoquímica para el marcador microglial Iba-1 y contratinción con rojo Congo sobre cortes coronales de hipocampo, se observó una mayor área inmunoreactiva en los Tg de 3 m (en ausencia de PA) en el *stratum radiatum* respecto al NTg (29,36 ± 1,46% vs 33,96 ± 0,92%, p<0,05), sin cambios en la densidad celular. En los Tg de 9m -que presentaban una considerable cantidad de PA- el área inmunoreactiva resultó ser más elevada que a los 3 m (p<0,05) y además mostraron un marcado aumento en la densidad de la microglía no asociada directamente a las PA (p<0,05). Adicionalmente se exploraron posibles alteraciones de la vía autofágica en este tipo celular en su interacción con las PA; realizando dobles inmunofluorescencias para Iba-1 y ubiquitina o

p62 se encontraron depósitos intracelulares p62+/ubiquitina+ en aquellas células asociadas a las PA. Estos resultados muestran que la población microglial se ve afectada en etapas iniciales de la patología, antes de la aparición de las PA, y que, al avanzar la enfermedad, desarrolla cambios estructurales y metabólicos coincidentes con un estado de mayor activación que podría contribuir al deterioro cognitivo.

683. (656) LA INTERACCIÓN DE ALFA-SINUCLEÍNA CON LA MITOCONDRIA ES DINÁMICA Y PRODUCE EFECTOS EN EL FUNCIONAMIENTO DE LA CADENA RESPIRATORIA

Martínez J.^{1,2,5}; Fuentes F.^{1,2}; Vanasco V.³; Álvarez S.³; Jovin T.⁴; Kotler M.⁵

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET¹; Laboratorio de Dinámica Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Max Planck Institute²; Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Max Planck Institute for Biophysical Chemistry (MPIBPC), Alemania⁴; Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-Oncología, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁵.

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa que afecta al 1% de la población mayor de 60 años. Se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra*. Alfa-sinucleína (AS) es una proteína expresada en el sistema nervioso central y su sobreexpresión en estas células e interacción con la mitocondria estarían implicadas en el desarrollo de la EP. Sin embargo, los mecanismos están poco esclarecidos. *Hipótesis: Existe interacción de AS con las mitocondrias y esto produce un efecto sobre su normal funcionamiento.* Se trabajó con mitocondrias aisladas de cerebro de rata y con mitocondrias de células de neuroblastoma (SHSY5Y). Se incubaron mitocondrias de cerebro con AS (0 y 100 μ M) para medir el consumo de oxígeno y evaluar su efecto sobre la cadena respiratoria. Se realizaron fraccionamientos submitocondriales para establecer la localización de AS. Por último, se realizó por microscopía un estudio sobre la dinámica de asociación de AS a la mitocondria. El consumo de oxígeno disminuye un 29.7% (N=3) cuando las mitocondrias son incubadas con AS a 100 μ M en comparación con mitocondrias sin incubación. El fraccionamiento muestra que la distribución de AS en la mitocondria varía según su concentración. La unión de AS a la mitocondria es dinámica, la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo cero de lavado con una solución de AS 1 y 10 μ M muestra un aumento del $76.2\% \pm 47.7$ de unión AS, 1 μ M y un aumento del $50.7\% \pm 39.7$ AS, 10 μ M mientras que el lavado con buffer muestra una disminución de la unión de un $65.6\% \pm 4.90$ AS, 1 μ M y $57.5\% \pm 13.0$ AS, 10 μ M, (N=3). AS ingresa a la mitocondria y su localización depende de la concentración. La unión de AS a la mitocondria es dinámica y variable respecto a la concentración de la proteína. El efecto de esta interacción se traduce en una disminución de la respiración celular lo que llevaría a un desbalance del metabolismo mitocondrial y en consecuencia a la muerte celular en la EP.

684. (700) LA EXPOSICIÓN AGUDAL AL ETANOL ALTERA LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA LÍNEA CELULAR MICROGLIAL BV2

Correa F.; De Laurentiis A.; Rettori V.; Franchi A.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET.

El etanol es una de las drogas legales más consumidas a nivel mundial y cuyo abuso tiene implicancias no sólo a nivel del individuo que lo consume sino a nivel social y económico. Pocos trabajos han abordado el efecto del etanol sobre las células microgliales. Se ha observado un aumento de la reactividad microglial en necropsia de pacientes alcohólicos, signo asociado con un proceso de neuroinflamación. La microglía constituye la principal célula efectora de la respuesta inmune innata y, una vez activada,

libera una serie de factores proinflamatorios que pueden contribuir a exacerbar o prolongar en el tiempo la inflamación en el SNC. El sistema endocannabinoide (SE) es considerado un participante clave en la modulación de la respuesta microglial. Alteraciones en el SE podrían impactar sobre el proceso de activación microglial. Por ello, nuestro objetivo fue estudiar el efecto del etanol sobre el SE microglial y las posibles consecuencias del mismo sobre la respuesta microglial frente al LPS. Como primera aproximación, caracterizamos la presencia del SE en las células BV2, demostrando en las mismas la existencia de las enzimas de síntesis (NAPE-PLD), degradación (FAAH) y los receptores CB1, CB2 así como el receptor vanilloide TRPV1. La exposición aguda al etanol indujo una disminución en la expresión de la proteína y del mensajero de NAPE-PLD ($p < 0,05$), un aumento en la expresión de CB1 ($p < 0,05$) y un aumento de la actividad de FAAH ($p < 0,05$). Estos cambios en el SE microglial darían cuenta de una menor producción de anandamida (AEA) asociada con una mayor degradación de la misma. Esto se traduce en una respuesta alterada frente a distintos estímulos. Así, tanto la administración de URB597 10nM (un inhibidor de FAAH) como de AEA exógena (10nM) mostraron un menor efecto antiinflamatorio en la microglía pre-expuesta al etanol con respecto al control ($p < 0,05$). En conclusión, el etanol altera al SE microglial reduciendo sus efectos moduladores de la activación microglial.

685. (766) PAPEL DEL RECEPTOR DE ENDOTELINAS TIPO A SOBRE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA EN EL HIPOTÁLAMO ANTERIOR DE RATAS HIPERTENSAS DOCA-SAL

Guil M.¹; Cassinotti L.¹; Balabasquer L.¹; Hope S.¹; Bianciotti L.²; Vatta M.¹

Cátedra de Fisiología, (IQUIMEFA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires².

En trabajos previos demostramos que la actividad y los niveles de tirosina hidroxilasa (TH) total y sus formas fosforiladas se encontraban disminuidas en el hipotálamo anterior (HA) de animales hipertensos DOCA-sal y que el tratamiento con endotelinas (ETs) administradas ex vivo inducían un aumento de la actividad noradrenérgica solo en los animales hipertensos. Con el objeto de definir qué receptor está involucrado en estas respuestas, en el presente trabajo se determinó el papel del receptor de ETs tipo A (ETA) sobre la presión arterial (PA), frecuencia cardíaca (FC) y la actividad y niveles de TH en el HA de ratas normotensas e hipertensas DOCA-sal. Para llevar a cabo este objetivo se administró vía intracerebroventricular (ICV) el antagonista ETA (BQ-610, 20 μ M/1 μ l/min). Luego de la inyección ICV aguda (90 min) del antagonista los animales se sacrificaron, previa toma de la PA y FC. Posteriormente se extrajeron los HA y se les determinó la actividad de TH por método radioenzimático y los niveles de TH total y sus fosforilados (Serina 19, 31 y 40) por western blot. Los resultados mostraron que el antagonista no modificó ni la PA media ni la FC en animales normotensos mientras que en los DOCA-sal disminuyó ambos parámetros. En lo que respecta a la actividad de TH, el BQ-610 no produjo modificaciones ni en animales normotensos ni en hipertensos. Este mismo comportamiento se observa con los niveles totales de TH y de sus formas fosforiladas. Estos resultados nos permiten concluir que aunque la administración del antagonista ETA disminuya tanto la PA como la FC en los animales DOCA-sal, el bloqueo de este receptor no afecta ni la actividad ni los niveles de la TH a nivel del HA. Estos datos concuerdan con estudios previos en donde demostramos que los efectos de las ETs ex vivo sobre la transmisión noradrenérgica en el HA estaban mediados por el receptor ETB. En concordancia, estudios recientes muestran bajos niveles de receptor ETA en esta región hipotalámica.

686. (792) EFECTOS DEL POSTCONDICIONAMIENTO CON CLORURO DE COBALTO COMO TRATAMIENTO NEU-

ROPROTECTOR EN UN MODELO MURINO DE ASFIXIA PERINATAL

Logica T.; Romero J.; Saraceno G.; Holubiec M.; Muiz J.; Kölliker-Frers R.; Capani F.; Castilla R.
Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Prof. Dr. Alberto C. Taquini" (ININCA)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

La asfixia perinatal (AP) es una complicación obstétrica asociada a una alta tasa de morbilidad, con una incidencia de 1-5/1000 nacidos vivos. Es además un importante factor de riesgo para diversos trastornos del neurodesarrollo. Se ha observado que una serie repetitiva de pequeños eventos isquémicos aplicados tras un evento hipóxico-isquémico principal (postcondicionamiento) activa diferentes mecanismos neuroprotectores que favorecen la supervivencia neuronal y se preservan los procesos de memoria y aprendizaje alterados por la AP. El Cloruro de Cobalto (CoCl_2) podría funcionar como post-condicionante ya que en condiciones de normoxia gatilla cambios transcripcionales que mimetizan la respuesta del organismo ante un evento hipóxico. Por ello estudiamos a este compuesto como posible terapia neuroprotectora. Con ese fin, ratas Sprague Dawley machos de siete días fueron sometidas a un modelo de hipoxia-isquemia por ligadura de la arteria carótida común derecha y una posterior asfixia aguda por sometimiento a una atmósfera de N_2 al 100% durante 3 min. A las 24 hs se les administró subcutáneamente 60mg/kg de CoCl_2 . Se realizaron pruebas neuroconductuales indicadoras de daño en el neurodesarrollo, y se observaron mejorías significativas a los 12 y 15 días en pruebas de reflejo de marcha y geotaxis negativa en animales asfícticos tratados con CoCl_2 respecto al grupo asfíctico tratado con vehículo. El daño neuronal hipocampal a los 30 días fue evaluado por inmunohistoquímica de NeuN observándose una disminución en el número de neuronas así como una alteración en el patrón de tinción en la capa CA1 hipocampal de animales AP, efectos que fueron menores en animales a los que se les suministró CoCl_2 . En conclusión, la administración de CoCl_2 produjo recuperación de los daños estudiados causados por la AP a nivel hipocampal. De gran importancia clínica sería una posterior comprensión y manipulación de los mecanismos por los cuales actúa este compuesto.

687. (806) DIFERENCIAS SEXUALES EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE AROMATASA Y DE RECEPTORES DE ANDRÓGENO Y ESTRÓGENO EN CEREBRO EN DESARROLLO ANTES DE LA MASCULINIZACIÓN POR ESTEROIDES GONADALES IN UTERO: ROL DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO SEXUAL

Cisternas C.; Caeiro X.; Mir F.; Cambiasso M.
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba.

Los andrógenos y/o sus metabolitos participan en la masculinización del cerebro en desarrollo a través de su receptor o vía receptor de estrógeno luego de su aromatización a estradiol por la enzima aromatasa. El objetivo de este trabajo es evaluar la contribución del complemento cromosómico sexual (CCS) sobre la expresión sexualmente dimórfica de Cyp19a1, Ar y Esr1 en regiones neuroanatómicas que expresan aromatasa. Con este fin utilizamos un modelo de ratón transgénico que presenta una delección del gen Sry del cromosoma Y que permite disociar el efecto del CCS (XY vs XX) y el sexo gonadal (machos vs hembras, M vs H). Los niveles de ARNm de Cyp19a1, Ar y Esr1 fueron cuantificados por qRT-PCR en Estria Terminalis (ST), Área Amigdalina Anterior (AAA) y Amígdala Medial y Central (A) antes de la masculinización (día embrionario 16). El análisis estadístico de la expresión de Cyp19a1 mostró un efecto significativo debido al CCS en ST ($F=6,31$; $p=0,036$) y AAA ($F=5,228$; $p=0,039$). La expresión de Cyp19a1 en estas regiones fue significativamente mayor en individuos XY (XYM y XYH) con respecto a los individuos XX (XXM y XXH). Se observó un efecto significativo del sexo en la expresión de Ar en AAA ($F=7,85$; $p=0,021$): los machos gonadales (XYM y XXM) tienen mayor expresión de Ar que las hembras gonadales (XYH y XXH). En la expresión de

Esr1 se observó un efecto significativo del sexo en sus niveles de expresión en ST ($F=5,06$; $p=0,05$) y AAA ($F=7,08$; $p=0,028$), indicando que las hembras gonadales (XYH y XXH) tienen mayor expresión de Esr1 con respecto a los machos gonadales (XYM y XXM). La expresión de los genes analizados en A no presentó efectos significativos debidos al CCS, al sexo gonadal o a su interacción. Estos resultados sugieren que temprano en el desarrollo, antes de los efectos organizadores de los esteroides gonadales, el CCS modula diferencialmente la expresión de factores claves involucrados en la diferenciación sexual del cerebro.

688. (851) PROGESTERONA Y POSIBLES EFECTORES DE SU ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA ESTRIATAL EN RATAS MACHO HEMIPARKINSONIANAS

Herrera M.^{1,2}; Giuliani F.¹; Casas S.¹; Yunes R.¹; Cabrera R.¹

INBIOMED, Universidad de Mendoza, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza¹; Universidad Nacional de Misiones².

Previamente reportamos que progesterona protege la actividad dopaminérgica y glutamatérgica estriatal de ratas macho hemiparkinsonianas. Nuestra hipótesis es que esta hormona podría controlar la expresión de factores reguladores de la actividad neuronal. En un intento por acercarnos a los posibles mecanismos subyacentes en este trabajo nos hemos propuesto evaluar el efecto de progesterona sobre la expresión génica de BDNF, de Óxido Nítrico sintetasa (ONSi) y sobre los niveles de nitritos en cuerpo estriado izquierdo de ratas macho hemiparkinsonianas, generadas por la inyección intraestriatal del neurotóxico 6-OHDA. Los grupos experimentales fueron: G1) Sham (controles sin lesión); G2) Lesionados sin tratamiento y G3) Lesionados y tratados con progesterona 4 mg/kg/día s.c. por 3 días consecutivos. A las 8 semanas post lesión, se evaluó la expresión del ARNm de BDNF y ONSi mediante RT-PCR y la concentración de nitritos usando la técnica de Griess. Se observó un aumento significativo en la concentración estriatal izquierda de BDNF en G3 con respecto a G1 y G2 ($p<0,01$ y $p<0,001$, respectivamente). En G2 y G3 hubo un aumento significativo en la expresión de la ONSi con respecto al grupo control ($p<0,001$ y $p<0,05$ respectivamente) si bien es importante mencionar el menor incremento en G3. La concentración de nitritos estuvo incrementada en G2 con respecto a G1 y G3 ($p<0,05$ en ambos casos). Concluimos que el tratamiento con progesterona reduce la concentración de nitritos en CEI, lo que podría reducir la respuesta inflamatoria local al impedir que aumenten las especies reactivas del oxígeno. Este efecto podría ser mediado por cambios en la expresión génica de ONSi. Por otro lado el aumento en la expresión estriatal de BDNF por progesterona, ofrecería a los sistemas neuronales nigroestriales de la zona lesionada una mayor disponibilidad del factor neurotrófico. Estos efectos ayudarían a mantener la funcionalidad neuronal y glial que previamente hemos reportado.

FARMACOCINÉTICA 3**689. (405) USO DE LA COMBINACIÓN IVERMECTINA-RICOBENDAZOLE EN BOVINOS: POTENCIALES INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS-FARMACODINÁMICAS**

Cantón C.; Ceballos L.; Moreno L.; Fiel C.; Yaguez P.; Lanusse C.; Alvarez L.

Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la eficacia clínica y las posibles interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas tras la administración subcutánea (SC) de ivermectina (IVM) y ricobendazole (RBZ) en bovinos, en forma única o combinada. Sesenta terneros naturalmente infectados con cepas de nematodos gastrointestinales resistentes a IVM, se dividieron en cuatro grupos (n= 15): Grupo control: sin tratamiento antihelmíntico; Grupo IVM: tratados por vía SC con IVM (0.2 mg/kg); Grupo RBZ:

tratados por vía SC con RBZ (3.75 mg/kg); Grupo IVM+RBZ: tratados por vía SC con IVM y RBZ (0.2 y 3.75 mg/kg, respectivamente). De cada grupo tratado se seleccionaron ocho animales para el estudio farmacocinético. De estos animales se obtuvieron muestras de plasma previo al tratamiento y hasta 28 días post-tratamiento. La cuantificación de IVM y RBZ se realizó por HPLC. La eficacia clínica de los tratamientos se determinó por el test de reducción del conteo de huevos en materia fecal (TRCH). Se observaron eficacias de 47,6% (IVM), 94,1% (RBZ) y 98% (IVM+RBZ). El conteo de huevos fue similar ($P>0.05$) entre los grupos IVM y control, resultando dicho conteo diferente ($P<0.05$) al observado en los grupos tratados con RBZ o IVM+RBZ. No se observaron diferencias en el conteo de huevos entre los grupos RBZ e IVM+RBZ ($P>0.05$). Se estudió además las potenciales interacciones farmacocinéticas entre ambas moléculas. En las condiciones experimentales descriptas, no se observó ventaja terapéutica al utilizar la combinación de IVM+RBZ en comparación al tratamiento único con RBZ.

FARMACODINAMIA 3

690. (105) EFECTO ANTIESPASMÓDICO INTESTINAL DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HYPERICUM CONNATUM LAM

Matera S.; Bruno F.; Consolini A.

Cátedra de Farmacología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Hypericum connatum Lam. (Clusiaceae) es una hierba perenne, nativa de Argentina y Sudamérica. Conocida como "cabotoril" (CT) u "oreja de gato", ha sido utilizada popularmente como digestivo, cardiotónico y antibacteriano. Si bien ha sido estudiado el efecto antiespasmódico de la especie europea *Hypericum perforatum*, no lo ha sido el *H. connatum*. Nuestro objetivo fue estudiar si la especie autóctona tiene efecto antiespasmódico y cuál es su mecanismo de acción. Se preparó un extracto etanólico por maceración de hojas al 10% (EE-CT) a partir de una muestra de herboristería. Se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) de Histamina (H) en porciones de íleon aislado de cobayo ($n=5$) y CCR de Carbacol (Cb) en íleon de rata ($n=8$), en cubas con solución Tyrode a 37°C, y medición de la fuerza longitudinal mediante transductores isométricos. Para evaluar si el EE-CT interfiere con el influjo de Ca^{2+} al músculo liso se realizaron CCR de $CaCl_2$ en Tyrode con $[K^+]$ 40 mM en íleon de rata ($n=8$). Resultados: el EE-CT inhibió no competitivamente tanto a la CCR de H (pD_2 o pCE_{50} de 5.60 ± 0.19) con una CI_{50} de 0.73 ± 0.14 mg hoja CT/ml cuba, como a la CCR de Cb (pD_2 6.40 ± 0.11) con CI_{50} de 1.50 ± 0.12 mg hoja/ml. En las CCR de Ca^{2+} el EE-CT también inhibió en modo no-competitivo la contracción (pD_2 : 2.96 ± 0.11) con una CI_{50} de 0.94 ± 0.27 mg hoja/ml cuba ($n=6$). Las CI_{50} son diferentes entre sí (ANOVA: $p=0.0207$) siendo el orden de las CI_{50} frente a cada agonista el siguiente: $CI_{50}(H) < CI_{50}(Cb) = CI_{50}(Ca)$ (con $p<0.05$ en post-test). Conclusiones: El EE-CT exhibió un efecto antiespasmódico por antagonismo no-competitivo de la contracción intestinal debida a estimulación colinérgica e histaminérgica. El mecanismo es la inhibición no-competitiva del influjo de Ca^{2+} al músculo liso por el EE-CT, con CI_{50} similares a las que exhibió frente al agonista respectivo, considerando posibles diferencias de especie. Proyectos: UNLP- X513-09/12 y UNLP 2013/2016.

691. (655) LA PRODUCCIÓN DE PROSTAGLANDINA POR ESTIMULACIÓN MUSCARÍNICA EN EL MÚSCULO CILIAR DEL CERDO

Benozzi G.^{1,2}; Quinteros Villarruel E.¹; Facal S.^{1,2}; Benozzi J.²; Borda E.¹; Orman B.¹

Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Investigación Avanzada de la Presbicia².

El músculo ciliar del cerdo (MC) es un músculo liso en forma de anillo cuyas fibras musculares (circulares, transversales y

longitudinales) al contraerse provocan un cambio en la forma y la posición del cristalino permitiendo la acomodación. En este estudio evaluamos la capacidad del músculo ciliar del cerdo (MC) en presencia y en ausencia de un agonista colinérgico (pilocarpina) y los respectivos antagonistas de los subtipos de receptor en la generación de prostaglandina (PGE_2). Mediante la técnica de ELISA valoramos el efecto de pilocarpina y los antagonistas colinérgicos de los subtipos M_1 (1×10^{-6} M pirenzepina) y M_3 (4.5×10^{-9} M J104129) como así también de diferentes inhibidores enzimáticos sobre la producción de la PGE_2 . Se observó que la pilocarpina a concentraciones crecientes (de 1×10^{-10} a 1×10^{-6} M) incrementa la producción de PGE_2 dependiente de la dosis en un $55\% \pm 3$, alcanzando un efecto máximo a 1×10^{-7} M. Este efecto de la pilocarpina fue inhibido en presencia de 1×10^{-6} M de atropina e indometacina 5×10^{-4} M en un $44\% \pm 2$ y $41\% \pm 3$, respectivamente. En presencia de los antagonistas 1×10^{-6} M pirenzepina y 4.5×10^{-9} M J104129 se observó una inhibición del efecto estimulante de la pilocarpina de $36\% \pm 2$ y $42\% \pm 3$. La estimulación se inhibió un $39\% \pm 2$ en presencia de 1×10^{-6} M U73122 (inhibidor de la fosfolipasa C) y un $36\% \pm 3$ en presencia de 1×10^{-6} M OBAA (inhibidor de la fosfolipasa A2) como así también la movilización del calcio ya que en presencia de 1×10^{-5} verapamilo (bloqueante del canal L de calcio) se evidenció una inhibición del $42\% \pm 3$ mientras que en presencia de A23187 (ionóforo de calcio) se estimuló la producción de PGE_2 en $65\% \pm 5$. Estos resultados demuestran la capacidad de la pilocarpina de unirse a los receptores muscarínicos colinérgicos del subtipo M_1 y M_3 activando la transducción de señales y de segundos mensajeros vinculados a la producción de PGE_2 - Ca^{++} dependiente.

692. (776) INVOLUCRAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK) EN EL FENÓMENO DE UP-REGULATION DEL RECEPTOR B1 A CININAS EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH)

Kilstein Y.; Nowak W.; Errasti A.; Santín-Velazque N.; Armesto A.; Rothlin R.

Tercera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si las vías de señalización MAPK están involucradas en el proceso de *up-regulation* del receptor B_1 en VUH. Anillos de VUH se incubaron en solución de Krebs a 37°C, pH 7.4 y tratados continuamente con distintas dosis de SP600125 (SP, inhibidor de JNK), SB203580 (SB, inhibidor de p38), PD98059 (PD, inhibidor de ERK1/2) ó BIX02188 (BIX, inhibidor de ERK5). Tras 5h de incubación, se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a DAKD, agonista del receptor B_1 . Al fin de cada CCR se adicionó 5-HT $10 \mu M$ para obtener el efecto contráctil máximo. A la vez, se realizaron ensayos de *Real Time PCR*, utilizando anillos de VUH incubados durante 0h o 5h, los últimos en ausencia y presencia continua de SB30 μM . **Resultados:** SB10 μM , produce un corrimiento de la CCR a la derecha sin disminuir el efecto máximo a DAKD (E_{max}) como sí lo hace con 30 μM (% de respuesta a 5-HT control: $85.95 \pm 0.79\%$; SB: $64.21 \pm 4.56\%$; $p<0.05$). Mientras que SP1 μM no modifica la CCR, con 3 μM produce un corrimiento de la CCR a la derecha sin disminuir el E_{max} como sí lo hace con 10 μM (control: $85.95 \pm 0.79\%$; SP: $54.55 \pm 2.60\%$; $p<0.05$). PD10 μM no modifica la CCR, mientras que con 30 μM , produce una disminución del E_{max} (control: $85.96 \pm 0.79\%$; PD: 75.21 ± 2.94 ; $p<0.05$). BIX1 μM no produce modificaciones de la CCR a DAKD, mientras que con 10 μM produce un corrimiento a la derecha (pCE_{50} control: 8.96 ± 0.02 , BIX: 8.17 ± 0.06 , $p<0.05$). No se observa nunca disminución de la respuesta máxima a 5-HT. Los ensayos de qPCR incubando los anillos con SB30 μM durante 5h, indican una disminución en la cantidad relativa de ARNm (RQ) del receptor B_1 (RQ 0h: 1, $n=5$; 5h: 14.32, $n=5$; SB: 3.01, $n=2$; $p<0.05$). Los resultados funcionales indican que las 4 vías de MAPK participan en el proceso de *up-regulation* del receptor B_1 . El efecto del inhibidor de p38 sobre la síntesis de ARNm tras 5h es compatible con su efecto sobre la respuesta funcional y refuerza la participación de p38 en el *up-regulation* del receptor B_1 .

FARMACOEPIDEMIOLÓGIA 3

693. (283) LESIONES ORALES PRODUCIDAS POR FARMACOS NOTIFICADAS EN EL NODO REGIONAL DE FARMACOVIGILANCIA DEL NEA

Rocha M.; Dos Santos L.; Hartman I.; Morales S.; Horna M.; Christiani J.

Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste.

Los fármacos, además de efecto terapéutico pueden producir Reacciones Adversas a los Medicamentos (RAM) afectando a diversos órganos. Objetivo: Identificar y valorar las lesiones orales asociadas al uso de medicamentos. Se analizaron las notificaciones del Centro Regional de Farmacovigilancia UNNE y seleccionaron las RAM que produjeron reacciones orales (RO) clasificadas como moderadas, graves y fatales. Las notificaciones fueron analizadas por Clínica y Diagnóstico de las Reacciones Adversas de Laporte y Capella y de acuerdo al Diccionario de RAM de la OMS donde clasifican según gravedad (leve, moderada, grave y fatal), órganos y tejidos afectados y relación causa-efecto (imputabilidad). Del total de 186 RO: 81 leves, 84 moderadas, 18 graves (*edema labial* asociado a reacción anafiláctica y Síndrome de Stevens Johnson) y 2 fatales (*ulceras orales* asociadas a Stevens Johnson por lamotrigina y leflunomida). Según imputabilidad: 79 probables y 26 probadas. Se hallaron lesiones en **tejidos duros**: *pigmentación dentaria* 2 (hierro fumarato y enalapril), y en **tejidos blandos**: *edema labial* 42 (betalactámicos 13 y otros antibióticos 5; dipirona 7, ácido acetilsalicílico -AAS- 5, diclofenac 4; otros fármacos 8). *Hiperplasia gingival* 18 (fenitoína 7, nifedipina 3, amlodipina 3; ciclosporina 2; loxoprofeno 2). *Gingivorragia* 6 (loxoprofeno 2; etinilestradiol+levonorgestrel; clotrimoxazol; levofloxacina; vacuna fiebre amarilla 1 de cada una). *Ulceración de la mucosa oral* 5 (leflunomida; lamotrigina, fenitoína, venlafaxina, y metotrexato 1 de cada una). *Candidiasis* 5 (beclometasona 2; cefuroxima; eritromicina y azatioprima 1 de cada una). *Lesión necrótica en reborde alveolar* 2 (ibuprofeno y AAS). *Otras lesiones* (25). Se han detectado un número considerable de RAM orales, a predominio de moderadas, graves y fatales a las que el odontólogo debe estar alerta y capacitado para su detección precoz. Proyecto acreditado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica-UNNE. PI: I-006-2010.

694. (341) FARMACOVIGILANCIA: REVISION DE 3704 NOTIFICACIONES Y ANALISIS DE SUS CARACTERISTICAS

Keller G.; Ponte M.; Diez R.; Girolamo G.

Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: En Argentina, la Red Nacional de Farmacovigilancia está centrada en ANMAT, y nodos periféricos. Nuestro nodo, replanteó su actividad en 2004, con un enfoque proactivo desde 2006, además del registro de notificaciones espontáneas. Métodos: Las notificaciones son incorporadas a una base de datos (SQL), y se envían a ANMAT. Describimos aquí las notificaciones recibidas (demografía y tipos de eventos notificados; reacciones adversas, falta de eficacia o falla de calidad) y el resultado de la intervención analítica del INAME, cuando la misma fue requerida. Resultados: De 2004 a 2013 se recibieron 3704 notificaciones de 3527 reacciones adversas, 149 casos de falta de eficacia y 28 fallas de calidad. La mayoría (98%) fueron obtenidas por el enfoque proactivo. De las reacciones adversas, 692 (20%) fueron serios (548 causaron internación, 98 la prolongaron, 41 peligro de vida, 1 discapacidad persistente y 4 muertes), siendo en cuanto a la severidad: 74% leves, 8% moderados y 18% severas. Las notificaciones recibidas se generaron conductas como cambio de fármaco (6%), marca comercial (1%), o dosis (7%), realización de estudios complementarios (75%), internación (17%), u tratamiento específico de un evento generado (52%). Entre las reacciones adversas fueron causadas predominantemente por fármacos antimicrobianos (29%), cardiovasculares (23%), neurológicos (15%), hormonales (9%), antineoplásicos (8%), y analgésicos (6%). Los problemas de eficacia/calidad estuvieron relacionados predominantemente a fármacos cardiovasculares

(17%), neurológicos (28%), antimicrobianos (20%), analgésicos (11%), y antineoplásicos (10%). Las muestras de notificaciones de problemas de calidad/eficacia fueron analizadas por INAME con resultado de "cumple con las especificaciones". Discusión: Los eventos adversos son una importante causa de morbimortalidad, se encuentran asociados al uso de fármacos frecuentemente prescritos y generan grandes costos para el sistema de salud.

FARMACOLOGÍA MOLECULAR 3

695. (136) LA LACTONA SESQUITERPENICA DESHIDROLEUCODINA, DESENCADENA SENESCENCIA Y APOPTOSIS EN LA MISMA CÉLULA

López L.; Costantino V.; Fernandez D.

Instituto de Histología y Embriología Mendoza. "Dr. Mario H. Burgos" (IHEM)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

Deshidroleucodina (DhL) es una lactona sesquiterpénica del grupo de los guainolíidos que promueve la acumulación de marcadores de daño al DNA en células HeLa y desencadena el ingreso de las células al estado de senescencia o apoptosis según la concentración de DhL utilizada. Nos preguntamos si DhL puede producir en la misma célula senescencia y luego apoptosis. Células HeLa se trataron con 20 μ M DhL (concentración que genera senescencia) y posteriormente con 30 μ M DhL (concentración que produce apoptosis). Se analizaron en la misma célula la presencia de signos de senescencia y apoptosis. Actividad de la enzima SA-beta-Gal con el sustrato X-Gal (indica senescencia) y reacción de Anexina V-FITC (indica apoptosis). Los experimentos se repitieron 3 veces y los resultados, media \pm SE, se compararon por análisis de la varianza. Las células incubadas con DMSO (vehículo) por 48 y 72 h, presentaron senescencia en el 20 ± 2 y $21 \pm 3\%$ respectivamente y apoptosis en el $4 \pm 0,2$ y $3 \pm 0,5\%$ respectivamente. El porcentaje de células que presentaron los dos marcadores fue de $0,1 \pm 0,01$ (a) (48 h) y $0,05 \pm 0,06$ (b) (72 h). 20 μ M DhL por 48 y 72 h produjo senescencia en el 45 ± 5 y $55 \pm 4\%$ de las células respectivamente y apoptosis en el 4 ± 1 y $6 \pm 2\%$ de las células respectivamente. Se observó que el $0,2 \pm 0,1$ (c) (48 h) y el $0,1 \pm 0,3$ (d) (72 h)% de las células presentaban los dos marcadores (para senescencia y apoptosis). El tratamiento con 30 μ M DhL por 24 h a células que habían sido incubadas previamente con 20 μ M DhL por 48 horas, produjo apoptosis en el $83 \pm 6\%$ de las células. Se determinó que el 42 ± 2 (e)% de las células en apoptosis presentaron la marcación para senescencia. Análisis estadístico entre los grupos: Sin diferencia significativa entre (a) vs (c) y (b) vs (d). Diferencia significativa de (c) vs (e) $p \leq 0,001$. Se interpreta que DhL desencadena senescencia y luego apoptosis en la misma célula.

696. (530) ADMINISTRACIÓN ORAL DE IVERMECTINA A OVINOS: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GLICOPROTEÍNA-P EN TEJIDOS DEL HUÉSPED Y EN EL NEMATODE HAEMONCHUS CONTORTUS

Ballent M.; Maté L.; Virkel G.; Alvarez L.; Lanusse C.; Lifschitz A.

Laboratorio de Farmacología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)- CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Ivermectina (IVM) es un fármaco antihelmíntico ampliamente utilizado en animales de producción para el tratamiento de endo y ectoparásitos. La aparición de resistencia a esta droga ha llevado a la búsqueda de estrategias farmacológicas que permitan optimizar su eficacia terapéutica. La glicoproteína-P (gp-P) es una proteína de flujo perteneciente a la familia de transportadores celulares del tipo ABC. La interacción entre la gp-P e IVM fue demostrada en diferentes especies animales y el hombre. Por otro lado, la sobreexpresión de este transportador celular en parásitos gastrointestinales que afectan a especies ruminantes ha sido descrita como uno de los principales mecanismos de resistencia parasitaria. El

objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de la gp-P en tejidos gastrointestinales de ovinos controles y tratados con IVM (0,2 y 2mg/kg), así como en especímenes del nematodo *Haemonchus contortus* recuperados de estos animales. Los animales se sacrificaron 14 días post-tratamiento, y se colectaron muestras de hígado, intestino y parásitos. La cuantificación de la expresión genética de gp-P se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR), utilizando tres genes de referencia. El tratamiento con IVM no modificó significativamente la expresión genética de gp-P en ninguno de los grupos tratados, y tampoco en los parásitos analizados. Estos resultados preliminares sugieren que IVM no produciría un aumento en la expresión genética de gp-P que persista durante 14 días post-tratamiento, tanto para la dosis establecida como tras la administración de una dosis 10 veces superior a la terapéutica.

697. (594) EFECTO DEL BENZNIDAZOL (BZL) SOBRE LOS NIVELES DE GLUTATION EN LA LÍNEA CELULAR HE-PÁTICA HEPG2

Perdomo V.; Rigalli J.; Ciriaci N.; Villanueva S.; Ruiz M.; Catania V.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

La relación entre el nivel de glutatión oxidado (GSSG) y el nivel de glutatión total (GSHt) es utilizada como una medida de estrés oxidativo. El BZL es la única droga disponible para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Se ha informado que la nitrorreducción que sufre BZL en células de mamíferos puede generar estrés oxidativo. En trabajos previos, observamos que BZL aumentaba la expresión y actividad de la proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2, encargada del flujo de glutatión oxidado y reducido, y de aniones orgánicos conjugados con glutatión) en células HepG2 y en hígado de rata. OBJETIVO: evaluar el efecto de BZL sobre los niveles intracelulares y extracelulares de glutatión como medida de estrés oxidativo en células HepG2. METODOLOGÍA: células HepG2 fueron tratadas con BZL (50; 100 y 200 μ M, 48 hs) o vehículo (controles, C). Como control positivo de estrés oxidativo las células fueron tratadas con t-butil hidroperóxido (t-BOOH, 500 μ M, 15 min). RESULTADOS: la relación intracelular GSSG/GSHt ($n=3$, $p<0.05$) aumentó en células tratadas con BZL (200 μ M) en comparación con células controles (0.201 ± 0.024 vs 0.124 ± 0.006 .) en una magnitud similar a la observada en t-BOOH (0.222 ± 0.004) indicando estrés oxidativo. La relación calculada en el medio extracelular (medio de cultivo) fue mayor para BZL (0.417 ± 0.060 vs C: 0.300 ± 0.032 y t-BOOH: 0.227 ± 0.030 ; $n=3$, $p<0.05$) sugiriendo un mecanismo adicional o exacerbado en la excreción de GSSG. La actividad de glutatión reductasa no difirió entre grupos. Análisis estadístico: ANOVA, post test de Newman-Keuls. CONCLUSIÓN: a pesar de que BZL genera estrés oxidativo, la inducción de MRP2 podría ser responsable del aumento de GSSG en el extracelular (efecto que no se observa en el grupo t-BOOH) y podría atenuar los efectos deletéreos del desbalance redox intracelular.

698. (615) LA EXPOSICIÓN PRENATAL A ANFETAMINA AFECTA LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES D2 EN NÚCLEO ACCUMBENS Y LAS RESPUESTAS CONDUCTUALES AL PSICOESTIMULANTE EN LA EDAD ADULTA: DIFERENCIAS SEXUALES

Pennacchio G.¹; Dinasso E.¹; Valdez S.^{1,2}; Soaje M.^{1,3}; Bregonzio C.⁴

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza¹; ICB, Universidad Nacional de Cuyo²; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza³; Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC)-CONICET, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba⁴.

Numerosas evidencias muestran que la adicción puede ser considerada como un desorden del desarrollo, por lo que es importante el estudio de las consecuencias en la edad adulta de la exposición prenatal a drogas de abuso. Nuestro objetivo fue evaluar si la exposición a anfetamina, durante el desarrollo, induce cambios en las respuestas al psicoestimulante en la edad adulta de igual manera en machos y hembras. Para ello se usaron ratas hembras Wistar, las cuales fueron tratadas con anfetamina 2.5 mg/kg ip del día 15 al 21 de preñez. Se controló peso de las madres durante el tratamiento y de las crías al nacer. Una vez cumplidos los dos meses de edad los machos y las hembras (estro) recibieron anfetamina 0.5 mg/kg ip y se registró la actividad locomotora y la actividad vertical en un optovarimex por 60 minutos. En otro grupo de animales tratados de igual manera, se extrajeron los cerebros y se cuantificó el ARNm para el receptor dopaminérgico D2 estrechamente ligado con las respuestas neuroadaptativas a drogas de abuso. Los datos obtenidos mostraron una clara diferencia entre ambos sexos. Por un lado, los machos tratados prenatalmente con anfetamina mostraron un aumento en la actividad locomotora y en la actividad vertical con respecto a los controles que recibieron salina intra-útero. Las hembras analizadas durante el estro mostraron una respuesta opuesta tanto en la actividad locomotora como en la actividad vertical. Cuando se analizó por RT-PCR el receptor D2 en núcleo accumbens (Nac) y cuerpo estriado (CE), las hembras expuestas a anfetamina prenatal mostraron un aumento significativo en los valores de ARNm de este receptor en Nac. Mientras que los machos no presentaron ninguna diferencia en las áreas analizadas. Concluimos, que la experiencia prenatal con anfetamina produce un efecto a largo plazo tanto en hembras como en machos y que el ambiente hormonal estaría mediando las diferencias neuroadaptativas.

FARMACOLOGÍA CLÍNICA 3

699. (39) COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE SUJECCIÓN QUÍMICA, PROPOFOL Y DEXMEDETOMIDINA, PARA LA REALIZACIÓN DE ELECTRORETINOGRAFÍAS EN CANINOS

Del Sole M.¹; Nejamkin P.¹; Sande P.²

Laboratorio de Farmacología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)- CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires y Hospital Escuela Pequeños Animales, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires¹; Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

La electroretinografía (ERG) es un estudio de rutina en la oftalmología veterinaria. Requiere de la inmovilización de los animales y los ojos centrados por un tiempo aproximado de 10 min. Las drogas utilizadas para tal fin pueden afectar el registro electroretinográfico y poner en riesgo la vida del paciente. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de diferentes drogas sedativas y anestésicas sobre un protocolo corto de ERG. Para ello se utilizaron 4 perras mestizas castradas ingresadas al Hospital Escuela de Pequeños Animales (FCV-UNCPBA) para su esterilización. Siguiendo un diseño cruzado se registraron y analizaron las latencias y amplitudes de las ondas a y b de los ERG (fotópico, escotópico y mixto) bajo dos protocolos de sujeción química, propofol y dexmedetomidina. La latencia de la onda a y la amplitud de la onda b fueron menores en los ERG escotópicos y mixtos de los animales tratados con propofol en comparación con los tratados con dexmedetomidina ($p < 0,05$). Se concluye que el uso de la dexmedetomidina es una alternativa válida para la realización de ERG en caninos debido a que la menor depresión neuronal que provoca conlleva a amplitudes electroretinográficas mayores que facilitarían la comparación entre tratamientos y a una mayor seguridad de trabajo con un menor riesgo de vida del paciente.

700. (179) EFECTO DEL RALOXIFENO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO: ROL DEL CALCIO EXTRACELULAR

Dorrnsoro A.^{1,3}; Rauschemberger M.^{1,2}; Massheimer V.^{1,2}
Cátedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; CIC³.

El raloxifeno (Rx), es un fármaco perteneciente al grupo de los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (RE) empleado en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Las enfermedades cardiovasculares en general, y la calcificación vascular (CaV) en particular representan situaciones clínicas prevalentes en la menopausia. El óxido nítrico (NO) endotelial inhibe la CaV. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del Rx sobre la producción de NO, y la influencia del calcio extracelular (Ca_{ex}) en la acción del fármaco. Se emplearon anillos de aorta (RAS) aislados de ratas Wistar hembras, incubados in vitro con Rx en buffer salino. Se midió la producción de NO por el método de Griess. Primero se caracterizó el sistema experimental. En un entorno procalcificante (elevado Ca_{ex}) observamos un notorio descenso de la producción de NO basal respecto a condiciones fisiológicas (1 mM Ca_{ex}) (0,69±0,10; 0,96±0,19; 1,35±0,27 vs 2,55±0,51 nmol NO/mg prot.; 2, 4 y 5 vs 1 mM Ca). La estimulación de NO inducida por el agonista vascular natural, acetilcolina, se anula en presencia de elevado Ca_{ex} (58% vs 2-4% s/c, 1 vs 2-5mM Ca s/c, p< 0.01). En RAS incubados 15 min con Rx 1nM, la producción de NO se incrementó en un 72% (p<0.05), efecto que disminuye significativamente (36% s/c) en un medio 4mM Ca_{ex} . Resultados similares se obtuvieron al emplear una concentración mayor de Rx (10nM) y 30 min de tratamiento. La inhibición por calcio afectó también al incremento en NO inducido por estrona (E1), agonista endógeno del receptor de estrógenos (ER) (80 vs 39% s/c, 1 vs 4 mM Ca_{ex}). La supresión del estímulo en NO por el compuesto IC1182780, antagonista del RE, corroboró la participación del RE en el mecanismo de acción de Rx. Los resultados sugieren que, el impacto positivo del Rx sobre el sistema vascular promoviendo la síntesis del principal vasoactivo, se ve afectado por condiciones de stress vascular predominantes en lesiones vasculares avanzadas (CaV).

701. (253) INDICADORES PARA CUANTIFICAR MEJOR LA CAPACIDAD ARRITMOGÉNICA DE LAS DROGAS

Serra H.¹; Estrin M.²; Matorra L.³; Ponte M.⁴
Cátedra de Farmacología, Medicina, Universidad Católica Argentina¹; 1Ra Cátedra De Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; Dirección Médica, Química Montpellier SA³; Hospital General de Agudos "Dr. Cosme Argerich", Buenos Aires⁴.

Ciertas drogas se vinculan con la producción de arritmias ventriculares serias (torcida de punta, fibrilación ventricular). La prolongación del intervalo QT corregido (QTc) reflejaría esta capacidad. Sin embargo, el QTc largo no indica si se producirá la arritmia o cual será su tipo. Durante el QTc se producen varios fenómenos además de la repolarización ventricular y solo su final coincide con el periodo refractario relativo (PRR), única zona capaz de responder a estímulos generadores de arritmias. Así, este trabajo comparó posibles indicadores que señalasen mejor la potencialidad arritmogénica de las drogas. Sobre ECG de pacientes control o que recibieron drogas arritmogénicas vistos en el Servicio de Clínica Médica del Hospital Argerich durante el año pasado se analizaron 3 posibles indicadores centrados en la onda T, subrogante del PRR: la diferencia entre tiempos pico y final (Tp-Te), su pendiente de normalización (k) y la mitad final de su área bajo la curva (AUCT). Para ello, por cada registro se tomaron 2 ondas T consecutivas de la derivación II. El uso de datos fue autorizado por el Comité de FVG del hospital. Los registros se hicieron con un ECG TEMIS® y su análisis por los software EasyG® y Excel 2010®. Como elemento de decisión sobre cual indicador era mejor se usó el CV%. Los CV% para los grupos, control (n=3), metoclopramida-otras (n=3), amiodarona-carvedilol (n=2) fueron

respectivamente: Tp-Te (s) 6; 18, y 6%; k (mV/s) 12; 20 y 7%, y AUCT (mV*s) 38; 62 y 10%. De los 3 indicadores Tp-Te es el mejor, AUCT no se considera por ser muy variable y k requiere más análisis (el mayor CV% podría deberse a la inclusión del voltaje en su cálculo). No obstante, a diferencia del QTc que solo se alargó con amiodarona-carvedilol (no mostrado), los valores de Tp-Te y k parecen mostrar sutiles variaciones entre distintas drogas proarrítmicas; diferencias que han disparado un estudio de FVG (en curso) a fin de comprobarlas o descartarlas.

702. (743) INFLUENCIA DEL AYUNO EN LA DISTRIBUCIÓN BIOLÓGICA DEL RADIOFÁRMACO 99mTc-SESTAMIBI EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. CORRELACIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE IMÁGENES EN CÁMARA GAMMA

Leonardi N.; Portillo M.; Tesán F.; Salgueiro M.; Zubillaga M.
Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica- Universidad de Buenos Aires.

Objetivo: Evaluar la influencia del ayuno en la puesta a punto de una metodología que permita determinar la distribución biológica del ^{99m}Tc-Sestamibi en animales de experimentación. Comparar los resultados obtenidos mediante disección e imágenes bajo cámara gamma. Materiales y métodos: 7 ratas Sprague Dawley de 200 y 250 g fueron divididas en 2 grupos A (3 horas de ayuno previo n=3) y B (12 horas de ayuno previo n=4). Una formulación comercial de Sestamibi se marcó con ^{99m}Tc según lineamientos del proveedor. Se efectuó el control de calidad según lineamientos de USP y partición con solvente. Se administraron 900-950 µCi de radiofármaco por vía endovenosa a cada animal. Luego de 3 horas de biodistribución (BD) se sacrificaron los animales y se efectuaron adquisiciones estáticas bajo cámara gamma (CG). Se efectuó la disección de corazón; hígado, intestinos y estómago (TGI). Los resultados se expresaron como % de actividad inyectada (%AI). Se calcularon las relaciones corazón/hígado y corazón/TGI, para cada grupo y metodología empleada. Resultados: Los resultados obtenidos en la BD no muestran diferencias significativas en la captación del corazón en función del tiempo de ayuno (A: 1.19±0.24%, B: 1.11±0.05%). Los valores obtenidos mediante CG fueron de A: 2.24±0.25%, B: 1.53±0.27%. Las relaciones corazón/hígado obtenidas de la disección, fueron para el grupo A 0.89±0.14%, y para el B 0.51±0.07%. Los resultados de la disección fueron para el grupo A 0.05±0.00% y para el B 0.04±0.00%. Para CG fueron 0.06±0.01% para el grupo A, y 0.03±0.01% para el grupo B. No se observaron diferencias en la relaciones corazón/TGI en ambos tiempos de ayuno evaluados, así como tampoco entre métodos. Conclusión: Los resultados indicarían que, variaciones en los tiempos de ayuno aplicados al protocolo de BD de ^{99m}Tc-Sestamibi en animales de experimentación, modifican los parámetros de captación en los estudios de BD en animales de experimentación.

703. (778) 99mTc-MACROAGREGADOS DE ALBÚMINA. ¿QUÉ TAN CRÍTICO ES EL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS?

Costa J.¹; Tesan F.²; Leonardi N.²; Portillo M.²; Zubillaga M.²; Salgueiro M.²
I y D Laboratorios BACON SAIC¹; Laboratorio de Radioisótopos, Catedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Los ^{99m}Tc-macroagregados de albúmina (^{99m}Tc-MAA) se utilizan para estudios de perfusión pulmonar por lo cual la importancia del tamaño de partícula para la obtención de imágenes diagnósticas claramente interpretables es esencial, así como para la seguridad del paciente. En este sentido, la aplicación de técnicas orientativas (filtración o centrifugación) para la estimación del tamaño de partícula obtenido durante la elaboración de los ^{99m}Tc-MAA puede brindar información útil para predecir la calidad de la imagen con la cual se realizará el diagnóstico. Los ^{99m}Tc-MAA fueron marcados según protocolo estándar y controlados por metodología y especificaciones descriptas en USP para tamaño de partícula, pureza radioquímica y distribución biológica. Adicionalmente se adquirieron imágenes estáticas en

cámara gamma de la perfusión pulmonar de ratones, previo a su disección. Los resultados muestran que la presencia de impurezas radiactivas dispersas ($\approx 15\%$ vs. Límite USP 10%) con tamaños de partícula menores a 10 mm redunda en el aumento de la captación hepática ($> 5\%$ vs. Límite USP 5%) y en la disminución de la captación pulmonar ($\approx 70\%$ vs. Límite USP 80%) cuando ésta es evaluada por disección. Sin embargo la imagen aún conserva calidad diagnóstica sin interferencia en el contraste cuando estos valores se encuentran por fuera de estos límites en grado variable. El análisis de los resultados muestra una zona gris de aceptación de la calidad de la suspensión de ^{99m}Tc -MAA en relación a su eficacia diagnóstica cuando ésta es evaluada mediante imágenes. La migración de las técnicas de disección para evaluar la biodistribución de radiofármacos particulados y de nano-radiofármacos requerirá la revisión de los límites de aceptación en un el marco de un nuevo paradigma en los ensayos biológicos.

704. (849) ESTATINAS Y SU EFECTO SOBRE LA DISFUNCIÓN MIOCARDICA ASOCIADA A SEPSIS

Incahuanaco L.¹; Oleynick A.²; Angeloro P.²; Rodríguez J.¹; Flores K.¹; Sánchez A.¹; Pacheco J.¹
Universidad Adventista del Plata¹; Sanatorio Adventista del Plata².

La sepsis y el shock séptico representan una de las causas de mayor mortalidad en la Terapia Intensiva. La incidencia de sepsis y el número de muertes relacionadas con sepsis ha ido aumentando un 8,7% cada año desde 1979 hasta recientemente. La disfunción miocárdica asociada a sepsis (DMAS) está asociada a una peor evolución con elevada mortalidad. Recientemente, las estatinas han sido propuestas como adyuvante en el tratamiento de la sepsis por sus efectos pleiotrópicos. Sin embargo, son escasos los estudios prospectivos que evalúen el uso de estatinas y la disfunción miocárdica. Propusimos a evaluar la eficacia del uso previo de estatinas para reducir la gravedad de la sepsis y la mortalidad a 30 días en pacientes sépticos internados en UTI. Estudio prospectivo de tipo cohorte efectuado en el Sanatorio Adventista del Plata, de abril del 2012 y sigue en curso. Una vez identificado al paciente y obtenido el consentimiento, se determinaron los siguientes datos: información clínica y demográfica, sitio de infección, determinación de la severidad de la sepsis, score de APACHE II y SOFA, comorbilidades medidas por el índice de Charlson, medicación habitual, índice de masa corporal, análisis de laboratorio, electrocardiograma y ecocardiograma. Los 14 días siguientes el paciente tuvo un seguimiento en los días 1, 3, 5, 10, 14, y un llamado a los 30 días al alta. 38 pacientes ingresaron al estudio, 28 hombres (73,7%), 10 mujeres (26,3%), de los cuales 5 consumían estatinas, siendo 4 Atorvastatina y 1 Simvastatina. Foco primario de infección: urinario 4 (10,5%), respiratorio 18 (47,7%), abdominal 6 (15,8%) y otros 10 (26,4%). Gravedad: sepsis 25 (65,8%), sepsis severa 2 (5,3%), shock séptico 11 (28,9%). La sobrevida a los 30 días demostró: 34 pacientes vivos (89,5%), 4 pacientes muertos (10,5%). Los resultados obtenidos hasta el momento no permiten detectar diferencias en la sobrevida entre ambos grupos lo que puede ser aclarado en la continuación de este estudio.

FARMACOTERAPÉUTICA 3

705. (157) POLÍMERO CATIONICO PROPICIA ACCIÓN BACTERICIDA DE VANCOMICINA FRENTE A PSEUDOMONA AERUGINOSA

Rosset C.; Manzo R.; Alovero F.
Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba.

Vancomicina (VAN) es un glicopéptido activo frente a bacterias Gram-positivas. Ejerce acción bactericida tiempo-dependiente inhibiendo la 2 etapa de síntesis de peptidoglicano. Las Gram-negativas son intrínsecamente resistentes a VAN por limitaciones

para atravesar la membrana externa. Eudragit E100 (Eu) es un polímero catiónico utilizado en I+D de sistemas portadores de fármacos. Resultados previos demuestran que Eu altera la superficie y potencial de membrana bacterianas, potenciando la acción de Fluoroquinolonas. El efecto de dispersiones de Eu en la acción de VAN se evaluó frente a Gram-positivos y -negativos. A dispersiones acuosas de Eu parcialmente neutralizadas con HCl (EuCl) se les incorporó VAN (EuCl-VAN). Se evaluó la cinética de muerte de VAN contenida en EuCl-VAN frente a *Pseudomonas aeruginosa* FQ-R1 y *Staphylococcus aureus* (MRSA 61). Simultáneamente se determinó la cinética bactericida de VAN y EuCl. EuCl-VAN exhibe acción bactericida concentración y tiempo dependientes frente a *P.aeruginosa* FQ-R1. Desde el inicio se observan >3 log reducción del inóculo expuesto a las menores concentraciones evaluadas y erradicación a 24 hs. EuCl-VAN (2048/1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erradica desde 1 h. VAN exhibió ligera disminución inicial en el recuento de *P.aeruginosa* FQ-R1, sin acción bactericida y recuperándose luego de 24 hs, independientemente de la concentración. EuCl-VAN erradica a MRSA 61 en las concentraciones evaluadas a 24 hs, mientras VAN requiere mayor concentración. Ambos aislamientos expuestos a EuCl exhibieron ligera injuria inicial con recuperación posterior. Por lo expuesto, las dispersiones EuCl-VAN son bactericidas frente al Gram-negativo, mientras VAN resulta inactivo. La acción del polímero también potencia la eficacia de VAN frente al Gram-positivo. Esto contribuye al desarrollo de un sistema polímero-fármaco con mayor espectro de acción de VAN que podría utilizarse para administración tópica en infecciones oftalmológicas, entre otras.

706. (274) TRATAMIENTO PARA EL ESPECTRO AUTISTA: DISEÑO Y DESARROLLO DE EMULSIONES NUTRICÉUTICAS TRANSPORTADORAS DE RISPERIDONA

Igartúa D.^{1,2}; Prieto M.^{1,2}; Chiaramoni N.^{1,2}; Del Valle Alonso S.^{1,2}

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes¹; Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)- CONICET².

Los trastornos del espectro autista constituyen un grupo de alteraciones del neurodesarrollo que afectan de manera global distintas funciones cerebrales y poseen una prevalencia de 1 cada 150 niños. Como no existe hoy día ningún tratamiento curativo, se realizan intervenciones comportamentales, farmacológicas y dietarias que buscan reducir los síntomas y mejorar la calidad de vida. La risperidona (RISP), el antipsicótico atípico más ampliamente administrado, es una molécula hidrofóbica que presenta baja biodisponibilidad luego de su administración oral y tiene muchos efectos secundarios causados por el metabolismo hepático donde las enzimas CYP la convierten en 9OH-RISP. Los más relevantes son ganancia de peso, hiperprolactinemia y taquicardia. Se ha observado que la co-administración con los ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$ y $\omega 6$ inhibe la reacción metabólica por lo cual produce un efecto sinérgico de las drogas y aumenta su quimiopreservación. Adicionalmente, se ha demostrado que las emulsiones aceite/agua (O/W) incrementan la absorción gastrointestinal de los fármacos lipofílicos administrados por vía oral, los protegen del stress ambiental y reducen su toxicidad. El objetivo de este trabajo es obtener un sistema utilizando compuestos no tóxicos que pueda incorporarse fácilmente a protocolos clínicos, basado en emulsiones O/W enriquecidas en $\omega 3$ y $\omega 6$ capaces de encapsular RISP, para mejorar la biodisponibilidad y reducir los efectos secundarios. Se obtuvieron tres formulaciones que difieren en la relación aceite: surfactante. Utilizando light scattering y microscopía óptica se observó que tienen tamaños menores a 4 μm y son estables en el tiempo. Con la sonda MC450 se determinó que el factor de hidrofobicidad varía con la concentración de surfactante. Además, se evaluó la eficiencia de encapsulación y cinética de liberación así como la toxicidad en células Caco-2. Por último, se estudió toxicidad y teratogénesis en el modelo animal peces cebra.

707. (505) SUJECIÓN FARMACOLÓGICA DE ZARIGÜEYAS (DIDELPHIS ALBIVENTRIS) EN AMBIENTES SILVESTRES

Waxman S.¹; Orozco M.²; Argibay H.²; Rebuelto M.¹; Brynkier J.¹; Otero P.¹

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Eco-Epidemiología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

Múltiples situaciones requieren la sujeción farmacológica de especies silvestres (programas de recuperación de fauna, de vigilancia epidemiológica, monitoreo sanitario en zoológicos, etc). Los protocolos deben proveer adecuada contención farmacológica y rápida inducción y recuperación. El objetivo de este estudio fue comparar dos protocolos de sujeción farmacológica con el fin de establecer posibles diferencias en los tiempos de recuperación. En el marco de un relevamiento de reservorios silvestres de enfermedades emergentes en Misiones, Argentina, 21 zarigüeyas (*Didelphis albiventris*) fueron capturadas utilizando trampas tipo Nacional e inmovilizadas farmacológicamente. Los animales se dividieron en 2 grupos (G1 y G2). Todos recibieron dexmedetomidina (150 µg/kg) y ketamina (15 mg/kg) vía intramuscular. Se midió el tiempo a la inducción, momento en el cual, al G2 se le administró, mediante máscara, isofluorano (3% por 5 min, luego 1,5%). Treinta minutos después de la administración de dexmedetomidina y ketamina, se interrumpió la administración de isofluorano al G2 y a ambos grupos se les administró atipamezol vía intramuscular (1,5 mg/kg). Se midieron los tiempos de recuperación como R1 y R2 (tiempo al cual exhibe movimientos y tiempo al cual es capaz de mantener la estación, luego de la administración de atipamezol, respectivamente). Se compararon los resultados de ambos grupos mediante un test no paramétrico (Mann Whitney). El tiempo de inducción no mostró diferencias significativas (G1=5,56 ± 2,5 min, G2=4,08 ± 2,06 min, media ± DE), mientras que R1 y R2 fueron significativamente mayores en G2 (7,75 ± 4,07 y 13,36 ± 6,79 min, respectivamente) que en G1 (2,15 ± 0,64 y 5,78 ± 1,92 min, respectivamente). Se concluye que el uso de isofluorano en este protocolo, si bien facilita la relajación y el manejo, prolonga la recuperación en esta especie. Este trabajo forma parte del proyecto UBACyT 20020120200165 y fue aprobado por el CICUAL FCV-UBA, protocolo 2012/36.

708. (662) EFECTO QUIMIOPROFILÁCTICO DE NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS CARGADAS CON ALBENDAZOL SOBRE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Pensel P.^{1,2}; Ullio Gamboa G.³; Allemandi D.³; Benoit J.⁴; Palma S.³; Elissondo M.^{1,2}

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar Del Plata, Argentina¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, (CONICET)²; Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. UNITEF³ Inserm U1066. Ingenierie De La Vectorisation Particulairre. Immeuble Ibt. Angers. Francia⁴.

Albendazol (ABZ) es el fármaco de elección para el tratamiento de la hidatidosis. Presenta limitaciones en su eficacia debido a la biodisponibilidad errática. Las nanocápsulas lipídicas (NCL) son sistemas particulados diseñados para la administración de fármacos por distintas vías, compuestos por lípidos biodegradables y biocompatibles capaces de incorporar tanto moléculas hidrofílicas como lipofílicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la eficacia quimioprolifáctica de NCL cargadas con ABZ (NCL-ABZ) en ratones infectados con *Echinococcus granulosus*. Ratones CF1 fueron infectados intraperitonealmente con 1500 protoesquistos/animal y separados en 8 grupos (n=10): Grupo control agua vía oral, Grupo NCL vacía vía oral, Grupo NCL vacía vía subcutánea, Grupo NCL vacía vía intraperitoneal, Grupo ABZ suspensión vía oral, Grupo NCL-ABZ vía oral, Grupo NCL-ABZ vía subcutánea y Grupo NCL-ABZ vía intraperitoneal. Los tratamientos se realizaron cada 24 hs durante 30 días con una dosis de 5 mg/kg. Seis meses post-infección, los animales fueron sacrificados registrándose el peso de los quistes. Los pesos fueron comparados utilizando los tests Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Las diferencias entre grupos fueron analizadas con el test Wilcoxon. Se tomaron muestras

para microscopio electrónico (ME). Se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y tratados. Se encontró diferencia significativa en los pesos de los quistes del grupo NCL-ABZ oral con respecto al grupo ABZ suspensión oral. El tipo de ruta de administración no influyó significativamente en la eficacia de la NCL-ABZ. Estudios al ME mostraron alteraciones en la capa germinativa de los grupos tratados. Los quistes extraídos de ratones tratados con NCL-ABZ presentaron mayor extensión de daño que los quistes del grupo ABZ suspensión. La eficacia quimioprolifáctica de las NCL-ABZ fue superior al ABZ suspensión. En futuros trabajos se realizarán estudios farmacocinéticos y de eficacia clínica.

709. (810) EFECTO DE DIVERSOS COPOLÍMEROS DE PEO-PPO ACTUALMENTE EMPLEADOS EN LA FORMULACIÓN DE DROGAS ANTIVIRALES Y ANTITUMORALES SOBRE LA MAPK ERK: POTENCIALES IMPLICANCIAS EN LA FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE LOS MISMOS

Cuestas M.^{1,2}; Gentile E.^{1,2}; Castillo A.^{1,2}; Gorostizaga A.^{2,3}; Delfino C.^{1,2}; Paz C.^{2,3}; Oubiña J.^{1,2}; Mathet V.^{1,2}

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, (IMPAM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³.

Introducción: La nanotecnología ofrece alternativas atractivas para optimizar numerosas drogas y superar un amplio espectro de desventajas (bio) farmacéuticas. Una actual estrategia es la encapsulación de drogas en micelas poliméricas. Los copolímeros segmentados de poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de propileno) (PPO) lineales (poloxámeros) o ramificados (poloxaminas) son considerados inertes y utilizados en la formulación de antivirales y antitumorales, aunque hay evidencias de que podrían afectar las células del organismo. Un posible efecto de estas moléculas podría involucrar a las MAPK, dado que éstas se activan en respuesta a la injuria celular. **Objetivo:** Estudiar el efecto de copolímeros de PEO-PPO sobre la activación de ERK. **Diseño del Estudio:** Células Huh7 se incubaron con los copolímeros T904, T304, T1107 y F127 (1%; 0,1% y 0,01%), analizándose su citotoxicidad a las 24 y 72 h. (ensayo MTS/PMS). Mediante *Western blot* se investigó la capacidad de los copolímeros para activar ERK (ERK-P), con las concentraciones más altas no citotóxicas. Se utilizó el test de ANOVA y el post-test de Bonferroni para el análisis estadístico (n=3). Los resultados fueron expresados como la media ± DS. **Resultados:** Con todos los copolímeros se evidenció -principalmente a los 10 min de estimulación- un incremento (p<0,05) en los niveles de ERK-P y un comportamiento bimodal. **Conclusiones:** Estos estudios sugieren la necesidad de evaluar exhaustivamente los efectos farmacogenómicos de los copolímeros en la formulación de drogas antivirales y antitumorales para optimizar los resultados clínicos y comprender los efectos farmacológicos y toxicológicos de las mismas al utilizarse dichos excipientes. La activación de ERK, posiblemente como mecanismo de defensa frente a la injuria por copolímeros, podría involucrar vías con potencial oncogénico. Se sugiere evaluar la regulación de los componentes de las vías de las MAPK en el contexto de los copolímeros.

710. (854) NUEVOS HIDROGELES BIOCOMPATIBLES, BASADOS EN COMPLEJOS POLIELECTROLITO-FÁRMACO, PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE CIPROFLOXACINO

García M.¹; Cuggino J.²; Alvarez Igarzabal C.²; Manzo R.¹; Jiménez Kairuz A.¹

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)-CONICET, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba².

Los biomateriales poliméricos, en particular los hidrogeles, se destacan por su amplio uso y aplicaciones farmacoterapéuticas. Se han obtenido complejos iónicos de Ciprofloxacino (CP) con un nuevo polielectrolito dendrítico aniónico (DP), derivado de amina de Behera, bajo la forma de hidrogeles. DP demostró ser no tóxico frente a cultivos celulares y no exhibió actividad antimicrobiana *per sé*, mientras sus complejos presentaron buena actividad¹. Los objetivos de este trabajo son la evaluación *in vitro* e *in vivo* de los hidrogeles basados en complejos (DP-CP) para aplicación tópica. Se prepararon complejos sólidos (DP^x-CP₂₅) por evaporación del solvente ("x" corresponde al grado de entrecruzamiento de DP y "25" a mol% de CP respecto al total de grupos ionizables de DP). Se obtuvieron hidrogeles (DP^x-CP₂₅)-Na₂₀ por dispersión de (DP^x-CP₂₅) en agua incorporando NaOH c.s.. Se evaluaron propiedades viscoelásticas, pH, liberación *in vitro* (celdas de Franz, medios receptores: agua, 0,9% de NaCl y buffer pH 6,8) e irritación dérmica aguda (IDA) según especificaciones ISO10993 y Res. MSN 288/90. Los hidrogeles presentaron pH entre 6,2 y 6,8 y predominantemente comportamiento elástico, que se incrementa con "x". Exhibieron liberación de CP lenta y sostenida en agua, aumentando significativamente en NaCl (3-5veces) promovida por intercambio iónico. Un comportamiento intermedio se observó en buffer pH=6,8. Sin embargo no se observaron diferencias significativas con "x" ($p>0,05$). Se comprobó ausencia de edema y eritema (IDA=0) demostrando la alta biocompatibilidad de los hidrogeles y DP podría clasificarse como no irritante. Se desarrollaron nuevos sistemas biocompatibles de liberación controlada basados en complejos (DP^x-CP₂₅) con potencial utilidad farmacoterapéutica en infecciones tóxicas oportunistas comunes.

TOXICOLOGÍA 3

711. (144) LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BAJAS DOSIS DE BISFENOL A ALTERA LA SÍNTESIS Y/O FORMACIÓN DE LOS GLOBULOS GRASOS DURANTE LA LACTANCIA EN RATAS WISTAR

Altamirano G.; Gómez A.; Delconte M.; Luque E.; Muñoz-De-Toro M.; Kass L.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Previamente demostramos que la exposición perinatal a bajas dosis de Bisfenol A (BPA) altera la diferenciación funcional de la glándula mamaria (GM) y el contenido proteico de la leche. Considerando que uno de los principales componentes de la leche son los lípidos que forman parte de los glóbulos grasos, nuestro objetivo fue estudiar si la exposición perinatal a BPA perturba la síntesis de novo de triglicéridos (TG) en la GM y/o la formación del glóbulo graso durante la lactancia. Ratas Wistar preñadas (F0) fueron expuestas a través del agua de bebida a BPA (0.5 o 50 ug/kg/día) o vehículo (0.001% etanol) desde el día 9 de gestación hasta el destete. Las crías hembras (F1) fueron preñadas y se obtuvieron muestras de GM en los días 2 y 10 de lactancia (DL2 y DL10). Utilizando RT-PCR en tiempo real se analizó la expresión de los ARNm de las de proteínas asociadas a la membrana del glóbulo graso: Adipofilina (ADPF), Xantina-Oxidoreductasa (XOR) y Butirofilina (BTN); y de las enzimas limitantes de reacción en la síntesis de TG: Acetil CoA Carboxilasa α , Sintetasa de Ácidos Graso, Lipoproteína Lipasa y Esteroil CoA Desaturasa 2 (SCD2). La exposición perinatal a BPA produjo una disminución de la expresión de BTN y XOR en DL2. Asimismo, en DL2 la expresión de ADPF fue menor sólo en BPA0.5, mientras que en DL10 los niveles fueron similares entre los grupos experimentales. La expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de TG no fue modificada por la exposición a BPA a excepción de SCD2 en DL10, cuyos niveles fueron superiores a los cuantificados en los animales control. En conclusión, la exposición perinatal a BPA perturba la formación del glóbulo graso durante la lactancia e induce la síntesis mamaria de TG, principalmente, a partir de ácidos grasos preformados y no de aquellos derivados de la síntesis de novo. Por lo tanto, la composición lipídica de la leche podría ser modificada por la exposición a BPA.

712. (177) EFECTO DE LOS VENENOS DE BOTHROPS ALTERNATUS Y BOTHROPS DIPORUS DEL NORDESTE ARGENTINO SOBRE LA ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR DE MIOBLASTOS MURINOS

Matzner Perfumo V.¹; Acosta O.²; Leiva L.¹; Bustillo S.¹

Laboratorio de Investigación en Proteínas, LABINPRO¹; Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste².

La mayoría de los accidentes ofídicos ocurridos en la región Nordeste de Argentina son causados por las serpientes *Bothrops alternatus* (yarárá grande) y *Bothrops diporus* (yarárá chica). En este trabajo se estudió el efecto de estos venenos botrópicos sobre la adhesión y migración celular de mioblastos murinos de la línea celular C2C12. Los ensayos de inhibición de la adhesión celular se realizaron en placas de 96 pocillos cubiertos con una de mezcla SFB: PBS (1:4) y bloqueados con albumina sérica bovina (ASB). Se sembró una mezcla (1:1) de suspensión de células (2.5-3 x 10⁴/pocillo) y diferentes concentraciones de los venenos (0.03125-50 μ g/mL). Se incubó 90 min a 37 °C y 5% de CO₂ y se evaluó la adhesión utilizando el colorante Cristal violeta. Por otro lado, los ensayos de migración celular se realizaron por el método de "Wound-healing", para ello se realizó una herida con la punta de un tip estéril sobre la monocapa celular. Luego se adicionaron diferentes concentraciones de los venenos (0.5-1 μ g/mL) y se incubó durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Se realizaron registros fotográficos por microscopía de contraste de fases y se calcularon los porcentajes de cierre de la herida. Los resultados de los ensayos de adhesión permitieron comprobar una marcada disminución en el porcentaje de adherencia celular, proporcional a las concentraciones de veneno ensayadas. A su vez, observamos un efecto inhibitorio de ambos venenos sobre la migración celular (porcentaje de cierre: control=100% vs. tratado con *B.alternatus* 0.5 μ g/mL =97.5%, 1 μ g/mL=75% y con *B.diporus* 0.5 μ g/mL=62.5% 1 μ g/mL=50%). Se constató un mayor efecto inhibitorio de la adhesión y migración celular del veneno de *B. diporus* frente al veneno de *B. alternatus*. En conclusión, ambos venenos afectan la adhesión y migración de mioblastos murinos de la línea C2C12. Un entendimiento del mecanismo por el cual se inhiben estos procesos, podría permitir el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas.

713. (183) LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A (BPA) MODIFICA LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS DE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN RATA

Santamaría C.; Abud J.; Rivera O. Muñoz De Toro M.; Luque E.; Rodríguez H.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Previamente hemos demostrado que la exposición perinatal a BPA disminuye la expresión folicular de receptor de andrógenos (RA) y la respuesta del ovario a gonadotrofinas, alterando el número de folículos antrales, la tasa de ovulación y la formación de cuerpos lúteos. Por lo tanto nos propusimos evaluar el patrón de expresión de enzimas claves de la vía esteroideogénica. Ratas Wistar preñadas fueron tratadas por vía oral desde el día 9 de gestación hasta el destete con 50 μ g/kg.día (BPA50), 0.5 μ g/kg.día (BPA0.5) o etanol (Control). Las crías hembras fueron sometidas a un tratamiento superovulatorio a los 30 días de edad, con 3 dosis diarias de PMSG (10UI/rata) y una dosis de hCG (25UI/rata) 24 hs post PMSG. Los ovarios fueron extraídos en distintos momentos: 0 hs, 7 y 22 hs post-hCG. Se evaluó la expresión del ARNm de las enzimas: *P450scc* (*Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme*) producto del gen CYP11A, *P450_{17 α}* (*Cytochrome P450 17 α hydroxylase*) producto del gen CYP17A; y *P450arom* (*Cytochrome P450 aromatase*) producto del gen CYP19, por transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (q-RT-PCR). En 0hs post-hCG, observamos una mayor expresión de CYP17A y CYP19 en respuesta a BPA50, y mayores niveles de CYP11A por la exposición a BPA0.5. Luego de la inyección de hCG, sólo disminuyó la expresión de CYP11A por la intoxicación con BPA50

(7hs), mientras que el tratamiento con BPA0.5 redujo los niveles de ARNm de CYP11A (22hs), CYP17A (7 y 22 hs) y CYP19 (7hs). Algunos de los cambios que observamos en el patrón de expresión de las enzimas, han sido asociados a patologías ováricas como el síndrome de ovario poliquístico. Nuestros resultados nos permiten concluir que la exposición a bajas dosis de BPA modifica la expresión de las enzimas de la vía esteroidogénica, impactando potencialmente en los niveles circulantes de las hormonas esteroides de origen ovárico.

714. (275) NANOTOXICIDAD DE DENDRÍMEROS PAMAM, CARDIOTOXICIDAD Y CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EMBRIONES Y LARVAS DE ZEBRAFISH

Calienni N.; Del Valle Alonso S.; Prieto M.

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes.

Debido al incremento en la producción y utilización de compuestos nanotecnológicos, resulta de creciente interés determinar la nanotoxicidad de los mismos. Para ello, se utilizó el modelo animal zebrafish con el fin de evaluar la nanotoxicidad de dendrímeros PAMAM G4 (DG4) y G 4,5 (DG4,5) en embriones y larvas. Mediante microscopía óptica se realizó un seguimiento de los cambios morfológicos de embriones, se determinó la dosis letal 50 (DL50) y teratogénica 50 (DT50) a las 24 y 48 horas post-fecundación (hpf). En larvas, se determinó la variación en el nado espontáneo mediante un sistema automatizado. Se estudiaron además en larvas, cambios morfológicos y cardiotoxicidad. Con DG 4,5 se observó cardiotoxicidad luego de 48 horas de exposición (hpe) en concentraciones mayores a 5 μM en larvas. Sin embargo, no hubo cambios morfológicos ni comportamentales hasta la concentración de 20 μM . Con DG4 se obtuvo una DL50 de 0,21 μM a 48 hpf, pero no se observaron efectos teratogénicos en embriones. Con dosis de 0,5 μM se disminuyó un 50% el nado espontáneo en larvas. Se observaron severos cambios morfológicos, en particular ulceraciones en el tejido externo en larvas tratadas con concentraciones mayores a 0,25 μM . Por último, en larvas tratadas a partir del 4 dpf se observó disminución significativa del latido cardíaco desde la menor concentración testeada (0,032 μM) a las 72 hpe, indicando una alta tasa de cardiotoxicidad. Se determinó la nanotoxicidad de los DG4 y DG4,5 en embriones y larvas, en órganos específicos, cambios morfológicos y comportamentales. Se observó que el DG4,5 tiene baja toxicidad, produciendo una leve alteración en el ritmo cardíaco. Por otro lado, el DG4 muestra alta toxicidad tanto en embriones como en larvas, severos efectos morfológicos y elevada cardiotoxicidad aun en bajas concentraciones.

715. (333) EXPOSICIÓN A PARTÍCULAS URBANAS AÉREAS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES (UAP-BA) Y SU EFECTO BIOLÓGICO SOBRE LAS MUCOSAS RESPIRATORIA Y OCULAR

Maglione G.¹; Orona N.¹; Astort F.¹; Mandalunis P.²; Berra A.³; Tasat D.^{1,2}

Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín¹; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²; Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³.

Las poblaciones de las megaciudades son susceptibles a la contaminación aérea proveniente de las emisiones vehiculares e industriales. Siendo la piel, el tracto respiratorio y la superficie ocular los más expuestos. En este trabajo se estudió la respuesta de las mucosas pulmonar y ocular a la exposición crónica a Partículas Aéreas Urbanas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA). Para ello, se expusieron Ratonas BALB/c (n=15-20) durante 1 mes a UAP-BA o aire filtrado (control). Los animales se pesaron, se realizó la eutanasia de los mismos y se extrajeron los pulmones y córneas para su procesamiento histológico. Las secciones histológicas (5-7 μm) se colorearon con H&E e inmunohistoquímicamente se evaluó caspasa 3 pAb como marcador de apoptosis. Además, en el lavado broncoalveolar se determinó el número de

células de totales (TCN) y la distribución celular mediante tinción diferencial (CD) La exposición a UAP-BA durante un mes no provocó diferencias en el peso de los animales (UAP-BA: 19,40 \pm 1.67 vs. control: 19,07 \pm 0,96 gr). Las córneas y los pulmones de los animales expuestos presentaron alteraciones tanto a nivel epitelial como estromático. En córneas de los animales expuestos, se observó alteración a nivel epitelial con reducción de células planas típicas de las capas superficiales y un aumento en el número de células caspasa-3 positivas respecto de los controles. A nivel estromático se encontró mayor densidad fibrilar. Los pulmones de los animales expuestos presentaron un incremento en el porcentaje de polimorfonucleares (PMN) indicativos de un proceso inflamatorio (UAP-BA: 24,00% \pm 6,08 vs. control: 8,64% \pm 5,37, p< 0.05). La exposición crónica a UAP-BA indujo efectos adversos a nivel de estos dos blancos preferenciales de la contaminación ambiental aérea.

716. (355) EL PESTICIDA ORGANOCOLORADO HEXACLOBENCENO AUMENTA LA MIGRACIÓN CELULAR Y LA TRANSLOCACIÓN DEL SMAD3 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO

Miret N.¹; Pontillo C.¹; Chiappini F.¹; Alvarez L.¹; Kleiman D.¹; Ventura C.²; Cocca C.²; Randi A.¹

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

El Hexaclorobenceno (HCB) es un tóxico organoclorado persistente. Su exposición se considera un problema de salud pública y ha sido clasificado como probable carcinógeno humano. Estudios regionales muestran que la población está expuesta a este contaminante. Hemos demostrado que el HCB es co-carcinogénico en la formación de tumores mamarios en rata, y que induce migración, invasión y metástasis en modelos experimentales de tumores mamarios en ratones. El TGF- β 1 regula procesos de migración e invasión celular y actúa por diferentes caminos: uno dependiente de Smad y otros independientes (ERK1/2, JNK y p38). Hemos observado previamente que el pesticida induce fosforilación de Smad3 y ERK1/2 en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Nos propusimos estudiar la acción del HCB sobre las vías de señalización del TGF- β 1: p38 y JNK; la translocación de Smad3 al núcleo; y si las vías independientes de Smad están implicadas en la migración inducida por el tóxico. Las células fueron tratadas con HCB (0.005 μM) 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 μM) durante 5 y 15 min para estudios de inmunoblot. La translocación del Smad3 se evaluó por inmunofluorescencia a los 5 min. Los ensayos de migración por cerrado de la herida, se realizaron con HCB (0.05 μM) a 20 hs con pre-tratamiento de inhibidores de ERK1/2 (PD98059), de JNK (SP600126), o de p38 (SB203580). Nuestros resultados mostraron que en todas las dosis ensayadas el HCB activa: 1) la vía de p38 (125%;p<0.01), a los 5, 15 y 30 min (p<0.01); 2) la vía de JNK (105%;p<0.01), a los 15 min (p<0.01) y 3) la translocación del Smad3 al núcleo (113%;p<0.01). Además, observamos que el aumento de la migración fue prevenido mediante el tratamiento con inhibidores de ERK1/2, JNK y p38 (p<0.001). El HCB estimula la translocación del Smad3 y activa las vías de JNK y p38. La inducción de la migración celular por el pesticida depende de ERK1/2, JNK y p38.

717. (459) LA EXPOSICIÓN DE TROFOBlastos JEG-3 A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS MODULA LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES TLR2 Y TLR4

Zappa N.¹; Espinoza M.¹; Rivero-Osimani V.²; Rivero V.³; Rosenbaum E.²; Magnarelli G.²; Guiñazu N.²

Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud, Universidad Nacional del Comahue¹; IDEPA-CONICET, LIBIQUIMA, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue²; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba³.

Los insecticidas organofosforados (OF), son químicos neurotóxicos inhibitorios de acetilcolinesterasa (AChE). Es cada vez más reconocido que la exposición a estos insecticidas puede afectar la respuesta inmune. En la placenta, los trofoblastos (Tf) responden a la presencia de patógenos por receptores tipo toll (TLR). El objetivo fue evaluar si la exposición a OF modula la expresión de TLR2 y TLR4, en la línea celular de Tf, JEG-3. Se cultivaron las células, en presencia del OF clorpirifos (Cp)- 0,1, 1, 10 y 100 μM - por período de 4, 12 y 24 hs. Se estudió la actividad de AChE y la expresión por RT-PCR del transcrito de TLR2 y TLR4. Se observó una inhibición significativa de AChE, a partir de las 4 hs de incubación sólo con la mayor concentración ensayada para Cp ($p \leq 0,03$). Mientras que a las 12 hs se observó inhibición significativa a 10 ($p \leq 0,001$) y 100 μM ($p \leq 0,001$). A las 24 hs de incubación, todas las concentraciones ensayadas disminuyeron significativamente la actividad de AChE, en forma dosis dependiente. Por otra parte el estudio de la expresión de TLR2 y TLR4, mostró inducción de ambos receptores a 100 μM sólo a las 4 hs de incubación. No se observaron cambios en la expresión de estos receptores, en ninguna de las concentraciones ensayadas respecto de la condición basal, a las 8 y 24 hs. Se observó una asociación negativa significativa ($p=0,01$), entre la expresión de ambos receptores y la inhibición de AChE a tiempos tempranos, la cual no se observa a tiempos más prolongados de exposición. Los resultados indican que la exposición a OF modularía la expresión de TLR2 y TLR4 sólo a tiempos tempranos de incubación, sugiriendo un novel rol de acetilcolina en el Tf. Ha sido postulado que la estimulación colinérgica puede favorecer la respuesta inmune anti-microbiana, sin embargo la participación de acetilcolina en este incremento temprano y en la down-regulación a tiempos posteriores, necesita ser estudiado más en profundidad en nuestro modelo.

718. (470) CARACTERIZACIÓN DEL YACARÉ COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE OBESÓGENOS AMBIENTALES
Canesini G.; Durando M.; Galoppo G.; Luque E.; Muñoz-De-Toro M.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Dos especies de yacaré habitan el noreste argentino: Caiman latirostris (yacaré overo) y C. yacaré (yacaré negro). Diversos compuestos de uso agro-industrial (pesticidas organoclorados -POCs-, estradiol -E2- y bisfenol A -BPA-), están clasificados como perturbadores endócrinos (PEs) y potenciales obesógenos ambientales (OA). Resultados previos demuestran la vulnerabilidad de los yacarés a la acción de los PEs y las ventajas anatómicas que los posicionan como modelo para el estudio de los OA. Los yacarés presentan un cuerpo graso (CG), órgano adiposo cuyo tamaño y morfología se asocia al estado nutricional y/o la demanda energética. En neonatos de C. yacaré reportamos un aumento en la masa del CG luego de la exposición natural a POCs. Para profundizar la caracterización del modelo animal, 24 hembras de C. latirostris divididas en 3 grupos recibieron 2 inyecciones sc de vehículo (control), BPA (1,4 ppm) o E2 (1,4 ppm) a los 26 y 33 días de edad (d). A los 40 d, se registraron variables corporales, se sacrificaron y se extrajo el CG. El CG se procesó hasta la inclusión en parafina. Utilizando análisis de imágenes digitalizadas de cortes histológicos de CG coloreados, evaluamos densidad de adipocitos y distribución de frecuencia de las áreas (μm^2) de los adipocitos. El tratamiento no modificó los parámetros de crecimiento de los animales: masa corporal, largo total y largo hocico-cloaca. El CG de los yacarés expuestos a BPA exhibió mayor densidad de adipocitos ($p=0,0281$), y una tendencia al aumento en el área de los mismos ($2042 \pm 285,9$ versus $1526 \pm 112,2$). El tratamiento con E2 modificó la histología del CG, se observa menor tamaño de los adipocitos ($945 \pm 93,71$ versus $1526 \pm 112,2$) y reemplazo del tejido adiposo por un estroma fibroblástico. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de los OA y la utilización del yacaré como modelo animal. Alertan, además, sobre nuevas acciones de los contaminantes agro-industriales en especies de nuestra fauna.

719. (475) REGENERACIÓN MUSCULAR POSTERIOR A INTOXICACIÓN CON VENENO ENTERO DE BOTHROPS ALTERNATUS DE ARGENTINA. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS

García Denegri M.¹; Teibler G.¹; Maruñak S.¹; Acosta O.¹; Leiva L.²

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste¹; Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste².

En Argentina, la ocurrencia de accidentes por serpientes del género Bothrops incide en la prestación de servicios de salud y en la actividad de áreas rurales. El cuadro clínico que se desarrolla por mordedura de *Bothrops alternatus* se asocia con daños locales rápidos y prominentes (edema, dolor, sangrado, necrosis), seguidos de alteraciones sistémicas (sangrado, coagulopatías, entre otros). De todos estos efectos, el daño tisular local que conduce a la necrosis es particularmente relevante, debido a que frecuentemente le sigue una regeneración tisular deficiente, con la ocurrencia de secuelas permanentes asociado a pérdida de tejido y disfunción y fibrosis. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios morfológicos en la regeneración muscular, post-inoculación con veneno de *B. alternatus*, mediante microscopía óptica. Se inocularon ratones en músculo gastrocnemio con 50 μg de veneno (0,5 mg/ml; 100ul), los músculos se extrajeron a intervalos de 1, 6, 12 y 24 horas y 3, 7, 14 y 28 días y luego sometidos a las técnicas histopatológicas convencionales para su evaluación microscópica bajo las tinciones con H&E y Tricromica de Gomori. Los resultados muestran intensa necrosis principalmente del tipo miolítica de fibras musculares a partir de los 60 minutos, con infiltrado inflamatorio acompañado de edema y abundante hemorragia, intensificándose hacia las 24 horas. Al 3° día se detectó remoción de los tejidos dañados por acción de los polimorfonucleares y macrófagos; pequeñas áreas con fibras musculares que iniciaban su regeneración caracterizadas por tinción fuertemente basófila, núcleos de posición central y de diámetro menor en relación a fibras musculares normales. No habiendo estudios previos de este tipo a partir de intoxicación con veneno de *B. alternatus*, estos resultados permiten establecer un patrón de regeneración muscular a partir de 72 h post inoculación y sientan conocimiento tendiente a mejorar las actuales estrategias de la seroterapia específica.

720. (541) RESPUESTAS METABÓLICAS A NIVEL HEPÁTICO EN RATAS EXPUESTAS AL HERBICIDA GLIFOSATO

Larsen K.^{1,3}; Najle R.¹; Lifschitz A.^{2,3}; Virkel G.^{2,3}

Laboratorio de Biología y Ecotoxicología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil¹; Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil²; Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)- CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires³.

El glifosato (GLF) es un herbicida organofosforado de elevada solubilidad acuosa. No existe demasiada información acerca de sus efectos sobre otros seres "no target" expuestos a trazas del herbicida a través del agua de bebida. Entre los procesos bioquímicos que podrían ser modificados por el GLF se encuentran las actividades de diferentes enzimas que participan en el metabolismo de xenobióticos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la exposición a dosis subletales del GLF sobre las siguientes actividades enzimáticas a nivel hepático: (a) glutatión transferasas (GSTs, actividad global), (b) glutatión peroxidasa (GPx), (c) carboxil esterasa (CES), (d) flavin monooxigenasa (FMO) y (e) las dependientes del sistema citocromo P450, etoxicumarina, etoxi-resorufina y metoxi-resorufina O-desetilasa (ECOD, EROD y MROD, respectivamente) y benciloxi-resorufina O-desbencilasa (BROD). Se prepararon microsomas hepáticos de ratas Wistar que recibieron GLF (Round up Full I®) en el agua de bebida durante 90 días a razón de 0.7 y 7 mg/L. Las

actividades GSTs, CES y MROD no resultaron significativamente diferentes entre animales tratados y no tratados. En animales expuestos al GLF, la actividad GPx aumentó un 61% ($p < 0.05$), mientras que la actividad FMO disminuyó 49-62% ($p < 0.001$). La actividad ECOD aumentó (~50%, $p < 0.05$) en las hembras, mientras que en los machos disminuyó (~60%, $p < 0.05$). De manera similar, las actividades EROD y BROD aumentaron en las hembras (124-178%, $p < 0.01$). En machos, sin embargo, EROD disminuyó un 36% ($p < 0.05$) mientras que la actividad BROD fue similar. Estos resultados sugieren que la exposición sostenida al herbicida podría alterar el patrón de biotransformación de xenobióticos a nivel hepático. Para algunas actividades metabólicas, dicha alteración sería diferente según el sexo. Futuros estudios serán necesarios para determinar la relevancia de estas modificaciones, tanto en medicina humana y como veterinaria.

- 721. (568) ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FASE LIPOFÍLICA ASOCIADO A LA SUPLEMENTACIÓN CON AS EN CEREBRO**
Bonetto J.¹; Robello E.¹; Villaamil E.²; Puntarulo S.¹
Cátedra de Físicoquímica, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)- CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

El arsénico (As) es un metaloide presente en el ambiente de forma natural y antropogénica. El efecto tóxico está relacionado con enfermedades cardiovasculares, daño en hígado, vejiga, riñones y algunos tipos de cánceres. Sin embargo, poco se sabe sobre su efecto sobre el sistema nervioso central. El estrés oxidativo es un mecanismo aceptado por el cual el As ejercería su efecto, pero el modo de acción no está completamente descrito. La hipótesis del presente trabajo fue analizar el desarrollo de condiciones oxidativas asociadas a la suplementación con As en el medio hidrofóbico del cerebro. Ratas Wistar macho fueron tratadas con una única dosis i.p. de arsenito de sodio (5,8 mg As³⁺/kg). Al cabo de 0, 4, 8, 16, 24 o 31 h pos-tratamiento, se recolectaron muestras de cerebro entero y de sangre mediante punción cardiaca. El contenido de As total fue determinado mediante IF-EAA. La velocidad de generación de radicales lipídicos (RL[•]) fue determinada empleando Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR). La concentración de α -tocoferol (α -T) fue evaluada por HPLC-EQ. El contenido de As en sangre aumentó hasta 25000 \pm 3000 μ g/l a las 8 h y se mantuvo constante hasta las 30 h posteriores a la suplementación con As. El contenido de As en cerebro fue de 0,5 \pm 0,12 μ g/g de tejido a las 8 y 30 h pos-tratamiento. La velocidad de generación de RL[•] resultó de 24 \pm 7 pmol RL[•]/mg tejido/30 min en cerebro control y 51 \pm 4 pmol RL[•]/mg tejido/30 min en cerebro al cabo de 24 h. El índice [RL[•]]/[α -T], índice daño/protección en la fase lipofílica, resultó de 0,025 \pm 0,008 para animales controles y mostró un incremento significativo a las 24 h pos-tratamiento (0,17 \pm 0,03). Los resultados obtenidos sugieren un efecto del tratamiento con As a nivel hidrofóbico debido a una generación de RL[•] y un consumo incrementado del más potente antioxidante hidrofóbico (α -T). Financiado por subsidios UBA y CONICET.

- 722. (689) PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE MAPK Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA DEL CLORPIRIFOS EN CÉLULAS DE MELANOMA**
Ventura C.¹; Miret N.²; Venturino A.³; Randi A.²; Rivera E.¹; Núñez M.¹; Cocca C.¹
Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; LIBIQUIMA-IDEPA, Universidad Nacional del Comahue.³

En presentaciones previas mostramos que el insecticida clorpirifos (CPF) disminuye la proliferación celular y altera el balance redox en líneas celulares derivadas de melanoma con diferente grado de diferenciación. HIPOTESIS: En células de melanoma la acción anti-proliferativa del CPF es mediada por alteraciones

redox y la desregulación de la vía MAPK. OBJETIVO: estudiar la acción de la vía de MAPK y el estrés oxidativo sobre inhibición de la proliferación inducida por el pesticida. METODOLOGIA: En las líneas WM35 y M1/15 derivadas de melanoma expuestas a CPF (0,05 - 50 μ M), evaluamos: la proliferación por recuento clonogénico, las especies reactivas del oxígeno (ERO) por citometría de flujo con la sonda DCF-2DA, la peroxidación lipídica por cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. La actividad catalasa (CAT) y el contenido de glutatión (GSH) se evaluaron por espectrofotometría. La fosforilación de ERK1/2 se evaluó por Western blot. RESULTADOS: El CPF 50 μ M inhibió la proliferación en un 45,9 \pm 17,2% en WM35 ($p < 0,05$) y 44,9 \pm 8,7% en M1/15 ($p < 0,01$) e incrementó los niveles de ERO en un 76,0 \pm 23,1% en WM35 ($p < 0,01$) y 59,3 \pm 13,4% en M1/15 ($p < 0,05$). En la línea WM35, este aumento revirtió por el agregado de CAT. El CPF incrementó la actividad CAT en la línea WM35 (30,6 \pm 9,7%; $p < 0,05$). El daño celular solo se evidenció en la línea M1/15 (117 \pm 24,9%, $p < 0,01$). El CPF 50 μ M indujo ERK1/2-P en las células WM35 (375 \pm 35%) sin cambios en la línea M1/15. CAT revirtió el efecto del CPF 50 μ M sobre la proliferación celular en ambas líneas. El inhibidor de MAPK (PD98059) revirtió el efecto del CPF sobre la proliferación en la línea WM35. CONCLUSION: El H₂O₂ participa de la inhibición de la proliferación inducida por el CPF 50 μ M en ambas líneas. Las MAPKs solo se afectaron en las células WM35 expuestas al tóxico sugiriendo que esa vía participa en la inhibición de la proliferación inducida por el CPF en esta línea.

- 723. (739) EL CADMIO (CD) INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE BETA-CATENINA, LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS NUCLEARES DE HSP27 Y TIENE UN EFECTO DUAL EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS EN CÉLULAS HELA**
Alvarez Olmedo D.; Shortrede J.; Cuello-Carrion D.; Ciocca D.; Fanelli M.
Laboratorio de Oncología, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza.

Cd influye el proceso oncogénico, afectando distintas vías de señalización y es capaz de modular la interacción beta catenina/Hsp27 a 3 hs. Objetivo: evaluar el efecto Cd en la dinámica de expresión de beta-catenina y Hsp27, en el ciclo celular y en la apoptosis, usando distintos tiempos de exposición al metal con o sin recuperación. Mat. y Met.: células HeLa, tratadas con Cl2Cd 1-500 μ M: Tr1: 3hs Cd, Tr2: 3hs Cd+24hs de recuperación; Tr3: 3hs Cd+48hs de recuperación. Se evaluó citotoxicidad con CCK8, apoptosis con Anexina5 y el ciclo celular con iodo de propidio. La fosforilación y niveles de expresión de beta-catenina y Hsp27 evaluadas por WB e IF. Tratamientos con Cd 100 μ M indujeron la formación de gránulos nucleares de Hsp27 a partir de las 3hs y la disminución de los niveles totales de la proteína a 24hs al mismo tiempo indujo la fosforilación de beta-catenina marcándola para degradación. Esto tuvo efectos en la viabilidad celular. Tratamientos superiores a 25 μ M de Cd, fueron citotóxicas luego de 24hs mientras que Cd 1 y 5 μ M aumentaron la viabilidad. Luego de Tr2 y Tr3, con dosis de Cd superiores a 25 μ M, las células fueron incapaces de recuperarse. En el ciclo celular con Tr2, a partir de 50 μ M de Cd se observó una disminución significativa ($p > 0.001$) en el número de células en fase M y un aumento en la fase G0/G1. Comparando Tr1 con Tr2 se puede destacar un efecto dual del Cd, por un lado estimulante de la proliferación hasta Cd 25 μ M y por otro inhibitorio Cd 50 y 100 μ M. Así mismo, se observó un aumento en la apoptosis luego de Tr2 y Tr3 siendo las concentraciones de 50 y 100 μ M de Cd las que mostraron una disminución en la viabilidad $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**), $P < 0,05$ (*), y aumentos significativos $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**) necrosis y en la apoptosis. Conclusión: Cd induce la fosforilación de beta-catenina, la formación de gránulos nucleares de Hsp27 y tiene un efecto dual en la proliferación celular y en la apoptosis que depende de la dosis y del tiempo.

- 724. (786) PERFIL LIPÍDICO DE HIPOCAMPO DE RATAS INTOXICADAS CON CADMIO. EFECTO DE LA SOJA EN LA DIETA**

Plateo Pignatari M.¹; Pérez Diaz M.¹; Marra C.²; Oliveros L.¹; Giménez M.¹

Departamento de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Luis, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas de San Luis (IMIBIO-SL)-CONICET¹; Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (IMIBIOLP)- CONICET, Universidad Nacional de La Plata².

El cadmio (Cd) es un importante contaminante ambiental y causa toxicidad en el cerebro. Nuestro objetivo fue estudiar los efectos del Cd sobre el perfil lipídico del hipocampo de ratas alimentadas con caseína o soja como fuente proteica. Se separaron 4 lotes de ratas Wistar hembras: 2 de ellos recibieron caseína como fuente proteica dietaria y los otros 2, soja. Dentro de cada grupo, un lote recibió agua sin Cd (control) y el otro, 15ppm de Cd (como Cl₂Cd) en el agua de bebida, por 60 días. La extracción lipídica se realizó con isopropanol: n-hexano 3:2. Se midió Colesterol. Total (CT) y fosfolípidos (FL). La composición de ácidos grasos (AG) mediante cromatografía gas-líquido (c-GLC). Las proteínas se midieron por Lowry. El Cd no produjo variaciones significativas en los niveles de colesterol, independientemente de la dieta. La soja en la dieta disminuyó los niveles de CT en esta región cerebral ($p < 0,01$). El tratamiento con Cd disminuyó los valores de CT en las ratas alimentadas con caseína ($p < 0,05$), mientras que en el grupo alimentado con soja no se observaron cambios. Con Cd aumentan los niveles de los AG 18:0 (esteárico), 20:4 (araquidónico) y 22:5 (n-3), (docosapentaenoico-DPA) y este aumento fue mayor con la dieta de soja ($p < 0,05$). El Cd redujo los niveles del ácido 22:6 (n-3), (docosahexaenoico-DHA), con caseína, mientras se mantuvieron con soja. El DHA disminuyó con soja. Conclusiones: La soja interfiere con la síntesis de CT. La intoxicación con Cd afecta a los FL, componentes de membrana esenciales para la mielinización neuronal, mientras que la soja amortigua este efecto. El Cd aumenta los AG que participan como mediadores pro inflamatorios (20:4) y disminuye el DHA, necesario para mantenimiento y fluidez de la membrana plasmática neuronal. Este efecto se correlaciona con la mayor cantidad de DPA presente en el hipocampo, producto de su degradación. Estas alteraciones interfieren con las funciones de memoria y orientación espacial del hipocampo..

725 (00) EL BACLOFEN PREVIENE LA ANTINOCICEPCIÓN, LAS PROPIEDADES REFORZANTES Y EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA DE LA NICOTINA EN RATONES

Varani A.¹; Aso E.²; Machado M.¹; Maldonado R.²; Balerio G.^{1,3}
Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Neurofarmacología, UPF²; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

La nicotina es el principal componente activo del tabaco y juega un papel importante en la adicción al mismo. En los roedores, la administración aguda de nicotina modifica la locomoción, ansiedad, nocicepción, aprendizaje y memoria, mientras que administraciones repetidas inducen respuestas conductuales relacionadas con sus propiedades adictivas, tales como el refuerzo y la dependencia física. El objetivo del presente estudio fue evaluar la posible participación de los receptores GABAB en las respuestas conductuales inducidas por la administración aguda y repetida de la nicotina en ratones. La administración aguda de nicotina (3 mg/kg, sc) indujo respuestas antinociceptivas en el test de la inmersión de la cola y la plancha caliente. El agonista selectivo de los receptores GABAB, baclofen (3 mg/kg, ip) abolió los efectos antinociceptivos inducidos por la nicotina en ambos tests. Además, el baclofen bloqueó las propiedades reforzantes de la nicotina (0,5 mg/kg, sc) en el paradigma de preferencia de lugar condicionada. Por otro lado, el baclofen previno las manifestaciones somáticas del síndrome de abstinencia a la nicotina precipitado por naloxona. Por último, el baclofen bloqueó el efecto similar ansiogénico asociado al síndrome de abstinencia a la nicotina determinado en el laberinto en cruz elevado. En resumen, estos resultados muestran que los efectos agudos de la nicotina (antinocicepción y propiedades reforzantes) como así también los aspectos negativos del síndrome de abstinencia a la nicotina (ansiedad y manifestaciones somáticas), podrían ser modulados por la actividad del receptor GABAB. Además, este estudio sugiere un potencial fármaco-terapéutico del baclofen para el tratamiento de la adicción al tabaco. UBACyT B016 y PIP 11420090100303