

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

ENDOCRINOLOGÍA 1

001. (20) EFECTO DE LOS ESTEROIDES GONADALES SOBRE LA APOPTOSIS DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS DE RATAS MACHOS.

Magri, María Laura; Gottardo, María Florencia; Zárate, Sandra; Ferraris, Jimena; Eijo, Guadalupe; Jaita, Gabriela; Moreno Ayala, Mariela; Candolfi, Marianela; Pisera, Daniel; Seilicovich, Adriana
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET

En condiciones basales, la adenohipofisis de ratas machos adultas presenta una tasa de recambio celular diario de 1,5%, siendo éste la mitad que el observado en ratas hembras. El estradiol (E_2) ejerce acciones proapoptóticas en células adenohipofisarias provenientes de ratas hembras gonadectomizadas (GNX). Por otro lado, la testosterona (T) ejerce acciones antiapoptóticas en diversos tipos celulares. La T puede ser aromatizada a E_2 por la aromatasa o reducida a dihidrotestosterona (DHT) por la 5 α reductasa, ambas enzimas presentes en la adenohipofisis. En el presente trabajo evaluamos el efecto de T, DHT y E_2 sobre la apoptosis de células adenohipofisarias de ratas machos GNX. Células adenohipofisarias en cultivo fueron incubadas con T (10^{-8} M), DHT (10^{-8} M) o E_2 (10^{-9} M) durante 2 hs. La apoptosis fue evaluada en células totales y lactotrofos mediante el método de TUNEL. La T no modificó la apoptosis de células adenohipofisarias totales ni de lactotrofos. La DHT disminuyó el porcentaje de células totales apoptóticas (C: 1,7%, DHT: 0,9%, $p < 0,01$, X_2), pero no de lactotrofos apoptóticos, mientras que el E_2 aumentó la apoptosis de células totales (C: 1,5%, E_2 : 2,4%, $p < 0,01$, X_2) y de lactotrofos (C: 0,6%, E_2 : 1,5%, $p < 0,05$, X_2). También evaluamos el efecto *in vivo* de los esteroides gonadales sobre la apoptosis adenohipofisaria. Ratas machos GNX fueron inyectadas con DHT (5 mg/Kg) o E_2 (0,2 mg/kg) los días 13 y 14 luego de la cirugía. Los animales fueron sacrificados el día 15 y la apoptosis evaluada por citometría de flujo. El tratamiento con DHT disminuyó (C: $10,9 \pm 0,7$, DHT: $7,9 \pm 1,2$, $p < 0,05$, test t) mientras que el E_2 aumentó el porcentaje de células adenohipofisarias hipodiploides (C: $9,7 \pm 0,6$, E_2 : $15,0 \pm 2,2$ $p < 0,05$, test Mann-Whitney). Nuestros resultados muestran que la DHT y el E_2 inducen efectos opuestos sobre la apoptosis en células adenohipofisarias. Cambios en el entorno hormonal podrían afectar el desarrollo de tumores adenohipofisarios en machos.

002. (23) MODIFICACIONES EN LA ESTEROIDOGENESIS HIPOCÁMPICA PODRÍAN CONTRIBUIR A LA DISMINUCIÓN DE LA PLASTICIDAD NEURONAL EN LAS RATAS HEMBRAS ADULTAS

Rossetti, María F^{1,2}; Varayoud, Jorgelina¹; Luque, Enrique H¹; Ramos, Jorge G^{1,2}
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, (ISAL)-CONICET-Universidad Nacional del Litoral¹ Depto. 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 resulta interesante preguntarse: ¿Podrían estos cambios observados en la adultez deberse a una disminución de la neurosteroidogénesis hipocámpica? Para comenzar a responder estas preguntas, utilizamos ratas hembras (H) y machos (M) 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 extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real. En las ratas hembras adultas, 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 (H-PND90 vs H-PND450 $p < 0,05$). Sin embargo, no se detectaron cambios de expresión en las ratas machos (M-PND90 vs M-PND450 $p > 0,05$). Cuando se compararon animales jóvenes se observó que las hembras poseen una mayor expresión de StAR, P450 scc , 3 β -HSD, P450(17 α), 5 α -reductasa, 3 α -HSD y 17 β -HSD 3 comparadas con las ratas machos (H-PND90 vs M-PND90 $p < 0,05$). En conclusión, el envejecimiento se encuentra acompañado por una disminución en la expresión de las enzimas neurosteroidogénicas en el hipocampo de las ratas hembras, pero no de las ratas machos. Según nuestra hipótesis, esto resultaría en una importante disminución en los niveles de neuroesteroides, lo que podría contribuir a una mayor pérdida de plasticidad en las hembras.

campo poseen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras y modulan distintos procesos cognitivos. En este contexto resulta interesante preguntarse: ¿Podrían estos cambios observados en la adultez deberse a una disminución de la neurosteroidogénesis hipocámpica? Para comenzar a responder estas preguntas, utilizamos ratas hembras (H) y machos (M) 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 extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real. En las ratas hembras adultas, 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 (H-PND90 vs H-PND450 $p < 0,05$). Sin embargo, no se detectaron cambios de expresión en las ratas machos (M-PND90 vs M-PND450 $p > 0,05$). Cuando se compararon animales jóvenes se observó que las hembras poseen una mayor expresión de StAR, P450 scc , 3 β -HSD, P450(17 α), 5 α -reductasa, 3 α -HSD y 17 β -HSD 3 comparadas con las ratas machos (H-PND90 vs M-PND90 $p < 0,05$). En conclusión, el envejecimiento se encuentra acompañado por una disminución en la expresión de las enzimas neurosteroidogénicas en el hipocampo de las ratas hembras, pero no de las ratas machos. Según nuestra hipótesis, esto resultaría en una importante disminución en los niveles de neuroesteroides, lo que podría contribuir a una mayor pérdida de plasticidad en las hembras.

003. (37) EFECTO DE LA HIPERPROLACTINEMIA SOBRE EL METABOLISMO GLUCÍDICO Y LIPÍDICO EN UN MODELO DE RATONES TRANSGÉNICOS HIPERSECRETORES DE HCG

Ratner, Laura D.; Marcial, Carla A.; Farré, Paula L.; Stevens, Guillermina; González-Calvar, Silvia I.; Calandra, Ricardo S.; Rulli, Susana B.
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Se demostró previamente que ratones hembra transgénica que sobreexpresan la subunidad β de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG β +) exhiben niveles elevados de hCG, desarrollan hiperprolactinemia, infertilidad y obesidad con acumulación de grasa abdominal en la adultez. Dichas hembras transgénicas presentaron alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico, con aumento en la insulinemia basal y los niveles de triglicéridos en suero. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la hiperprolactinemia sobre las alteraciones metabólicas descritas en este modelo. Para ello se administró el agonista dopaminérgico cabergolina (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$; vía i.p.) a hembras hCG β + de 5 semanas de edad, día por medio durante una semana (hCG β +cab). A los 6 meses de edad, se realizaron los Test de tolerancia a la glucosa (TTG) y de resistencia a insulina (TRI) en ratones ayunados por 6 y 4 horas, respectivamente. Para el TTG se administró 2g/kg glucosa (vía i.p.), mientras que para el TRI se administró 0,75 UI/kg de insulina (vía i.p.) y se determinaron los niveles de glucosa en sangre a los 0, 30, 60 y 90 min post inyección. Se observó que el tratamiento con cabergolina logró una reversión parcial de TTG y una reversión total de TRI en las hembras transgénicas ($p < 0,001$). Además, se observó una disminución significativa en los niveles séricos de insulina y triglicéridos en las hembras hCG β +cab respecto de las hCG β + controles. Por último, se analizó la expresión génica en páncreas de preproinsulina (*Ins-1*, *Ins-2*) y glucagón (*Gcg*) por RT-PCR en

Tiempo Real, observándose una disminución significativa en los niveles de expresión de *Ins-1* e *Ins-2* en hCGβ+cab respecto de hCGβ+ ($p < 0,05$), sin cambios en *Gcg*. En conclusión, el tratamiento con cabergolina logró revertir las alteraciones metabólicas presentes en las hembras hipersecretoras de hCG, demostrando un rol clave de la hiperprolactinemia sobre el fenotipo de dicho modelo.

004. (42) ACCIÓN DISRUPTORA ENDÓCRINA DEL AGUA DE NAPA SOBRE LA METAMORFOSIS DEL XENOPUS LAEVIS Y SU UTILIDAD COMO BIOENSAYO.

Modarelli, María Fernanda; Carbone, Silvia; Samaniego, Yanina Alejandra; Ponzio, Osvaldo J
Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Las aguas de napas contaminadas pueden vehicular sustancias que tendrían acción disruptora endocrina. Las larvas de anfibios son empleadas como bioensayos por ser altamente sensibles a la acción de sustancias presentes en el agua. Por otra parte la metamorfosis es un proceso dependiente de las hormonas tiroideas y del correcto funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario. Objetivos: evaluar el agua de napa como vehículo de sustancias disruptoras tiroideas, mediante un bioensayo de toxicidad crónica. Se utilizaron larvas de *Xenopus laevis* inmersas en agua: de red filtrada como *control* (C) (n=13), de napa de 30 metros de profundidad de la ciudad de Glew (AN) (n=18), y conteniendo 0,007mg/l de perclorato de potasio como *control positivo* (CP) (n=18). Luego de 28 días de exposición se realizó la valoración morfológica: etapas de la metamorfosis según los criterios Nieuwkoop y Faber, tiempo de aparición de primer y segundo plano de miembros, peso y talla. Se realizó el análisis estadístico mediante el test de Fisher (GraphPad InStat). Se consideró significativo $p < 0,05$. La metamorfosis la completaron el 100% de los C, el 38% del los AN ($p < 0,0001$) y ningún animal CP ($p < 0,0001$). La aparición de primer y segundo plano de miembros se retrasó en AN y CP ($p < 0,0001$). El periodo afectado fue la prometamorfosis, siendo la duración de dicho periodo: C: 21 ± 2 días, AN: 32 ± 2 días, CP: no la completó. El peso y la talla final presentaron diferencias significativas en las etapas 60 y 62 de la metamorfosis en los grupos AN y CP ($p < 0,0001$). La mortalidad por grupo fue 10% en los AN exclusivamente ($p < 0,0001$). Los cambios morfológicos durante la metamorfosis en anfibios, que dependen fisiológicamente de las hormonas tiroideas, se ven afectados por la acción disruptora endocrina del agua analizada. Esto demostraría la utilidad de este modelo de bioensayo para evaluar el impacto biológico de la contaminación del agua por sustancias con posible acción disruptora tiroidea.

005. (46) LA EXPERIENCIA MATERNA COMO FACTOR MODULADOR DE LA ESTEROIDOGÉNESIS HIPOCÁMPICA.

Rossetti, María F^{1,2}; Varayoud, Jorgelina¹; Luque, Enrique H¹; Ramos, Jorge G^{1,2}
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, (ISAL)-CONICET-Universidad Nacional del Litoral¹ Depto. de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral²

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 múltiparas 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. Para ello, se compararon ratas adultas de 15 meses de edad con 3 preñeces completas y sus respectivas lactancias (Hembras Múltiparas con lactancia: HM+L), sin sus respectivas lactancias (Hembras Múltiparas sin

lactancia: HM - L) y ratas vírgenes de la misma edad (HV). Los hipocampos se disecaron y almacenaron a -80°C para posterior extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real. En el grupo HM+L se detectó un aumento en los niveles de ARNm correspondientes a las enzimas P450scc, P450arom, P450 ($\beta 11$) 2 y 5 α -reductasa (HM+L vs HV, $p < 0,05$). Por el contrario, en el grupo HM-L sólo se detectó un aumento en la expresión de P450scc y 5 α -reductasa y una disminución en la expresión de P450arom y P450 ($\beta 11$) 2 (HM-L vs HV, $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la preñez y la lactancia tendrían diferentes efectos moduladores sobre la esteroidogénesis hipocámpica. Aún más, la lactancia y el cuidado materno resultarían indispensables para lograr un aumento en la expresión de ciertas enzimas claves implicadas en la vía de síntesis de los neuroesteroides. Según nuestra hipótesis, esto atenuaría la caída en los niveles de los mismos en la adultez, favoreciendo la plasticidad neuronal hipocámpica.

006. (54) EL KNOCK-OUT PARA TNFR1 (KOR1) PROMUEVE LA APOPTOSIS HEPÁTICA EN DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DBT2) GENERADA POR UNA DIETA RICA EN GRASA (HIGH FAT DIET, HFD)

Lambertucci, Flavia¹; Francés, Daniel E.¹; Molina, Celeste¹; Pisani, Gerardo²; Monti, Juan¹; Álvarez, María De L.¹; Roggero, Eduardo³; Carnovale, Cristina E.¹; Ronco, María T.¹
Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET¹ Cátedra de Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario² Instituto de Inmunología Clínica y Experimental (IDICER)-Universidad Nacional de Rosario³

La DBT2 es considerada un proceso inflamatorio con aumento de citoquinas como el TNF-alfa que al interactuar con el receptor TNFR1 inicia varias rutas de señalización intracelulares pudiendo conducir a apoptosis. Nos planteamos estudiar el rol del receptor TNFR1 en la inducción de apoptosis en hígado de ratones DBT2 generados por una dieta rica en grasa. Ratones adultos C57BL/6 wild type (WT) y KOR1 (n=6 c/u) fueron alimentados con dieta rica en grasa al 40% durante 16 semanas (HFD). Con la finalidad de caracterizar el establecimiento del modelo de DBT2 en KOR1, se determinaron: los niveles de glucemia plasmática (mg/dl, ayuno 4 h): HFD-WT: $167,75 \pm 6,9$; HFD-KOR1: $130 \pm 8,0^*$ ($*p < 0,05$); la prueba de tolerancia oral a la glucosa (2gr/kg p.c. de glucosa) que mostró en HFD-KOR1 un aumento significativo vs HFD-WT en los valores de glucosa plasmática a los 30 y 60 min, y la curva de tolerancia a la insulina (0,75U/kg pc de insulina corriente) que mostró una disminución significativa de los valores de glucosa plasmática a partir de los 30 minutos en HFD-KOR1 vs HFD-WT, evidenciando una mayor respuesta a la insulina exógena. Se analizó una de las vías de señalización activada por TNFR1 determinándose el nivel de la proteína pro-apoptótica Bid, por Western Blot en lisado total de hígado, observándose una disminución significativa del 60% en HFD-KOR1 vs HFD-WT ($p < 0,05$). Por otro lado, se observó un proceso de apoptosis aumentado al estimarlo por la actividad de caspasa 3 (caspasa efectora) (Unidad de intensidad de fluorescencia/tiempo): HFD-WT: 2039 ± 495 ; HFD-KOR1: $35.000 \pm 17.100^*$, y el índice apoptótico (expresado como $\% \times 10^{-2}$): HFD-WT: $2,67 \pm 0,42$; HFD-KOR1: $6,50 \pm 1,23^*$ ($*p < 0,05$ vs HFD-WT). Podemos concluir que la ausencia de TNFR1 induce un aumento de la respuesta a la insulina exógena e incrementa la apoptosis hepática generada por la DBT2 inducida por dieta rica en grasa.

007. (112) DOS NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN GLI2 EN PACIENTES ARGENTINOS CON DEFICIENCIA AISLADA DE GH Y DEFICIENCIA COMBINADA DE HORMONAS HIPOFISARIAS ACOMPAÑADA DE ALTERACIONES EN EL DESARROLLO DE LA NEUROHIPÓFISIS

Juanes, Matías Hernán¹; Marino, Roxana²; Ramírez, Pablo Cesar²; Pérez Garrido, Natalia²; Pasqualini, Natalia²; Ciccio, Marta²; Di Palma, Isabel²; Maceiras, Mercedes²; Lazzati, Juan Manuel²; Rivarola, Marco Aurelio²; Belgorosky, Alicia²

Hospital de Pediatría Garrahan.¹ Servicio de Endocrinología.²

Introducción: La deficiencia de hormona de crecimiento congénita (GHD) puede ser aislada (IGHD) o combinada con otra deficiencia de hormonas hipofisarias (CPHD). El Gli2 es un factor de transcripción Zinc-Finger que actúa río abajo en la vía de señalización del Sonic Hedgehog (SHH), la cual está implicada en la embriogénesis del cerebro y de la glándula hipófisis. Mutaciones en el gen *GLI2* han sido reportadas como causa IGHD y CPHD acompañada de alteraciones en el desarrollo de la neurohipófisis. **Objetivo:** Estudiar la presencia de alteraciones en el gen *GLI2* en una población de 19 pacientes con alteraciones en el desarrollo de la neurohipófisis, 18 pacientes con CPHD, y un paciente con IGHD, en el cual se descartaron alteraciones en los genes *GH1* y *GHRHR*. **Métodos:** Secuenciación directa del gen *GLI2* a partir de ADN genómico extraído de sangre periférica. Ensayos bioinformáticos (Polyphen2, SIFT y Mutation Taster) se utilizaron para predecir el efecto funcional de las variantes encontradas sobre la proteína. **Resultados:** Detectamos 2 variantes heterocigotas en el gen *GLI2*, p.Arg226Leu y p.Arg231Gln, en un paciente perteneciente al grupo con CPHD y en el paciente con IGHD, respectivamente. Ambas variantes afectan residuos altamente conservados y no fueron encontradas en las bases de datos de alteraciones génicas (Ensemble). Los ensayos bioinformáticos sugieren que las variantes afectan la función proteica y serían causa de enfermedad. **Conclusión:** Reportamos 2 nuevas alteraciones heterocigotas, no descriptas previamente, en el gen *GLI2* que alteran el dominio amino terminal represor del Gli2, que podría llevar a la desregulación de la actividad transcripcional en la vía de señalización SHH, generando una alteración temprana en la embriogénesis de la glándula hipófisis. La variabilidad del fenotipo clínico hallado podría sugerir que en alteraciones génicas en heterocigosis habría factores no conocidos que impactarían en la variabilidad de la expresión clínica.

008. (143) EFECTOS VASCULARES DEL ANDRÓGENO DEHIDROEPIANDROSTENEDIONA

Campelo, Adrián Esteban¹; Montt Guevara, María Magdalena²; Simoncini, Tommaso²; Massheimer, Virginia Laura¹ *Instituto de Investigaciones Biológicas y Biomédicas del Sur (INIBIOSUR), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur.*¹ *Laboratorio di Endocrinologia Ginecologica Cellulare e Molecolare - Università di Pisa - Italia.*²

En los últimos años se ha situado a la dehidroepiandrosterona (DHEA) como una alternativa para el tratamiento de condiciones hipoandrogénicas, promoviendo la formación local de esteroides activos a partir de este precursor. Se estudió el efecto vascular de DHEA, comparándolo con el de testosterona (T). Se evaluó la migración y proliferación de células endoteliales (CE) de cordón umbilical y la producción endotelial de PAI-1 y uPA, factores que regulan la re-endothelización vascular modulando la adhesión, proliferación y migración de CE. Mediante Western Blot observamos que mientras que T produjo un aumento significativo de la expresión de PAI-1 a todas las concentraciones (0,1nM; 1nM y 10nM) y tiempos ensayados (12, 24, 36 y 48h) con un estímulo del 60-80% s/Cont (p<0,05), su expresión no se afectó por DHEA (2nM; 20nM y 200nM). Demostramos que el efecto de T es dependiente de la participación del receptor de andrógenos e independiente de aromatización a estradiol. En cuanto a la expresión de uPA, 24h de tratamiento con DHEA incrementaron su expresión un 30% s/Cont, no observándose cambios significativos al ser expuestas las CE a T. A continuación procedimos a estudiar el efecto de los andrógenos sobre la proliferación de CE (ensayo de MTT) y la migración celular (ensayos de reparación de la herida). Los ensayos tiempo respuesta (12, 24, 36 y 48h) demostraron que a 24h de tratamiento, tanto T como DHEA estimulan el crecimiento celular (32% y 12% s/cont T 1nM y DHEA 20nM p<0,05). Se demostró también que ambos andrógenos promueven la movilidad celular (2±2; 16±4; 90±15 Cont; T 1nM; DHEA 20nM CE migrantes/campo p<0,01), siendo el efecto de DHEA marcadamente superior al de T (5,6 veces mayor). Los re-

sultados presentados sugieren que DHEA exhibe una acción más favorable en cuanto a la re-endothelización al disminuir la expresión de PAI-1 y estimular la de uPA, efectos que se corresponden con su mayor acción estimuladora de la migración celular.

009. (182) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES H4 A HISTAMINA EN CÉLULAS DE LEYDIG

Abiuso, Adriana María Belén¹; Berensztein, Esperanza²; Pagotto, Romina María¹; Pereyra, Elba Nora¹; Marcos, Alejandra¹; Correa Torrado, María Florencia¹; Besio Moreno, Marcos¹; Pignataro, Omar Pedro^{1,3}; Mondillo, Carolina¹ *Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) - CONICET*¹ *Laboratorio de Investigación, Servicio de Endocrinología, Hospital Garrahan*² *Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*³

El receptor H4 (H4R) a histamina (HA) es considerado un blanco terapéutico prometedor para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, alergia, inflamación, y cáncer. Sin embargo, el conocimiento acerca de su función y expresión en el testículo (T) es escaso. Previamente reportamos la existencia de H4R en las células de Leydig (CL) MA-10, y demostramos que su activación inhibe la esteroidogénesis estimulada por gonadotropinas. **Objetivo:** Profundizar en el estudio de la expresión del H4R testicular, evaluando también su posible participación en la regulación de la proliferación de las CL. **Métodos:** Se estudió la expresión de H4R por inmunohistoquímica en T de ratas de 7 a 240 días de edad. Luego se evaluó el efecto de VUF-8430 (VUF), agonista H4R, en ausencia o presencia de JNJ7777120 (JNJ77) o JNJ10191584 (JNJ101), antagonistas H4R, sobre la proliferación de las CL MA-10 y TM3, y de CL progenitoras (CLP) e inmaduras (CLI) purificadas a partir de T de ratas de 20 y 35 días de edad, respectivamente. La respuesta proliferativa de las CL se evaluó mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada y el método MTS. **Resultados:** Se observó expresión de H4R en las CL de todos los T analizados. Además, el tratamiento de 24 hs con VUF (1 a 10µM) inhibió significativamente la proliferación de las CL MA-10, TM3, CLP y CLI, observándose reversión del efecto con JNJ77 o JNJ101. Dado el 40% de homología entre H4R y el receptor H3 a HA (H3R), también se evaluó la respuesta proliferativa de las CL al agonista H3R R-α-metilhistamina (Rα), a fin de confirmar la especificidad de los efectos antes descriptos. Rα (1nM a 10µM) no modificó la proliferación de las CL. **Conclusión:** Estos resultados constituyen un primer paso hacia la comprensión de la importancia fisiológica y/o patológica de la expresión de H4R en el T, y deberían ser tenidos en cuenta en el diseño de agonistas H4R selectivos, a ser utilizados con fines terapéuticos (Subsidios: CONICET, ANPCYT, UBA y F. Roemmers).

010. (279) PAPEL DEL MICROARN LET-7F EN LA AUTORREGULACIÓN DE LA TIROIDES

Salvarredi, Leonardo¹; Thomasz, Lisa¹; Rossich, Luciano¹; Oglio, Romina¹; Perona, Marina¹; Rodríguez, Diego¹; Fusco, Alfredo³; Pisarev, Mario²; Juvenal, Guillermo¹ *Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)*¹ *Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*² *Institute Experimental Endocrinology and Oncology (IEOS)-CNR*³

Introducción: El yodo es utilizado por la tiroides para sintetizar hormonas tiroideas pero cumple además un papel regulatorio a través de la síntesis de iodolípidos como el 2-iodohexadecanal (2-IHDA). Los microARNs (miRs) son una clase de ARNs no codificantes asociados a procesos celulares como la proliferación celular, el desarrollo y la apoptosis. **Resultados preliminares** de nuestro laboratorio indican que el 2-IHDA regula positivamente la expresión del miR let-7f, asociado al control de la proliferación celular. **Objetivo:** Estudiar el papel de let-7f como intermediario del efecto del 2-IHDA sobre el crecimiento tiroideo *in vitro* e *in vivo*. **Metodología y Resultados:** La sobreexpresión del miR usando un precursor (pre-miR) redujo la proliferación celular (p<0,05) y la progresión del ciclo celular (p<0,05). El uso de un inhibidor del miR (anti-miR) en células tratadas con 2-IHDA revirtió este efecto

($p < 0,05$). El análisis *in silico* predijo a la ciclina D1 (CCND1) como gen target, validándose la unión del miR a la región 3'UTR del ARNm mediante un ensayo de reportero ($p < 0,05$). Se observó por qPCR y WB que el pre-miR redujo la expresión de CCND1 ($p < 0,05$). El uso del inhibidor revirtió este efecto ($p < 0,05$). Se estudió además la expresión de *let-7f* en un modelo *in vivo*. Ratas Wistar fueron tratadas por 10d con metilmercaptoimidazol (MMI), MMI junto a 2-IHDA o con una solución salina (grupo C). Se observó en las ratas tratadas con MMI una reducción en la expresión de *let-7f* (4,95 veces; $p < 0,05$ vs C) y un aumento del peso glandular (75% vs C), mientras que aquellas tratadas con MMI y 2-IHDA mostraron una restauración parcial en la expresión del miR (2,91 veces vs MMI) y una reducción del peso glandular (22% vs MMI). Conclusiones: *Let-7f* media parcialmente los efectos del 2-IHDA sobre la proliferación celular reprimiendo a nivel postranscripcional la expresión de CCND1. Podría cumplir además, un papel en el proceso de biogénesis y los efectos inhibitorios del 2-IHDA.

011. 356) LA OVARIETOMÍA FACILITA EL DESARROLLO DE UN PROLACTINOMA EXPERIMENTAL INDUCIDO POR ESTRÓGENOS. EFECTO DE LA PROGESTERONA, Y PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ESTEROIDEOS DE MEMBRANA

Camilletti, María Andrea; Faraoni, Erika; Calabró, Lara; Abeledo, Alejandra; Bottino, María Cecilia; Díaz-Torga, Graciela.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Previamente demostramos que la ovariectomía (OVX) reduce en la hipófisis la expresión de los receptores clásicos de esteroides e incrementa a los receptores no clásicos de membrana, tanto de estradiol (E2) como de progesterona (P4). Los receptores de P4 de membrana (mPR α , mPR β , mPR γ y Pgrmc1) y el receptor de E2 de membrana GPR30 han sido involucrados en efectos anti-apoptóticos y/o proliferativos en diferentes tejidos. Nosotros postulamos que el aumento que induce una OVX en la expresión de los mismos estaría determinando un entorno proliferativo en la glándula frente a la acción de esteroides. En el presente trabajo estudiamos el efecto de la OVX sobre el desarrollo de un prolactinoma experimental inducido por tratamiento crónico con estrógenos. Se generaron prolactinomas en ratas hembra Sprague Dawley adultas intactas u OVX, por implante subcutáneo de pellets de 20mg del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES, tratamiento de 4 semanas). Observamos que el efecto del DES fue más potente en las hembras OVX, donde el tratamiento estrogénico generó prolactinomas de mayor tamaño y una prolactinemia más elevada respecto a las ratas intactas DES. El tratamiento crónico estrogénico redujo la expresión de los receptores esteroideos de membrana en todos los grupos. Por último, un co-tratamiento con P4 (6,5mg/kg hidroxiprogesteronona, Proluton Depot, Schering, sc, 1 vez por semana), logró revertir el desarrollo del prolactinoma sólo en las hembras OVX. El presente trabajo demuestra que la OVX, al aumentar la expresión de los receptores esteroideos de membrana predispone a la hipófisis a un efecto proliferativo exacerbado de los estrógenos, efecto a tener en cuenta en los tratamientos de reemplazo hormonal en mujeres que han sido sometidas a una OVX.

012. (405) LA OVARIETOMÍA AUMENTA LA EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE LOS RECEPTORES NO CLÁSICOS DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL.

Camilletti, María Andrea; Bottino, María Cecilia; Faraoni, Erika; Abeledo, Alejandra; Calabró, Lara; Díaz-Torga, Graciela

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Además de los receptores esteroideos clásicos, han sido identificados, tanto para la progesterona (P4) como el estradiol (E2), otros receptores asociados a los efectos rápidos, no-genómicos, entre ellos a efectos anti-apoptóticos y/o proliferativos de los

esteroides. La función de los mismos a nivel hipofisario no ha sido aún estudiada. En este trabajo evaluamos la expresión proteica (Western Blot) de los receptores de P4 clásicos PR-A y PR-B, del receptor nuclear de estrógenos ER α ; y la expresión génica (qRT-PCR) de los receptores no clásicos de P4: mPR α , mPR β , mPR γ y Pgrmc1, y del receptor de E2 GPR30, en hipófisis de ratas hembra adultas (cepa Sprague Dawley) en diestro. Evaluamos también el impacto que induce en la expresión de los mismos la ovariectomía (OVX). Los receptores esteroideos clásicos (PR-A, PR-B y ER α) disminuyeron su expresión luego de la OVX. Todos los receptores de esteroides no clásicos (de membrana) se encontraron expresados en hipófisis. La OVX incrementó significativamente los niveles de expresión de los mismos. Dado que estos receptores esteroideos de membrana han sido involucrados a efectos anti-apoptóticos y/o proliferativos en diferentes tejidos consideramos que el aumento que induce una OVX en la expresión de los mismos a nivel hipofisario estaría determinando un entorno proliferativo en la glándula frente a la acción de esteroides. Esto debe ser tenido en cuenta en aquellos tratamientos de reemplazo hormonal en mujeres que han sido sometidas a una OVX.

REPRODUCCIÓN 1

013. (3) PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA 2 (COX2) EN MACRÓFAGOS

Matzkin, María Eugenia^{1,2}; Calandra, Ricardo Saúl¹; Frungeri, Mónica Beatriz^{1,2}

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Cátedra de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²

Previamente describimos la presencia de fibras nerviosas catecolaminérgicas y células símil-neuronas en el testículo humano en íntima asociación con la población de macrófagos (MAC). En biopsias de pacientes con infertilidad idiopática el número de elementos neuronales y MAC testiculares se halla significativamente elevado con respecto al observado en el testículo normal. Además, sólo el testículo humano infértil expresa ciclo-oxigenasa 2 (COX2), enzima clave en la síntesis de prostaglandinas. El objetivo de este trabajo fue analizar un posible efecto de epinefrina (E) y norepinefrina (NE) sobre la expresión de COX2 en MAC. Mediante microdissección por captura láser se detectó la expresión del receptor adrenérgico β 1 en MAC testiculares de individuos infértiles. Puesto que no pueden realizarse ensayos funcionales a partir del material de biopsias testiculares humanas, dos modelos experimentales alternativos son utilizados: MAC humanos no testiculares de la línea celular THP1 y MAC testiculares de roedores. La expresión de receptores adrenérgicos β 1- β 2- β 3 fue detectada por PCR en MAC THP1 y MAC testiculares de hámster. La incubación de MAC THP1 en presencia de 1 μ M de E, NE y los agonistas β -adrenérgicos Isoproterenol (I: agonista β 1- β 2- β 3) y Salbutamol (S: agonista β 2) estimuló la expresión de COX2 a nivel del ARNm y la proteína. Dicho efecto fue revertido por Propranolol (P: antagonista β 1- β 2; 1 μ M). (PCR en tiempo real COX2/GAPDH, Control: 1,0 \pm 0,6; E: 6,9 \pm 0,5*; NE: 3,1 \pm 0,7*; E+P: 0,9 \pm 0,6; NE+P: 1,5 \pm 0,7; I: 3,0 \pm 0,9*; S: 1,7 \pm 0,4+0,6*; I+P: 1,3 \pm 0,6; S+P: 0,3 \pm 0,3; P: 0,9 \pm 0,6; X \pm SEM * $P < 0,05$). En resumen, se describe la expresión del receptor adrenérgico β 1 en MAC testiculares de pacientes infértiles. En MAC THP1, COX2 fue estimulada a través de receptores β adrenérgicos. A continuación se evaluará el efecto de E y NE sobre COX2 en MAC testiculares de roedores. Nuestros resultados sugieren la importancia de E y NE como moduladores de procesos inflamatorios.

014. (8) ROL DE LOS RECEPTORES DE PROGESTERONA A Y B SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR TGF-BETA1 EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE PRESENTAN HIPERPLASIA DE CÉLULAS DE LEYDIG

González, Candela Rocío¹; Rulli, Susana Beatriz²; Vitullo, Alfredo Daniel¹; Calandra, Ricardo Saúl²; González-Calvar, Silvia Inés^{2,3}

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico Universidad Maimonides¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-² Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³

El Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF-β1) está involucrado en la modulación de la función testicular. Previamente hemos descrito un efecto proliferativo sobre células de Leydig (CL) inducido por TGF-β1 a través de su co receptor endoglina (EDG), el cual es inducido por progesterona (Pg) vía el factor de transcripción KLF14 (González y col, Cytokine 61:670-675, 2013). El objetivo de este trabajo fue estudiar en ratones (cepa FVB/n) infértiles que sobre expresan las subunidades alfa y beta de hCG (hCG+) y presentan un aumento en la esteroidogénesis testicular con altos niveles de Pg, testosterona y una marcada hiperplasia de las CL 1) la expresión proteica de EDG y receptor de Pg (PgR) por inmunohistoquímica; 2) la expresión génica del PgR subtipo A (PgRA) y B (PgRB) y KLF14 por Real time PCR en CL purificadas y 3) el efecto *in vitro* de TGF-β1 sobre la expresión de PgRA y B y KLF14 y de Pg sobre KLF14 por Real time PCR en CL purificadas. Se inmunodetectó EDG y PgR en CL, siendo la expresión de ambos receptores mayor en animales hCG+ respecto de WT (p<0,05). La expresión génica del PgRA y PgRB y KLF14 fue significativamente mayor en CL hCG+ respecto de CL WT (p<0,05). La expresión del PgRA fue significativamente mayor que PgRB en CL hCG+ (p<0,05). TGF-β1 (1ng/ml) aumentó la expresión génica en CL del PgRA y PgRB a los 30 minutos de incubación (p<0,05), teniendo un mayor efecto sobre el PgRA. TGF-β1 y Pg (10⁻⁶M) aumentaron significativamente la expresión génica de KLF14 a los 30 y 60 minutos respectivamente (p<0,05). El efecto de Pg sobre KLF14 fue revertido por la presencia de RU486 (antiprogéstágeno) en el medio. Estos resultados muestran que TGF-β1 estimula de manera diferencial los subtipos del PgR. Por otro lado, el aumento de PgRA inducido por TGF-β1 junto con el aumento de KLF14 inducido también por Pg estimularía la expresión de EDG conduciendo a una acción proliferativa de TGF-β1 en las CL que presentan hiperplasia.

015. (19) EFECTO DE METFORMINA SOBRE EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Rindone, Gustavo M; Regueira, Mariana; Galardo, María N; Pellizzari, Eliana H; Cigorruga, Selva B; Meroni, Silvana B; Riera, María F.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr César Bergadá (CEDIE)-CONICET-FEI-División de Endocrinología Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

En los últimos 50 años se ha observado una progresiva disminución en la función reproductiva masculina. Se ha postulado que ciertas drogas usadas para el tratamiento de diversas patologías podrían alterar la función testicular. La metformina (Met) es un hipoglucemiante ampliamente utilizado para el tratamiento de la diabetes y se desconoce si esta droga puede alterar la funcionalidad de la célula de Sertoli (CS), esencial para la espermatogénesis. Se ha postulado que la CS utiliza los ácidos grasos (AG) y no la glucosa para satisfacer sus necesidades energéticas. Diversas proteínas están involucradas en la oxidación de AG (OxAG) tales como el transportador de AG (FAT/CD36), la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1) y las deshidrogenasas de cadena media (MCAD) y larga (LCAD). El objetivo del presente trabajo fue analizar posibles efectos de Met sobre la OxAG y la expresión de genes involucrados en la misma en CS. Cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales (B) o incubados con Met (10mM) por 48hs. La OxAG se determinó incubando con ³H-palmitato y midiendo el ³H₂O resultante. Los niveles de ARNm de FAT/CD36, LCAD, MCAD se determinaron por RQPCR y los de CPT1 por Northern Blot. Se observó que Met disminuye la OxAG (B: 3,0±0,3; Met: 2,1±0,2* pmol palmitato/μg ADN X±DS,*p<0,05, n=3) y que esta disminución se acompaña con una menor expresión de FAT/CD36, CPT1 y MCAD (0,31±0,1*; 0,2±0,1* y 0,46±0,1*). Estos últimos resultados se expresan como veces de variación respecto al basal (X±DS,*p<0,05, n=3). Los resultados muestran que Met disminuye

la oxidación de AG y la expresión de genes que participan en este proceso en CS. Teniendo en cuenta que los AG constituirían la principal fuente energética de este tipo celular, es posible especular que el tratamiento con metformina podría comprometer el normal funcionamiento de la CS y resultar en una alteración de la función reproductiva (PICT2011N°677).

016. (22) CULTIVO DE FOLÍCULOS ANTRALES FELINOS COMO MODELO EXPERIMENTAL

Rojo, Julieta Laura; Linari, Martina; Musse, Mariana Paula; Peluffo, Marina Cinthia.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr Cesar Bergadá (CEDIE)-CONICET- FEI División de Endocrinología Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

El gato doméstico (*Felis catus*) al ser un animal de ovulación inducida (poliéstrico) posee en estro varios folículos preovulatorios naturalmente seleccionados en un estado denominado "ovulation-ready" esperando al pico de LH. Se han reportado características y mecanismos reproductivos femeninos muy conservados entre humanos y felinos, avalando su utilización para el estudio de procesos críticos en el ovario. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta a LH de folículos antrales felinos *in vitro*. Para esto, ovarios de gatas adultas (n=15) fueron utilizados y los folículos antrales (mayores a 0,5 mm) fueron aislados mecánicamente bajo lupa y cultivados individualmente en presencia (75 mIU/ml, grupo LH) o ausencia de LH (grupo control) durante 12 ó 24 hs. Al final del cultivo, los niveles de estradiol (E2) y progesterona (P4) fueron medidos en el medio. Del total de los folículos aislados uno era preovulatorio (3,5 mm) y los resultados de este folículo fueron analizados individualmente. Al final del cultivo y de acuerdo a lo esperado, los medios de cultivos provenientes de folículos en presencia de LH poseían mayores niveles de P4 (p<0,001) en comparación con su respectivo grupo control en ambos tiempos evaluados. Resultados similares fueron obtenidos para el E2, observándose niveles más elevados (p<0,05) en el grupo LH a las 12 y 24 hs. Se observó un amplio rango en los niveles hormonales obtenidos en cada grupo, pero cuando los mismos se analizaron de acuerdo al diámetro folicular estos parámetros no se correlacionaron. Sin embargo, la LH indujo niveles muy elevados de E2 y P4 en el medio proveniente del folículo preovulatorio (24 hs.). Estos resultados en forma conjunta demuestran que los folículos antrales felinos de diferentes tamaños (0,5-3,5 mm) son capaces de ser cultivados individualmente y responder a la LH *in vitro*, apoyando su uso para el estudio de la foliculogénesis, esteroidogénesis, eventos preovulatorios y biología folicular en general.

017. (50) EFECTO DE LA LEPTINA SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE TROFOBlastOS HUMANOS DE PRIMER TRIMESTRE

Toro, Ayelén Rayen¹; Sampayo, Rocío Guadalupe²; Pérez-Pérez, Antonio³; Maskin, Bernardo⁴; Sánchez-Margalet, Víctor³; Simian, Marina²; Varone, Cecilia¹.

Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA¹ Área de Investigaciones, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"² Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla³ Hospital "Profesor A. Posadas"⁴

La leptina es una proteína que fue descubierta en el tejido adiposo con la función de regular el balance energético del organismo. También se expresa en otros tejidos como mucosa gástrica, músculo esquelético y placenta, entre otros. La leptina posee un rol importante en reproducción ya que está involucrada en el desarrollo de la pubertad, el mantenimiento del embarazo y la protección del embrión frente al rechazo inmunitario. En nuestro laboratorio estudiamos la acción de la leptina en placenta humana. Trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la leptina promueve la proliferación e inhibe la apoptosis en células trofoblásticas humanas. Ya que durante la implantación embrionaria es primordial la capacidad de invasión del trofoblasto, en esta ocasión nos interesó comenzar a estudiar el papel de la leptina sobre

la migración e invasión de células trofoblásticas. Como modelo experimental utilizamos una línea celular de trofoblasto humano de primer trimestre (Swan-71). Utilizando el *ensayo de cierre de herida* estudiamos el efecto de leptina sobre la migración. Encontramos que en presencia de leptina el porcentaje de cierre de la herida es mayor, lo que indica que leptina estaría favoreciendo dicho proceso. Para examinar un posible efecto de leptina sobre la transición epitelio-mesenquimática de los trofoblastos, clave en procesos de invasión tisular, decidimos analizar la expresión de distintas proteínas de adhesión. Estudiamos mediante las técnicas de *Western blot* e *Inmunofluorescencia* el efecto de leptina sobre la expresión de E-Caderina, encontrando que leptina disminuye la expresión de dicha proteína de membrana. Este fenómeno es un marcador característico de la transición de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal. Examinamos también si el tratamiento con leptina generaba algún cambio en la expresión de $\beta 1$ Integrina y hallamos un aumento. La sobreexpresión de esta proteína se asocia a un aumento en la proliferación y la motilidad celular. En conjunto, estos resultados nos estarían indicando que leptina a su vez estaría incrementando la capacidad de invasión de estas células, promoviendo la transición epitelio-mesenquimática, siendo la aplicación de otras técnicas necesaria para poder afirmarlo con mayor certeza. Es sabido que los procesos de proliferación, migración e invasión son críticos durante la implantación embrionaria, y encontramos que leptina los estaría regulando positivamente, reforzando la noción de esta hormona como una importante citoquina placentaria.

- 018. (83) EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SP1 ESTÁ INVOLUCRADO EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA DEPENDIENTE DE ESTRADIOL EN PLACENTA**
Schanton, Malena¹; Gambino, Yésica¹; Maskin, Bernardo³; Sánchez Margalet, Víctor²; Varone, Cecilia¹
*Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA*¹ *Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla*² *Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, Buenos Aires*³

La leptina es una proteína expresada en placenta que durante la gestación regula la implantación y el desarrollo embrionario. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que el estradiol (E_2) regula la expresión de leptina placentaria a nivel transcripcional involucrando efectos genómicos y no genómicos. Sp1 es un factor de transcripción ubicuo. Al analizar el promotor de leptina se han hallado varios posibles sitios de unión para Sp1. Uno de ellos está presente dentro de la región identificada como PLE (enhancer de leptina placentaria), y podría regular la expresión de leptina en células de placenta. Esta región está presente en vectores que contienen regiones mínimas del promotor de leptina que responden a E_2 , por lo que es posible que Sp1 esté involucrado con receptores de estrógenos regulando la expresión de leptina placentaria. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de Sp1 en la expresión de leptina placentaria regulada por E_2 , empleando células BeWo como modelo experimental. Mediante transfecciones transitorias con vectores reporteros y la sobreexpresión de Sp1 o ERa observamos que la sobreexpresión de SP1 incrementó la actividad basal del promotor de leptina. Esta actividad no se ve aumentada por el agregado de E_2 . Por otro lado Sp1 aumenta la actividad del promotor al utilizar el reportero que contiene la región promotora del gen de leptina comprendida entre -1951 y -1887 pb que contiene a PLE y el efecto se pierde cuando en esta región se muta el sitio de unión a Sp1. Hemos determinado además que la acción ejercida por Sp1 sobre la expresión de leptina es dependiente de ERa ya que en células que expresan un siRNA contra este receptor Sp1 no tiene efecto 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 involucrando al factor de transcripción Sp1.

- 019. (99) CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLES POR HIPOXIA (HIFs) EN CÉLULAS DE SERTOLI (CS)**

Merlo, Joaquín; Regueira, Mariana; Riera, María F; Pellizzari, Eliana H; Cigorraga, Selva B; Meroni, Silvina B; Galardo, María N
Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr Cesar Bergadá (CEDIE)-CONICET- FEI, División de Endocrinología Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Los HIFs son factores de transcripción (FT) que regulan el metabolismo glucolítico y crecimiento celular. Están formados por la subunidad α ($HIF\alpha$), cuya estabilidad depende de los niveles de O_2 , y la β de expresión constitutiva. Existen 3 isoformas α , que se asocian con $HIF\beta$ y constituyen los FT activos $HIF1$, 2 y 3. Previamente demostramos que la estabilización de HIF aumenta la producción de lactato y que FSH aumenta la expresión de $HIF1\alpha$ en CS de rata de 20 días de edad (CS20). El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de las isoformas α en CS a través de la maduración y la posible participación de los HIFs en la regulación de la producción de lactato por FSH en CS20. En cultivos de CS de ratas de 8 (CS8), 20 y 31 (CS31) días de edad se determinaron los niveles de ARNm de $HIF1\alpha$, 2 α y 3 α . Se observó mayor expresión de $HIF1\alpha$ (CS8: $1,89\pm 0,54^a$; CS20: $0,73\pm 0,19^b$; CS31: $0,76\pm 0,1^b$) y de $HIF3\alpha$ (CS8: $4,16\pm 0,14^a$; CS20: $1,07\pm 0,30^b$; CS31: $0,28\pm 0,05^c$) en CS8. La expresión de $HIF2\alpha$ fue mayor en CS20 (CS8: $0,34\pm 0,4^a$; CS20: $1,08\pm 0,13^b$; CS31: $0,29\pm 0,11^a$). Resultados expresados como relación de la cantidad de ARNm $HIF\alpha/HPRT$ ($X\pm DS$; $n=3$), distintas letras indican diferencias significativas. Por otro lado, utilizando un agente que promueve la degradación de $HIF\alpha$ (LW6, $10\mu M$), se demostró la participación de HIF en la regulación por FSH de diversos mecanismos involucrados en la producción de lactato. En particular se observó que LW6 inhibe el estímulo de FSH ($100ng/ml$) sobre la producción de lactato (B: $9,98\pm 1,13^a$; FSH: $15,15\pm 0,31^b$; FSH+LW6: $9,94\pm 1,06^a\mu g/\mu gADN$), la entrada de glucosa a la célula (B: 267 ± 12^a ; FSH: 352 ± 7^b ; FSH+LW6: $226\pm 35^a dpm/\mu gADN$) y la expresión de Piruvato Kinasa M2 (FSH: $1,5\pm 0,2^a$; FSH+LW6: $1,0\pm 0,1^b$ veces con respecto a B). Los resultados demuestran una expresión variable de las isoformas $HIF\alpha$ con la maduración. Adicionalmente sugieren que dicho FT participa en la regulación por FSH de la producción de lactato, nutriente esencial para las células germinales. PICT2012-0666

- 020. (104) EXPRESIÓN DE LA FAMILIA GÉNICA DAZ (DELETED IN AZOOSPERMIA) EN LA LÍNEA GERMINAL TESTICULAR DEL HÁMSTER DORADO (MESOCRICETUS AURATUS)**

Moverer, Luciana M¹; Riedel Cánepa, Natalia¹; Leopardo, Noelia¹; Calandra, Ricardo Saúl²; González-Calvar, Silvia Inés²; Vitullo, Alfredo Daniel¹; González, Candela Rocío¹.
*Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico, Universidad Maimónides*¹ *Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET*²

La familia génica DAZ consiste de dos genes autosómicos Boule y Dazl y Daz en el cromosoma Y. Se expresan exclusivamente en las células germinales del testículo y son esenciales para el mantenimiento de la fertilidad. Se ha propuesto que Cdc25a (regulador del ciclo celular) sería modulado por Dazl y Boule. El hámster Dorado presenta ciclos reproductivos estacionales y la exposición a fotoperíodos cortos produce un descenso de LH, FSH y testosterona (regresión testicular). El objetivo de este trabajo fue analizar en testículos inmaduros (10, 20, 30 y 45 días) y adultos (90 días) mantenidos en fotoperíodo normal (14h luz:10h oscuridad) y adultos expuestos durante 16 semanas a fotoinhibición la expresión y variación con el fotoperíodo de Dazl, Boule y Cdc25a por inmunohistoquímica. También se analizó la expresión génica de Dazl y Boule en testículos adultos normales y regresionados por real time PCR. Dazl se detectó en espermatogonias (Spg) de animales inmaduros y adultos normales. La expresión de Boule y Cdc25a se detectó a partir de 20 días de edad en espermatoцитos primarios (Esp1) y a lo largo de toda la línea germinal. En animales regresionados Dazl se localizó en Spg y Boule y Cdc25a se detectaron en Esp1. La expresión génica

de Dazl en testículos regresionados fue significativamente mayor que en testículos normales ($p < 0,05$), mientras que la expresión génica de Boule fue menor en testículos regresionados respecto de normales ($p < 0,05$). Estos resultados indican que la expresión desde edades tempranas de Dazl y Boule sería importante para el desarrollo y mantenimiento de la línea germinal testicular y que su expresión testicular varía con el fotoperíodo. El aumento en la expresión de Dazl durante la regresión testicular sustentaría su función como un factor de sobrevivencia necesario para mantener un número adecuado de Spg que luego reanudarán el proceso de espermatogénesis durante la etapa reproductiva en condiciones de fotoperíodo normal.

021. (113) EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA MODULACIÓN DEL EJE REPRODUCTIVO DE LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (LAGOSTOMUS MAXIMUS), UN ROEDOR CON OVULACIÓN DURANTE LA PREÑEZ

Charif, Santiago Elías^{1,3}; Inserra, Pablo Ignacio Felipe^{1,3}; Schmidt, Alejandro Raúl¹; Di Giorgio, Noelia Paula^{2,3}; Proietto, Sofía¹; Yankelevich, Lorena¹; Lux-Lantos, Victoria^{2,3}; Vitullo, Alfredo Daniel^{1,2,3}; Dorfman, Verónica Berta^{1,2,3}. Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico de la Universidad Maimónides¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)³

El núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo sensa la información fotoperiódica e interviene en la modulación del eje reproductivo. Previamente encontramos variaciones en la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona luteinizante (LH) y ováricas en la vizcacha durante la preñez. Objetivo: estudiar la modulación luminica del eje reproductivo en este animal que presenta pseudo-ovulación durante la preñez y dos períodos gestacionales anuales con diferente eficiencia reproductiva. Se utilizaron vizcachas hembras adultas con preñez temprana (PTem), media (PMed) y tardía (PTar), y no preñadas sometidas a luz (Luz) u oscuridad (Osc) constante por 14 días. Mediante PCR cuantitativa se estudió la expresión hipotalámica de GnRH y de los receptores de melatonina MTR1 y MTR2, y pineal de la enzima sintetizadora de melatonina (AANAT). Se emplearon animales no preñados como control (CTL); $n=5$ /grupo. Por RIA se determinó la concentración de GnRH y LH, y por ELISA la de estradiol (E_2) y progesterona (Pg). Por inmunohistoquímica se evidenció expresión de MTR1 en neuropilo, neurofibras y membrana celular en los núcleos SCN y supraóptico, y de MTR2 en varicosidades axónicas del núcleo periventricular. La expresión de MTR1 y MTR2 resultó opuesta durante la gestación, con aumento significativo de MTR1 en PTar vs. PMed y disminución de MTR2 en PTar vs. PTem ($p < 0,05$). AANAT presentó expresión mayor durante la gestación comparado con animales no preñados ($p < 0,05$). Además, MTR1 mostró reducción significativa en Luz y Osc con respecto a CTL, sin variaciones en MTR2. La expresión de AANAT fue mayor en Luz vs. Osc y CTL ($p < 0,01$). No hubo diferencias en la expresión de GnRH, LH, E_2 y Pg entre los grupos Luz, Osc y CTL. Estos resultados indicarían que la elevada expresión de AANAT, tanto durante la preñez como con luz constante, no alcanzaría para inhibir el eje reproductivo. Además, la acción de MTR1 y MTR2 ocurriría en diferentes estadios gestacionales (PIP-CONICET 0225/2011)

022. (144) VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN Y LIBERACIÓN DE GnRH HIPOTALÁMICA EN LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (LAGOSTOMUS MAXIMUS) TRATADAS CON PROGESTERONA Y ESTRADIOL

Inserra, Pablo Ignacio Felipe^{1,3}; Charif, Santiago Elías^{1,3}; Yankelevich, Lorena¹; Proietto, Sofía¹; Schmidt, Alejandro Raúl¹; Di Giorgio, Noelia Paula^{2,3}; Vitullo, Alfredo Daniel^{1,3}; Dorfman, Verónica Berta^{1,3}. Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD) - Universidad Maimónides¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³

Los esteroides ováricos Estradiol (E_2) y Progesterona (P_4) ejercen retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis, manteniendo al eje Hipotalámico-Hipofisario-Gonadal (HHG) inhibido durante la preñez. Previamente, hemos demostrado que el eje HHG de la vizcacha se mantiene activo durante la preñez a pesar de niveles elevados de E_2 y P_4 , permitiendo reclutamiento folicular y pseudo-ovulación. Con el objetivo de estudiar si la síntesis y liberación hipotalámica de GnRH en la vizcacha es modulada por hormonas esteroides, se analizó su nivel de expresión por RIA y PCR cuantitativa y la expresión de los receptores de E_2 ($ER\alpha$ y $ER\beta$) y P_4 (PR). Se utilizaron vizcachas hembras adultas ovariectomizadas, tratadas 5 días con P_4 (5mg/kg/día, OVX+ P_4) o con E_2 (1mg/kg/día, OVX+ E_2). Como controles se utilizaron hembras SHAM y ovariectomizadas tratadas con solución fisiológica (OVX); $n=4$ /grupo. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la expresión proteica y del ARN mensajero en OVX+ P_4 y OVX+ E_2 vs. SHAM, con disminución de 15 y 3 veces respectivamente. Estas alteraciones fueron acompañadas de un aumento significativo ($p < 0,01$) en la expresión del mensajero para PR en OVX+ E_2 vs. SHAM y OVX. No se observaron variaciones en la expresión de $ER\alpha$ y β entre grupos. Por otro lado, se analizaron los pulsos de liberación de GnRH en explantos de hipotálamo de vizcachas tratados con P_4 , E_2 y sus inhibidores Mifepristona (RU486) y Tamoxifeno (TAM), respectivamente. Explantos incubados con buffer Krebs-Ringer se utilizaron como Control ($n=4$ /grupo). Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la cantidad de pulsos entre tratamientos con disminución del 50% en P_4 vs. Control, que fue revertida por RU486 (P_4 +RU486), y aumento significativo ($p < 0,01$) en la cantidad de pulsos en TAM vs. Control (33%), que resultó revertida por E_2 (E_2 +TAM). Estos resultados sugieren una acción preponderante de P_4 sobre E_2 en la inhibición del eje HHG en la vizcacha. PIP-CONICET 0225/2011

023. (155) EFECTO DE PGD2 SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO EN CÉLULAS DE SERTOLI DE LA LÍNEA CELULAR MURINA TM4

Rossi, Soledad P^{1,2}; Matzkin, María E^{1,2}; Windschuetl, Stefanie³; Rey, Verónica³; Calandra, Ricardo S¹; Mayerhofer, Artur³; Frungieri, Mónica B^{1,2}. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Cátedra de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Institute of Anatomy and Cell Biology, Munich, Alemania³

Las células de Sertoli brindan soporte estructural e intervienen en la proliferación y diferenciación de las células germinales a través del suministro de una amplia variedad de factores. Los mismos incluyen hormonas, sustratos energéticos y agentes pro- y anti-apoptóticos. Previamente, hemos descrito la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2), clave en la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), en células inmunes testiculares (macrófagos y mastocitos), de Leydig y de Sertoli. La línea celular murina TM4 expresa el receptor de PGD2 (DP), sugiriendo la participación de esta PG en la regulación de la actividad de las células de Sertoli. El objetivo de este trabajo ha sido investigar si PGD2 modula el estado oxidativo en células de Sertoli TM4. La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) fue evaluada por fluorimetría a través de la generación del compuesto fluorescente 2',7'-dichlorofluoresceína. PGD2 (1 μ M) aumentó significativamente la generación de ROS en células TM4. Este efecto fue revertido en presencia del agente anti-oxidante N-acetil-L-cisteína (NAC; 1mM) (unidades arbitrarias [UA], control: 868 ± 133 ; PGD2: $4464 \pm 464^*$; PGD2 + NAC: 1606 ± 80 ; NAC: 1132 ± 57 ; X \pm SEM; * $P < 0,05$). Asimismo, PGD2 estimuló significativamente la expresión [determinada por PCR en tiempo real (qPCR), luego de 30 min de incubación] de superóxido dismutasa 1 (SOD1) (valor arbitrario asignado al control: $1 \pm 0,09$; PGD2: $1,64 \pm 0,2^*$; X \pm SEM; * $P < 0,05$) y glutatión peroxidasa (GPX) (control: $1 \pm 0,2$; PGD2: $2,28 \pm 0,3^*$; X \pm SEM; * $P < 0,05$). PGD2 también estimuló la expresión [determinada por Western blot, luego de 5 hs de incubación] de catalasa (control: $1 \pm 0,1$; PGD2: $2,22 \pm 0,1^*$; X \pm SEM; * $P < 0,05$) y peroxirredoxina 1 (Pxr1) (control: $1 \pm 0,3$; PGD2: $2,06 \pm 0,25^*$; X \pm SEM; * $P < 0,05$) en células TM4. En resumen, estos resultados indican un rol

pro-oxidante de PGD2 en células de Sertoli murinas TM4, y proponen la activación del sistema anti-oxidante en respuesta al estrés oxidativo.

024. (191) TRATAMIENTOS DIETARIOS MATERNOS CON ACEITE DE OLIVA PREVIENEN LA PROGRAMACIÓN DE ALTERACIONES CARDÍACAS EN LA CRÍA DE RATA DIABÉTICA

Higa, Romina Daniela; Roberti, Sabrina Lorena; Capobianco, Evangelina; Jawerbaum, Alicia
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET

La diabetes materna induce cambios estructurales y funcionales en diferentes órganos fetales con consecuencias adversas en el crecimiento, desarrollo y metabolismo fetal y postnatal. El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) regula la remodelación tisular y las metaloproteasas (MMPs) tienen un rol clave en el clivaje de componentes de la matriz extracelular en el tejido cardíaco durante el desarrollo fetal. Previamente observamos que tratamientos dietarios maternos con aceite de oliva conteniendo 75% de ácido oleico, agonista de los receptores nucleares PPAR previenen anomalías en procesos de remodelación tisular en el desarrollo embrionario y placentario. El objeto de este trabajo es estudiar el efecto de una dieta materna rica en aceite de oliva sobre la cantidad de células apoptóticas y los niveles de CTGF y MMP2 en el corazón de la cría de ratas sanas y diabéticas. Metodología: Ratas con diabetes pregestacional se obtuvieron por administración de estreptozotocina y se aparearon con machos sanos. Se administró una dieta suplementada con 6% de aceite de oliva durante la gestación de ratas sanas y diabéticas. Se midió en el corazón de la cría de 21 días de edad el número de células apoptóticas (TUNEL) y los niveles de CTGF y MMP2 (inmunohistoquímica). Resultados: En el corazón de las crías de rata diabética se observa un incremento en el número de células apoptóticas (60%, $p < 0,05$) y en los niveles de CTGF (300%; $p < 0,001$) respecto al control y ambos parámetros disminuyen con el tratamiento dietario suplementado con oliva ($p < 0,01$). Sin embargo, no se observan modificaciones en los niveles de MMP2. Conclusión: La diabetes materna programa alteraciones en la remodelación tisular cardíaca e incrementa el nivel de apoptosis en el corazón de la cría. El tratamiento materno con una dieta rica en aceite de oliva disminuye las alteraciones observadas, mostrando protección ante la anómala programación intrauterina inducida por la diabetes materna.

025. (203) ALTERACIONES EN EL HÍGADO FETAL EN RATAS CON DIABETES GESTACIONAL INDUCIDA POR ANÓMALIA PROGRAMACIÓN INTRAUTERINA

Fornes, Daiana; White, Verónica; Capobianco, Evangelina; Jawerbaum, Alicia.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET

Patologías gestacionales afectan el desarrollo intrauterino y se vinculan con la inducción de daño metabólico en la proge. Nuestros estudios previos evidencian cambios en los niveles de receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) en distintos órganos fetales en la diabetes materna, y su vinculación con el daño de tipo pro-inflamatorio. Objetivo: Evaluar si en la cría (F1) de rata diabética (F0) se induce diabetes gestacional, y si se evidencian marcadores de daño de tipo pro-inflamatorio y desregulación del sistema PPAR en el hígado de los fetos de la F1. Metodología: Ratas sanas (control) y diabéticas (F0), obtenidas por administración de estreptozotocina se aparearon con machos sanos, al igual que sus crías en etapa adulta (F1). Previo a la gestación de la F1 y en el día 21 de preñez se evaluaron parámetros metabólicos. En el hígado fetal se determinaron por inmunohistoquímica: a) los niveles de marcadores pro-inflamatorios y vinculados a la remodelación de la matriz extracelular (metaloproteasa de la matriz 2 (MMP2) y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF)) y b) los niveles de PPAR γ y su coactivador PGC1 α . Resultados: Las crías de ratas diabéticas presentaron

diabetes gestacional (glucemia e insulinemia elevadas sólo en la gestación; $p < 0,05$). El hígado fetal de ratas con diabetes gestacional presentó mayores niveles de MMP2 (80%; $p < 0,02$) y CTGF (300%; $p < 0,001$) que en el control. Si bien en los fetos de rata con diabetes gestacional la expresión proteica de PPAR γ fue 3 veces mayor que en el control ($p < 0,001$), se encuentran disminuidos los niveles de su coactivador PGC1 α (75%, $p < 0,05$). Conclusión: La diabetes materna induce programación intrauterina de diabetes gestacional en su cría. Este nuevo modelo de diabetes gestacional presenta alteraciones metabólicas, y evidencia a nivel del hígado fetal daño pro-inflamatorio y anomalías en la vía de señalización PPAR γ /PGC-1 α posiblemente asociada a este daño.

026. (256) LA ACTIVACIÓN DE LAS PEQUEÑAS GTPASAS RHOA Y RAC1 DURANTE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA RESULTA EN LA FOSFORILACIÓN DE LIMK/COFILIN, LA CUAL ES ESENCIAL PARA LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL

Romarowski, Ana; La Spina, Florenza A¹; Battistone, María A¹; Cuasnicú, Patricia S¹; Vitale, Alejandra M¹; Visconti, Pablo E³; Krapf, Darío²; Buffone, Mariano G¹.
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario (IBR)-CONICET² Department of Veterinary and Animal Science, University of Massachusetts³

Las pequeñas GTPasas son importantes reguladores de la dinámica del citoesqueleto de actina a través de una vía de señalización que activa a la proteína quinasa LIM (LIMK). LIMK es activada por las quinasas PAK o ROCK por fosforilación en treonina 508 (pLIMK). El efector más conocido de pLIMK es COFILIN. La activación de LIMK resulta en la fosforilación de COFILIN en serina 3 (pCOFILIN). La fosforilación de COFILIN promueve tanto la nucleación de actina o su despolimerización. Dado que se sabe poco acerca de la participación de estas pequeñas GTPasas en la fisiología del espermatozoide, en particular, en el control de la polimerización de actina que se produce durante la capacitación, analizamos esta vía de señalización en espermatozoides de ratón. Se observó la expresión de RHOA/C, RAC1 y la mayoría de los efectores río abajo de estas proteínas, tales como PAK, ROCK, LIMK1/2 y COFILIN. LIMK se fosforila en Thr508 durante la capacitación, la cual se redujo drásticamente en condiciones no capacitantes o en presencia del inhibidor de PKA, lo que sugiere que este proceso está asociado a la vía AMPc/PKA. La inhibición de RHO, RAC y ROCK y no así de PAK1, también redujeron los niveles de pLIMK. Se observó que pLIMK se localiza en el flagelo y la cabeza de los espermatozoides. Además, los niveles de pCOFILIN aumentaron transientemente (a los 10 minutos de incubación y disminuyeron después de 30 minutos). La inhibición de LIMK1 resultó en una disminución de pCOFILIN. La inhibición de pLIMK produjo una disminución en los niveles de actina polimerizada durante la capacitación y en el porcentaje de espermatozoides reaccionados por estimulación con progesterona y ionóforo de calcio. En conclusión, las vías de señalización de RHO/ROCK y RAC están activas en el espermatozoide de ratón durante la capacitación, modulando los niveles de activación de LIMK/COFILIN, los cuales son esenciales para la polimerización de actina y la exocitosis acrosomal.

027. (270) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE IGF Y PROTEASA PAPP-A EN LA ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA

Rodríguez, Fernanda M; Colombero, Magalí; Salvetti, Natalia R; Ortega, Hugo H; Gareis, Natalia C; Hein, Gustavo J; Rey, Florencia.
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVet-Litoral), UNL-CONICET

El sistema IGF participa en la regulación del crecimiento, desarrollo y dominancia folicular. El IGF1 actúa mediante la unión específica a su receptor de membrana (IGFR1) y su biodisponibilidad es regulada por la interacción de las IGFbps y sus

proteasas. La PAPP-A es la principal proteasa reguladora de los niveles de IGF1 en bovinos y degrada a las IGF1s disminuyendo la afinidad de unión por los ligandos. Alteraciones en la expresión y función de miembros del sistema IGF podrían estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad quística ovárica (COD). Es por ello que, nos proponemos estudiar la expresión génica y proteica de IGFR1 y PAPP-A para evaluar su rol en la etiopatogenia de la COD. Mediante inmunohistoquímica indirecta se evaluó la expresión de IGFR1 en ovarios bovinos con COD espontánea e inducida con ACTH y de animales control. A partir de folículos terciarios pequeños, medianos, grandes y quistes se obtuvo líquido folicular para evaluar la expresión de PAPP-A por western blot, y células de la granulosa y de la teca para el análisis del ARNm de IGFR1 y PAPP-A por PCR en tiempo real. Se detectó ARNm de PAPP-A en células de la granulosa de folículos grandes y quistes sin diferencias entre grupos. En líquido folicular se determinaron niveles de PAPP-A en todos los grupos analizados con una mayor concentración en quistes comparados con folículos pequeños y medianos ($p < 0.05$). La expresión del ARNm de IGFR1 fue menor en células de la granulosa de quistes que en folículos terciarios grandes ($p < 0.05$). Sin embargo, la inmunomarcación de IGFR1 fue mayor en células de la granulosa de quistes espontáneos que en los folículos controles analizados. El incremento en la expresión de IGFR1 y de PAPP-A en quistes podrían indicar la necesidad de liberar y captar las bajas concentraciones de IGF1 ovárica presentes en vacas con COD, lo que evidenciaría un mecanismo de regulación intrafolicular clave en la funcionalidad ovárica y el desarrollo de la enfermedad.

028. (296) EVIDENCIAS DE LA PARTICIPACIÓN DE PYK2 EN EL PROCESO DE CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO

Battistone, María Agustina¹; Alvau, Antonio²; Salicioni, Ana María²; Visconti, Pablo²; Da Ros, Vanina Gabriela¹; Cuasnicú, Patricia Sara¹.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ University of Massachusetts - Amherst²

El proceso de capacitación del espermatozoide involucra un aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina (Tyr) mediada por la activación de PKA y la inactivación de las Ser/Thr fosfatasas por la familia de Tyr quinasas SRC, las cuales convergen a nivel de la fosforilación de los sustratos de PKA. Teniendo en cuenta que en el humano, la información disponible sobre la cascada de señales que llevan al aumento en la fosforilación en Tyr es limitada, el objetivo de este trabajo fue dilucidar eventos moleculares desencadenados entre los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA y los de fosforilación en Tyr durante la capacitación del espermatozoide humano. Los resultados revelaron la presencia en los espermatozoides de la Tyr quinasa rica en prolina 2 (PYK2), uno de los miembros de la familia de quinasas de adhesión focal. Además, observamos un aumento en la activación de esta quinasa durante la capacitación al analizar los niveles de auto/trans fosforilación de PYK2 por Western blot. Los resultados obtenidos al exponer a los espermatozoides capacitados al inhibidor específico de esta quinasa, PF431396, mostraron que PYK2 sería la responsable del incremento observado en la fosforilación en Tyr río abajo de la activación de PKA. A su vez, la presencia de PF431396 afectó eventos funcionales de la capacitación tales como la hiperactividad, la reacción acrosomal inducida por progesterona, y la capacidad de los espermatozoides tanto de penetrar la matriz del cumulus de ratón como de fertilizar a los ovocitos (de hámster sin *zona pellucida*). En conjunto, estas observaciones indican que PYK2 sería la Tyr quinasa responsable del aumento en la fosforilación en Tyr río abajo de los niveles de fosforilación de los sustratos de PKA, y que la misma sería relevante para el desarrollo de la capacidad fertilizante durante el proceso de capacitación.

029. (297) LA PROTEÍNA CRISP1 DEL CÚMULUS COMO MODULADORA DE LA MOTILIDAD Y ORIENTACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE A TRAVÉS DE SU CAPACIDAD DE REGULAR CANALES DE CALCIO

Weigel Muñoz, Mariana¹; Battistone, María A¹; Vasen, Gustavo¹; Orta, Gerardo²; Figueiras-Fierro, Dulce²; De La Vega- Beltran, José Luis²; Curci, Ludmila¹; Guidobaldi, Alejandro³; Giojalas, Laura³; Darszon, Alberto²; Cohen, Débora J.¹; Cuasnicú, Patricia S. ¹.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México² Centro de Biología Celular y Molecular (CEBICEM)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba³

Recientes estudios de nuestro grupo indican que la proteína CRISP1 (Cysteine Rich Secretory Protein) presente mayoritariamente en el tracto reproductor masculino, es expresada también por las células del cúmulus que rodean al ovocito, donde cumpliría un rol orientador de los espermatozoides durante la etapa de penetración del cúmulus. En base a ello, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el mecanismo por el cual CRISP1 regula dicho proceso. Dado que la orientación de un espermatozoide está vinculada al movimiento de su flagelo, en primer lugar evaluamos el efecto de CRISP1 sobre la hiperactividad (HA), motilidad vigorosa característica de los espermatozoides capacitados. Los resultados indicaron que la población de espermatozoides expuestos a CRISP1 presentaba una disminución significativa en el porcentaje de HA respecto a los controles. Más aun, observamos que el porcentaje de HA de la población orientada era significativamente menor que el de la no orientada. El efecto de CRISP1 sobre la HA fue luego confirmado a través de la evaluación objetiva de diferentes parámetros de motilidad asociados a la HA mediante CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Teniendo en cuenta el rol crítico que juega la movilización de Ca^{2+} en la motilidad espermática, posteriormente evaluamos la capacidad de CRISP1 de regular canales iónicos. Los resultados mostraron que CRISP1 nativa, pero no así desnaturalizada, fue capaz de inhibir tanto la corriente basal de Ca^{2+} como la estimulada por mentol, indicando la capacidad de la proteína de regular al canal de Ca^{2+} TRPM8. En conjunto, estos resultados indican que CRISP1 sería capaz de regular la motilidad y orientación de los espermatozoides a través de su capacidad de regular canales de Ca^{2+} , apoyando la existencia de un novedoso mecanismo de modulación fina de la orientación y de la HA del espermatozoide necesaria para la correcta penetración del cúmulus durante el proceso de fertilización.

METABOLISMO/NUTRICIÓN 1

030. (14) EL SUERO LÁCTEO COMO FUENTE DE PROTEÍNAS DIETARIAS DISMINUYE LA INGESTA ENERGÉTICA REGULANDO LA EXPRESIÓN DE NEUROPEPTIDOS HIPOTALÁMICOS PERO ALTERA EL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

Andreoli, María Florencia^{1,2}; Stoker, Cora^{1,2}; Lazzarino, Gisela P.^{1,2}; Luque, Enrique H.²; Ramos, Jorge G.^{1,2}.

Facultad de Bioquímica, Universidad Nacional del Litoral¹ Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)-CONICET-UNL²

Los lácteos son conocidos por aumentar la saciedad. Sin embargo, la contribución de las fracciones proteicas (caseína o suero) en la regulación de la ingesta ha recibido poca atención. El hipotálamo recibe y traduce señales relacionadas al status energético, produciendo los péptidos orexígenos NPY (neuropéptido Y) y AgRP (proteína relacionada al agouti) y los anorexígenos CART (transcripto relacionado a cocaína-anfetaminas) y POMC (pro-opiomelanocortina). Nuestro objetivo fue evaluar modificaciones metabólicas y neuroendócrinas en un modelo de ratas alimentadas con suero lácteo. Ratas Wistar macho fueron alimentadas por seis semanas con dieta control (C) AIN 93M con caseína como fuente proteica, o con dieta S, donde se reemplaza la caseína por suero lácteo. Durante la experiencia se midió ingesta energética, peso corporal y se realizó un test de tolerancia a la glucosa (TTG). Al sacrificio se recolectó sangre troncal, se diseccionó el hipotálamo y se pesaron parches de tejido adiposo. Se evaluó la expresión

hipotalámica de NPY, AgRP, POMC, CART, receptores de leptina e insulina utilizando RT-PCR cuantitativa. Se midieron niveles circulantes de glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol. Aunque el peso corporal y de los parches adiposos no se alteró, en las ratas alimentadas con S la ingesta energética fue un 18% menor ($p < 0,001$), mediada por una respuesta anorexígena con incremento del 50% en la expresión de POMC ($p < 0,05$) y de un 40% de CART ($p < 0,05$). La expresión de AgRP, NPY y de los receptores no se vio modificada. La dieta S disminuyó un 58% los niveles circulantes de triglicéridos ($p < 0,001$) y un 47% los de colesterol ($p < 0,001$). La glucemia se vio incrementada un 40% ($p < 0,05$), la insulina un 26% ($p < 0,05$) y el área bajo la curva del TTG un 29% ($p < 0,05$). Concluimos que S afecta la ingesta energética al regular la expresión de neuropéptidos hipotalámicos, beneficia el perfil de lípidos circulantes pero produce intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia.

031. (34) CAMBIO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA COLÓNICA POR EL CONSUMO DE UNA MEZCLA PREBIÓTICA Y SU EFECTO SOBRE PARÁMETROS QUE FAVORECEN LA DIGESTIBILIDAD Y RETENCIÓN DE MINERALES NECESARIOS PARA ALCANZAR EL PICO DE MASA ÓSEA: MODELO EXPERIMENTAL

Zeni Coronel, Magalí¹; Bryk, Gabriel^{1,2}; Mandalunis, Patricia³; Del Río, María Ester⁴; De Portela, María Luz⁴; Zeni, Susana Noemí^{1,2}.

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Óseas, Hospital de Clínicas, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ Cátedra de Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires² Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires³ Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴

El tipo de microflora gastrointestinal constituye uno de los principales factores que influyen en el estado de salud y crecimiento normal. Durante la fermentación, las enzimas microbianas generan diversos metabolitos que inducen efectos locales y sistémicos importantes en el hospedador. Ciertos oligosacáridos no digeribles (OSND) modifican la composición de la microflora colónica a favor de lactobacterias, induciendo un cambio en la actividad enzimática. Objetivo: evaluar el efecto del consumo de una dieta con aporte normal de minerales y vitaminas conteniendo una mezcla 9:1 de Galactooligosacáridos (GOS) y Fructooligosacáridos (FOS)[®] sobre el cambio en la actividad de enzimas potencialmente beneficiosas y/o patógenas y su efecto sobre la salud ósea. Ratas machos Wistar al destete recibieron una de dos dietas normo-proteicas (18%) conteniendo minerales y vitaminas según AIN'93-G sin o con agregado de 5% GOS/FOS[®] (C y P, respectivamente) hasta los 40 días de vida. Se midió consumo de alimento, peso (PC), talla corporal (TC), desarrollo de lactobacilos (DL), actividad enzimática de b-glucosidasa, b-glucuronidasa, ureasa y triptofanasa en materia fecal, semanalmente. Al final de la experiencia se midió: pH cecal, absorción de Ca y fósforo (P), volumen óseo (BV/TV), ancho total del cartílago epifisario (GPC.Th) y ancho del cartílago hipertrófico (HpZ.Th). Al final del estudio no existieron diferencias en PC, TC y GPC.Th. P vs C mostró un aumento en b-glucosidasa ($p < 0,01$); DL ($p < 0,0001$); absorción de Ca ($p < 0,005$); (BV/TV) y (HpZ.Th) ($p < 0,05$) y disminuyó b-glucuronidasa, ureasa y triptofanasa ($p < 0,01$) y pH cecal ($p < 0,0001$). Conclusión: El consumo de la dieta conteniendo la mezcla prebiótica indujo un aumento en la actividad de enzimas potencialmente beneficiosas en detrimento de otras potencialmente patógenas, favoreciendo una mejor digestibilidad y retención de minerales implicados en la adquisición del máximo pico de masa ósea. © N.V.Nutricia

032. (52) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS (AG) EN LA CÉLULA DE SERTOLI (CS) POR FSH Y bFGF

Regueira, Mariana; Riera, María F; Galardo, María N; Pellizzari, Eliana H; Camberos, María C; Cigorruga, Selva B; Meroni, Silvina B.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr César Bergadá (CEDIE)-CONICET, División de Endocrinología Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Fundación de Endocrinología Infantil (FEI)-CONICET

La CS, componente somático del tubo seminífero, provee el soporte estructural y nutricional para el desarrollo de las células germinales. La CS metaboliza glucosa a lactato, principal sustrato energético para las células germinales. Se ha postulado que la CS utiliza AG como fuente energética propia. En tejidos que metabolizan AG, se encuentran regulados diversos genes que participan en dicho proceso. Entre ellos: el transportador de AG (FAT/CD36), la carnitina palmitoil-transferasa1 (CPT1, esencial para la entrada de AG a la mitocondria) y las deshidrogenasas de cadena media (MCAD) y larga (LCAD). El objetivo del trabajo fue analizar si la expresión de dichos genes es regulada por FSH y bFGF en CS. Cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron incubados en condiciones basales o bajo estímulo con FSH (100ng/ml) o bFGF (30ng/ml) por 24hs. Se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 por Northern Blot y de LCAD, MCAD, FAT/CD36 por RQPCR. Se observó que FSH estimula la expresión de FAT/CD36 y CPT1 ($2,9 \pm 0,1^*$; $1,7 \pm 0,1^*$ respectivamente) y que bFGF solo estimula la de CPT1 ($1,6 \pm 0,1^*$) ($X \pm DS$, * $p < 0,05$, $n=3$, veces de estímulo con respecto al basal). Dado que hemos demostrado que estos genes se encuentran regulados en parte por la activación de PPAR β/δ en la CS, el segundo objetivo de este trabajo fue evaluar la participación del PPAR β/δ en la regulación hormonal observada. Para ello, cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron incubados con FSH o bFGF, en ausencia o presencia de GSK3787 (GSK, Inhibidor farmacológico de PPAR β/δ). La inhibición del PPAR β/δ no modificó los estímulos de FSH mientras que inhibió el estímulo de bFGF. En su conjunto estos resultados sugieren que el transporte y metabolismo de AG, sustratos que constituyen la principal fuente energética de la CS, son regulados hormonalmente y que en dicha regulación participaría diferencialmente la activación de PPAR β/δ . (PIP 2012; N°187)

033. (57) UNA DIETA ALTA EN GRASA EN DISTINTOS PERÍODOS PRODUCE UN AUMENTO DE LOS PROSTANOIDES VASOCONSTRICTORES EN LA RATA

Sánchez Eluchans, Nahuel Mariano; Lee, Hyun Jin; Merlo, Julieta Soledad; Donoso, Adriana Susana; Peredo, Horacio Angel; Puyó, Ana María.

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Una dieta alta en grasa (DG) desarrolla resistencia a la insulina, fenómeno asociado a alteraciones hemodinámicas como el incremento de la presión arterial (PA). Estudiamos en tres períodos de tratamiento (4, 8 y 12 semanas), el efecto de la misma sobre parámetros metabólicos, PA y la producción de prostanoideos (PR, metabolitos del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa que tienen efectos vasoactivos) en el lecho mesentérico de ratas Sprague-Dawley macho. Se utilizaron seis grupos: control (C4, C8 y C 12, $n=4$, dieta normal); y con DG (DG4, DG8 y DG12, $n=4$, DG: 50% en peso de grasa bovina adicionada a la dieta normal). Los animales se sacrificaron a las 4, 8 y 12 semanas y se midieron glucosa, triglicéridos (kits comerciales) e insulina (ELISA) en plasma. Los lechos mesentéricos fueron incubados en Krebs y los PR liberados se determinaron por HPLC. La PA sistólica (PAS) se midió por método indirecto. La DG aumentó el peso del hígado en la semana 12 (DG12, $13,3 \pm 0,7$ g vs. C12, $11,1 \pm 0,8$, $p < 0,05$); la glucemia (DG8, 149 ± 3 mg/dl vs. C8, 112 ± 9 ; y DG12, 141 ± 9 vs. C12, 127 ± 7 , $p < 0,05$); la insulinemia (DG8, $3,5 \pm 0,5$ ng/ml vs. C8, $1,6 \pm 0,2$; y DG12, $3,4 \pm 0,6$ vs. C12, $1,1 \pm 0,2$, $p < 0,05$) y la PAS (DG8, 150 ± 9 mmHg vs. C8, 125 ± 1 ; DG12, 149 ± 3 vs. C12, 121 ± 6 , $p < 0,01$) a partir de la semana 8. Los triglicéridos aumentaron en los 3 períodos (DG4, 100 ± 16 mg/dl vs. C4, 56 ± 8 ; DG8, 110 ± 6 vs. C8, 62 ± 11 ; DG12, 177 ± 45 vs. C12, 91 ± 18 , $p < 0,05$). Por otra parte, DG aumentó la liberación de los PR vasoconstrictores tromboxano (TX)₂, metabolito estable del TXA₂, (DG4, 92 ± 5 ng/mg de tejido

vs. C4, 67±9; DG8 117±10 vs. C8, 72±7; DG12, 123±12 vs. C12, 71±6, p<0,05); y prostaglandina F₂alfa (DG4, 139±12 mg/dl vs. C4, 8415; DG8, 154±15 vs. C8, 93±5; DG12, 160±13 vs. C12, 87±9, p<0,05) en los 3 períodos. Se concluye que el efecto de la DG sobre la PAS podría atribuirse en parte al aumento de la producción de PR vasoconstrictores en el lecho mesentérico en todos los períodos estudiados.

034. (59) ALTERACIONES EN LAS CÉLULAS PRECURSORAS ADIPOCITARIAS AISLADAS DE TEJIDO ADIPOSO ABDOMINAL (TAA) DE RATAS QUE CONSUMIERON UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA (DRF)

Zubiría, María Guillermina¹; Moreno, Griselda³; Spinedi, Eduardo²; Giovambattista, Andrés¹.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-CONICET¹ Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET² Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos-(IIFP)-CONICET³

El SM se caracteriza por el aumento de la masa de TAA, fundamentalmente en relación con una marcada hipertrofia celular. Previamente describimos la hipertrofia del TAA y el aumento de la capacidad adipogénica *in vitro* de Células Precursoras Adipocitarias (CPAs) luego del consumo de una DRF durante 3 semanas. En el presente trabajo evaluamos el número, el estado de competencia y la capacidad adipogénica *in vitro* de CPAs aisladas del TAA de ratas alimentadas con DRF durante 8 semanas (DRF; 10% F p/v en el agua de bebida). El día experimental se diseccionó y pesó el TAA (retroperitoneal) de ratas macho adultas alimentadas con dieta normal (control, CTR) o DRF. Se aislaron los adipocitos maduros, para cuantificar tamaño celular, y la Fracción Estroma Vascular (FEV), para determinar el número de CPAs (citometría de flujo) y la expresión de diversos marcadores de adipogénesis (qPCR). Adicionalmente, se indujo la diferenciación de células de la FEV en cultivo cuantificándose (al día 10) el porcentaje de células diferenciadas (tinción PAP) y el contenido lipídico intracelular (Oil Red O). La masa de TAA de ratas DRF fue mayor (p<0,05) que en el grupo CTR. Las células de la FEV del grupo DRF expresaron niveles de factores anti-adipogénicos (Pref-1 y Wnt10b) similares al los del grupo CTR, aunque niveles mayores (p<0,05) de factores de competencia (PPAR γ 2 y Zfp423) y un mayor número de CPAs (p<0,05). Los adipocitos DRF diferenciados *in vitro* mostraron mayor (p<0,05) contenido lipídico y porcentaje de diferenciación *in vitro*. La distribución de tamaños de adipocitos aislados de los animales DRF indicó dos poblaciones: una de mayor y otra de menor tamaño (presumiblemente adipocitos nuevos) que en el CTR (p<0,05). Estos resultados sugieren que el consumo prolongado de una DRF genera una expansión hipertrófica del TAA y activa la adipogénesis, esto último probablemente como consecuencia de los aumentos en el número y en el estado de competencia de las CPAs. PICT20130930

035. (67) CÓMO INFLUYE EL AUMENTO DE ADIPONECTINA SOBRE EL CUADRO LIPÍDICO E INFLAMATORIO EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN HEMODIÁLISIS

Cacciaguio, Leonardo Damián¹; López, Graciela¹; Demarzianni, Guillermo²; Elbert, Alicia²; Schreier, Laura¹; González, Ana Inés¹.

Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)-UBA¹ Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial (CEREHA)²

En pacientes con enfermedad crónica renal terminal la mortalidad por causas cardiovasculares se encuentra marcadamente elevada, aún en los pacientes bajo tratamiento sustitutivo de hemodiálisis (HD). La adiponectina (ADP) es una citoquina antiinflamatoria e insulino sensibilizante que disminuye en condiciones de insulino resistencia (IR) pero en pacientes HD se encuentra paradójicamente elevada. Objetivo: evaluar si el aumento de ADP en pacientes HD se asocia con un cuadro metabólico e inflamatorio más favorable. Se estudiaron 120 pacientes en HD.

Se midió ADP total (ELISA) y según la mediana de la población se conformaron 2 grupos: ADP alta (ADP-a) \geq 18,0 μ g/mL (18,0-33,2) y ADP baja (ADP-b) <18,0 (4,3-17,9). Ambos grupos no presentaron diferencias en edades (p=0,99), tiempo de HD (p=0,26) y frecuencia de diabetes (p=0,12). Se tomaron medidas antropométricas, se determinaron parámetros de IR, perfil lipídico e inflamatorio. El grupo ADP-a, mostró una mejora en triglicéridos (TG) (116±55 vs 159±80 mg/dL, p<0,001) y HDL (44±12 vs 39±14 mg/dL, p=0,03). Los ácidos grasos libres (p=0,87) y LDL (p=0,54) no mostraron diferencias. Asimismo, ADP-a demostró mejora en parámetros de IR vs ADP-b: insulina, mediana (rango): 8,0 (2,0-32,9) vs 12,7 (2,0-44,9) UI/L y HOMA-IR: 1,57(0,30-10,70) vs 2,24 (0,31-9,65) (p<0,004). Indicadores inflamatorios no demostraron diferencias entre ambos grupos: Interleuquina-6 (p=0,79) y hsPCR (p=0,21). ADP se asoció positivamente con HDL (r=0,33, p<0,001) y negativamente con TG, insulina y HOMA-IR (r=-0,27, p<0,001; r=-0,28, p=0,02; r=-0,30, p=0,01 respectivamente). Conclusión: La ADP elevada en pacientes HD cumpliría con su acción favorable sobre el perfil lipídico e insulino-sensibilización, pero no beneficia su acción anti-inflamatoria.

036. (89) EL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA Y LA GÉNESIS DE LA LESIÓN ATROSCLERÓTICA

Cepeda, Sabrina B.; Sandoval, Marisa J.; Massheimer, Virginia.

Depto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Instituto de Investigaciones Biológicas y Biomédicas del Sur (IBIOSUR)-CONICET-UNS, Bahía Blanca

La interacción endotelio plaqueta es uno de los eventos iniciales de la aterogénesis. La calcificación vascular representa la etapa más avanzada, caracterizada por la transdiferenciación osteogénica de células vasculares inducida por el ambiente inflamatorio. La ingesta de fitoestrógenos (FE) como suplementos dietarios es propuesta como protectores frente a la enfermedad cardiovascular y osteoporosis. Objetivo: evaluar el efecto del FE Genisteína (Gen) sobre la adhesión de plaquetas (AP) al endotelio, y el cambio fenotípico de la célula muscular lisa vascular (CMLV) a osteoblasto (OB). Sistemas experimentales: cultivos primarios de CE y de CMLV de aorta murina; plaquetas aisladas de sangre entera. El tratamiento de las CE con Gen 10 nM (24 h) previo al agregado de las plaquetas redujo en un 47% la adhesión plaquetaria (p<0,01). La transdiferenciación ósea de CMLV (CMLV-OB) se indujo por cultivo prolongado con glicerofofato y calcio. Las CMLV-OB presentaron elevados niveles actividad fosfatasa alcalina (FAL) y aumento de depósito de calcio extracelular (FAL: 438±35 vs 34±2 UI/mg prot; Ca:71±9 vs 28±2 mg/mg prot, CMLV-OB vs CMLV nativas, p<0,01), ambos marcadores de diferenciación osteoblástica, validando de esta forma el modelo de transdiferenciación. El tratamiento (24hs) de CMLV-OB con Gen 10 nM disminuyó ambos marcadores (FAL 33%; Ca 38% vs control, p<0,01). La disminución de los nódulos de calcio se corroboró por tinción con Alizarina. Evaluamos el efecto del FE sobre la diferenciación de células óseas, empleando preosteoblastos de calvaria murinos y la línea osteoblástica MC3T3. La Gen (24hs) aumentó la expresión de FAL (130% s/c, p<0,05), y los depósitos extracelulares de calcio (50% s/c, p<0,05) en ambos tipos celulares. Los resultados sugieren una potencial acción beneficiosa del FE a nivel vascular (atenuando la génesis de la lesión ateromatosa) y a nivel óseo favoreciendo la diferenciación de OB (evento indispensable para la remodelación ósea).

037. (111) AUMENTO DE CAPACIDAD DE EFLUJO DE COLESTEROL EN EL SÍNDROME METABÓLICO: RELACIÓN CON LCAT Y ALTERACIONES CUALITATIVAS EN HDL

Lucero, Diego¹; Sviridov, Denis²; Fassio, Eduardo³; Freeman, Lita²; Remaley, Alan T²; Schreier, Laura¹.

Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Depto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)-UBA¹ Lipoprotein Metabolism Section. NHLBI. National Institutes of Health. Bethesda, MD, Estados Unidos² División Gastroenterología, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas"³

El síndrome metabólico (SM) se asocia con cambios cuali- y cuantitativos en HDL. No se conoce si, más allá de su concentración plasmática disminuida, las alteraciones cualitativas de HDL en el SM afectan su función antiaterogénica, determinada como la capacidad de realizar eflujo de colesterol (EC) desde los tejidos. Objetivo: evaluar la relación entre la capacidad de EC y las características de HDL en el SM. Se estudiaron 30 pacientes con SM (ATPIII) y 15 controles sanos. Se obtuvo suero en ayunas y se determinó perfil lipídico, sub-fracciones de HDL por RMN, se aisló HDL por ultracentrifugación y se caracterizó su composición. Se evaluó la capacidad de EC del suero depletado en ApoB utilizando células BHK transfectadas con los transportadores ABCA1 o ABCG1, y se midió masa de lecitina:colesterol acil transferasa (LCAT) por ELISA. Como era esperado, el grupo SM presentó triglicéridos (TG) aumentados y c-HDL disminuido ($p < 0,01$). HDL en SM mostró mayor contenido de TG-HDL% ($p = 0,04$), menor masa total con menor número de partículas HDL grandes y HDL pequeñas $\alpha 3$ y $\alpha 4$ ($p < 0,02$), sin diferencia en HDL medianas ($p = 0,894$). La capacidad de EC por ABCA1 fue mayor en SM ($10,4 \pm 1,8$ vs $8,7 \pm 0,3$; $p < 0,01$) sin cambios en el EC mediante ABCG1 ($p = 0,519$). El EC a través de ABCA1 correlacionó positivamente con TG-HDL% ($r = 0,72$; $p = 0,002$) y negativamente con HDL $\alpha 3$ y $\alpha 4$ ($r = -0,51$; $p = 0,01$). La masa de LCAT tendió a disminuir en SM ($5,5 \pm 0,9$ vs $5,9 \pm 0,5$ $p = 0,08$), y se asoció positivamente con HDL $\alpha 3$ y $\alpha 4$ ($r = 0,52$; $p = 0,003$) y negativamente con el eflujo por ABCA1 ($r = -0,51$ $p = 0,004$). Paradójicamente, HDL en SM presentó mayor funcionalidad a pesar de su masa disminuida y alteraciones en composición y sub-fracciones que se producirían por acción de factores remodeladores activados. La ligera disminución de LCAT beneficiaría el eflujo de colesterol posiblemente debido a favorecer la acumulación de las pre- $\beta 1$ -HDL funcionantes.

038. (139) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ACUOSOS DE ROSMARINUS OFFICINALIS

Bastone, Antonella Lucía; Lasagni Vitar, Romina Mayra; Reides, Claudia Gabriela; Ferreira, Sandra María; Llesuy, Susana Francisca.

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

Los extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis* (romero) podrían ser una importante fuente de antioxidantes naturales para ser administrados con el fin de proteger contra el daño oxidativo. El objetivo de este trabajo fue caracterizar *in vitro* extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis* en función de sus propiedades antioxidantes. Para llevar a cabo dicho objetivo se prepararon extractos acuosos al 5% P/V (cocimiento e infusión) y se evaluaron los siguientes parámetros: el contenido total de flavonoides y fenoles, la capacidad antioxidante total por medio de los ensayos de TRAP, ABTS y DPPH, el poder reductor (PR) y el efecto protector sobre la peroxidación lipídica evaluada como TBARS mediante la determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}). Los resultados obtenidos para la infusión y el cocimiento fueron, respectivamente: a) Flavonoides totales (mg ácido gálico/ g extracto): $4,88 \pm 0,60$ y $7,95 \pm 1,59$; b) Fenoles totales (mg ácido gálico/ g extracto): $150,00 \pm 4,20$ y $179,92 \pm 2,95$; c) TRAP ($\mu\text{mol Trolox/ g extracto}$): $143,75 \pm 5,25$ y $119,00 \pm 2,00$; d) DPPH ($\mu\text{mol ácido gálico/ g extracto}$): $104,4 \pm 10,6$ y $153,6 \pm 11,4$; e) ABTS ($\mu\text{mol ácido gálico/ g extracto}$): $69,3 \pm 3,7$ y $122,0 \pm 4,6$; f) PR (mM Trolox): $27,0 \pm 1,2$ y $28,8 \pm 0,5$; g) IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$): 56 ± 1 y 63 ± 1 . El cocimiento mostró valores significativamente mayores de fenoles totales ($p < 0,05$), TRAP ($p < 0,05$), DPPH ($p < 0,05$) y ABTS ($p < 0,01$). Esta mayor disponibilidad de antioxidantes no enzimáticos sustenta el mayor porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica observado en el cocimiento con respecto a la infusión. Ambos extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis* poseen capacidad antioxidante debido tanto a la presencia de antioxidante liposolubles como hidrosolubles. La presencia de estos antioxidantes protege a los lípidos de la oxidación, por lo que ambos extractos acuosos podrían ser utilizados *in vivo* en el tratamiento de diversas patologías que están asociadas al estrés oxidativo.

039. (146) DOSIS VARIABLES DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 SOBRE EL DESARROLLO TEMPRANO EN UN MODELO MURINO

Bianconi, Santiago; Solís, María Rosario; Santillan, María Emilia; Stutz, Graciela.

Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega 6 y 3 (n-6 y n-3) participan en el crecimiento y la maduración de los tejidos. Aportes adecuados de n-3, en comparación con exceso y deficiencia, optimizarían parámetros somáticos, neurobiológicos y reproductivos en ratones Albino swiss. Se alimentaron hembras (durante gestación y lactancia) y sus crías (hasta comienzo de pubertad -CP-), utilizando dietas con niveles de PUFAs n-3 y relación n-6/n-3 variables: C (control; alimento balanceado comercial; n-3: 0,08%; n-6/n-3: 19,88), D (deficiente en n-3; dieta purificada -DP-; n-3: 0%; n-6/n-3: 0), A (adecuada en n-3; DP; n-3: 0,57%; n-6/n-3: 5,7) y E (excesiva en n-3; DP; n-3: 1,25%; n-6/n-3: 1,29). En las crías, se evaluaron parámetros somáticos (peso, longitud, aparición de pelo, separación de pabellones auriculares, erupción de incisivos inferiores y apertura palpebral bilateral -APB-), neurobiológicos (enderezamiento en superficie, evasión de la caída y geotaxia negativa) y reproductivos (CP: apertura vaginal -AV- y descenso testicular). El grupo E vs C, D, A tuvo menor peso y longitud durante la lactancia y menor longitud a partir del destete (día postnatal -DPN- 21; $p < 0,05$). Además, presentó un retraso en: APB en DPN14 (%): E: $59,38 \pm 9,95$ vs C: $84,38 \pm 9,07$; D: $95,31 \pm 2,21$; A: $89,06 \pm 5,51$; ABP en DPN15 (%): E: $92,19 \pm 3,29$ vs C: 100; D: $98,44 \pm 1,56$; A: 100; $p = 0,01$ (8 camadas/tratamiento) y la AV (DPN) E: $32,74 \pm 0,64$ (N:31) vs C: $29,77 \pm 0,38$ (N:30); D: $29,94 \pm 0,44$ (N:32); A: $29,86 \pm 0,45$ (N:28); $p = 0,001$; N: número de hembras. Se sabe que los PUFAs n-3 de cadena larga presentes en la dieta E pueden inhibir la delta 6 desaturasa, reacción limitante de la síntesis de ácido araquidónico (AA, n-6). Éste es necesario para el crecimiento y maduración de los tejidos y el depósito de grasas en tejido adiposo, lo cual explicaría las diferencias en peso, longitud y APB. Además, la depleción de AA reduciría la síntesis de prostaglandina E2 en hipotalámico y ovario, modificando la maduración sexual.

040. (177) ROL DE LA LIPASA ENDOTELIAL EN EL CATABOLISMO DE LA HDL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Miksztoiwicz, Verónica¹; Cacciagiú, Leonardo¹; Fernández Machulsky, Nahuel¹; Lombardo, Micaela¹; Elbert, Alicia¹; Schreier, Laura¹; Berg, Gabriela¹.

Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)-UBA¹ Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial, CEREHA²

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología con alta incidencia de mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV) consecuencia, entre otros factores, de alteraciones en el metabolismo lipídico-lipoproteico. Dentro de la dislipemia característica de la ERC encontramos disminución en los niveles de colesterol (col)-HDL. La lipasa endotelial (LE) con actividad fosfolipásica, y la lipasa hepática (LH) con actividad fosfolipásica y triglicérido (TG)-hidrolasa, pertenecen a la familia de las SN1 lipasas. Se ha descrito la asociación inversa entre actividad de LE con los niveles plasmáticos de col-HDL en ERC; sin embargo, se desconoce la relación entre la actividad de ambas enzimas y la composición de la HDL. Objetivos: Evaluar el rol de la LE y LH en el catabolismo de la HDL en pacientes con ERC. Sujetos y Métodos: Se estudiaron 36 pacientes con ERC bajo tratamiento sustitutivo de hemodiálisis (HD) y 34 controles. En suero se evaluó perfil lipídico-lipoproteico y en plasma post-heparínico (PPH) se midió actividad fosfolipásica de LE y de LH por método cromogénico. En 18 pacientes se aisló HDL por ultracentrifugación y se midió fosfolípido (PL),

TG, Col y proteínas (PT). Resultados: el grupo ERC presentó mayor actividad de LE (1,7 (0,8–3,0) vs 1,1 (0,1–2,7) $\mu\text{mol AG/mlPPH.h}$, $p=0,008$), y menor actividad de LH (2,6 (0,7–6,2) vs 6,6 (1,3–15,2) $\mu\text{mol AG/mlPPH.h}$, $p=0,001$) que el grupo control. Sólo la actividad de LE se asoció inversamente con la masa de PL de HDL ($r = -0,652$; $p=0,012$), aún después de ajustar por col-HDL ($\beta=-0,651$, $p=0,018$). Conclusiones: el aumento observado en la actividad de LE y su asociación negativa con la masa de PL de HDL, confirman el papel catabólico de LE sobre HDL y resolvería en parte la incongruencia existente en los pacientes con ERC quienes presentan niveles bajos de HDL con actividad de LH disminuida.

041. (194) LONGITUD DE LOS TELÓMEROS Y METILACIÓN DE LA TELOMERASA EN SÍNDROME METABÓLICO

Iglesias Molli, Andrea Elena¹; Büttner, Karina Andrea²; Stanganelli, Carmen²; Villarino, Jorge³; González, Claudio⁴; Sereday, Marta⁵; Slavutzky, Irma⁶; Cerrone, Gloria Edith⁷; Frechtel, Gustavo Daniel¹.

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina² Depto. de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³ Departamento de Cardiología, FLEN⁴ Hospital Fiorito⁵ Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Academia Nacional de Medicina⁶

Introducción: El Síndrome Metabólico (SM) se caracteriza por presentar un estado de inflamación subclínica, que favorece al aumento del estrés oxidativo, con la consecuente modificación estructural de los telómeros. Se demostró que una disminución en la metilación de la telomerasa (hTERT) lleva a un mayor acortamiento los telomérica. Objetivo: Estudio de la longitud de los telómeros y la metilación de la hTERT, y su correlación con la presencia de SM. Metodología: Se analizaron 384 mujeres de la población general de Venado Tuerto, con una edad media de $46,81 \pm 15,45$ años. Se agruparon por: fenotipos: Control ($n=294$) y SM ($n=87$); y número de componentes de SM de acuerdo a ATPIII: 0 ($n=138$), 1 ($n=74$), 2 ($n=82$) y SM ($n=87$). Para el estudio molecular se utilizó ADN extraído de sangre periférica. Longitud telomérica: PCR cuantitativa en tiempo real. Se midió la relación entre la longitud telomérica y el número de copias del gen RPLPO (radio T/S). Metilación de hTERT: tratamiento con bisulfito, amplificación por PCR y secuenciación. Los resultados se analizaron estadísticamente con un nivel de significación de 0,05, por regresión lineal, test Mann-Whitney y test Wilcoxon, en GraphPad versión InStat 3. Resultados: Se verificó un acortamiento de los telómeros estadísticamente significativo con la progresión de edad en la población general ($p<0,0001$), y en los grupos Control ($p=0,0095$) y SM ($p=0,0336$). Se observó una disminución estadísticamente significativa en la longitud telomérica en el grupo con SM respecto del grupo Control ($p=0,0017$); y a mayor número de componentes del SM ($p=0,048$). En todos los casos se encontró un 0% de metilación de la hTERT, sin diferencias entre los grupos metabólicos. Conclusiones: Se evidenció una asociación estadísticamente significativa del acortamiento de la longitud de telómeros con la progresión de la edad, en pacientes con SM, y con el aumento progresivo del número de componentes del SM. La metilación de hTERT no estaría asociada a la presencia de SM.

042. (204) ESTUDIO SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL Y SU RELACIÓN CON EL PERFIL METABÓLICO EN UN GRUPO DE NIÑOS ARGENTINOS DE EDAD ESCOLAR: MASA GRASA COMO HERRAMIENTA DE POTENCIAL UTILIDAD EN LA EVALUACIÓN

Nápoli, Cristian Damián.

Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

El objetivo fue analizar la asociación entre la masa grasa y perfil lipídico en un grupo de niños. Se diseñó un estudio

descriptivo-transversal. Fueron estudiados 97 niños de 6-12 años (47niñas, 50niños), del Partido de La Plata. Se evaluó peso corporal, talla, pliegues cutáneos y resistencia eléctrica. Los sujetos recibieron una dosis oral de 0,5 g de D_2O/kg (99.8%, Cambridge Isotope Laboratories). Alcanzado el equilibrio, se recolectó una muestra de saliva. La concentración de deuterio se determinó con un espectrómetro infrarrojo FTIR de la Cátedra de Nutrición y con ella se calculó el agua corporal total por dilución isotópica (DI), la masa corporal libre de grasa y el porcentaje de Masa Grasa (%MG). El MG% también se obtuvo por ecuaciones de predicción de bioimpedancia eléctrica (BIE) y antropometría. Se determinaron en suero colesterol Total (CT), c-HDL, triglicéridos (TG), glucemia e insulinemia y se calculó c-LDL. Se encontró 24,5% de sobrepeso y 18,4% de obesidad. El MG% por DI fue $28,8 \pm 7,0$, siendo mayor ($p>0,01$) en niñas ($31,6 \pm 6,3$) que en niños ($26,2 \pm 6,7$). No hubo diferencias significativas con respecto a los estimados por una ecuación de predicción preliminar desarrollada por el grupo de investigación. Se observó colesterol y c-LDL elevados en 3-4% de la población; sin embargo los niveles borderline aumentaron a 20% y 14%, respectivamente. Se observó una tendencia no significativa a mayor trigliceridemia en las niñas y mayor insulinemia en las niñas de 10-12 años. La masa grasa se correlacionó con CT ($r=0,38$, $p<0,006$), c-LDL ($r=0,29$; $p<0,037$) y TG ($r=0,47$; $p<0,0008$). El depósito de grasa corporal se asoció al perfil lipídico por cuanto su conocimiento sugeriría su potencial utilidad como herramienta de evaluación en clínica y programas de salud. El trabajo en terreno y la determinación analítica se desarrollaron sin inconvenientes, por lo que la aplicación de la metodología por primera vez en el país resultó satisfactoria y abre perspectivas de transferencia.

043. (209) DIFERENTES PROTEINAS EN LA DIETA Y SUS EFECTOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES A NIVEL DEL TEJIDO HEPÁTICO FETAL A LOS 20 DÍAS DE GESTACIÓN

Altamirano, Karina Noel; Giménez, María Sofía; Biaggio, Verónica.

Instituto de Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO)-CONICET, Universidad Nacional de San Luis

Introducción: La exposición a metales pesados como el Cadmio (Cd) durante la preñez, puede desencadenar un cuadro de inflamación y estrés oxidativo. Por otro lado, la síntesis endógena de ácidos grasos cumple un rol importante en tejidos en proliferación. Debido a esto, factores de transcripción como SREBP-1c que regula la expresión de genes que controlan la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos y SREBP-2 que regula la de colesterol, actúan favoreciendo el desarrollo de los fetos. Objetivo: Evaluar el posible rol protector del consumo de proteína de soja frente a los mecanismos mediante los cuales Cd ejerce su toxicidad. Materiales y Métodos: Se trabajó con 4 lotes de ratas Wistar hembras; 2 lotes recibieron caseína y los otros dos, soja como fuente proteica. En cada grupo 1 lote recibió agua corriente y el otro 15ppm de Cd en agua de bebida durante el período de preñez (20 días de gestación). Se determinó: TBARS, actividad de catalasa, glutatión peroxidasa y concentración de nitritos. Se extrajo ARN total del tejido fetal y se realizó la RT-PCR usando los siguientes primers: MT I; MT II; Nrf-2; NOX-2; SOD; SREBP-1c y SREBP-2. Resultados: la concentración de Cd incrementó en ambos grupos intoxicados ($p<0,001$). En el grupo Soja-Cd la actividad de GPx-1, los niveles de MDA, nitritos y la expresión de Nrf-2; SOD y MT I aumentaron ($p<0,05$; $p<0,001$; $p<0,05$, $p<0,05$; $p<0,01$ y $p<0,001$). Mientras que la actividad de CAT y la expresión de NOX-2 y MT II disminuyeron ($p<0,01$; $p<0,01$ y $p<0,001$). La expresión de SREBP-1c, aumentó en el grupo Cas-Cd ($p<0,001$), mientras que SREBP-2 disminuyó en ambos grupos intoxicados ($p<0,001$). Conclusión: Los parámetros analizados nos indicarían que estamos en presencia de un cuadro de estrés oxidativo. Este microambiente se ve favorecido por el incremento en la expresión de enzimas del sistema antioxidante y probablemente este afectando la expresión de factores reguladores de la síntesis de lípidos.

044. (214) VARIACIONES DE VALORES ABSOLUTOS Y RELATIVOS DE LONGITUDES MEDIDAS EN IMÁGENES DIGITALES DE LA TERCERA VÉRTEBRA CERVICAL HASTA LA PUBERTAD RELACIONADAS CON LA EDAD Y LA MADURACIÓN ÓSEA

Yamauchi, Mónica I¹; Prada, Isolina I¹; Oliva Prada, Martín O²; Merlo, Alicia B².

Sociedad Argentina de Ortodoncia¹ Facultad de Medicina, Universidad del Salvador²

La bibliografía describe modificaciones morfológicas de vértebras cervicales durante el desarrollo relacionadas con la maduración ósea. Objetivo: obtener resultados cuantitativos a partir de longitudes medidas en imágenes de la tercera vértebra cervical desde los 8 años hasta la pubertad y su relación con la maduración ósea. Materiales y Métodos: Se usaron telerradiografías de perfil de 19 sujetos femeninos y 24 masculinos de edad entre 8 y 15 años y 19 sujetos femeninos y 11 masculinos de edad entre 16 y 40 años. De los de 8 a 15 años se dispuso también de imagen carpal. Todas las imágenes fueron ordenadas para tratamiento ortodóncico. Con el software Nemoceph se midieron 4 segmentos (anterior, superior, posterior, e inferior) de la imagen de la tercera vértebra cervical y se calculó el porcentaje aportado por cada uno al total. Por sexo y rangos de edad se calcularon coeficientes de correlación de Pearson (*r*) entre los valores obtenidos y edad y se calcularon las medias \pm ES de los valores porcentuales (con menos variaciones individuales que los absolutos) agrupados por estadio carpal de maduración ósea (Fishman, 1982). Resultados: Los *r* ($p < 0,01$) edad vs longitud del segmento anterior y edad vs porcentaje del segmento anterior entre 8 y 15 años son en el sexo femenino 0,50 y 0,66 y en el masculino 0,55 y 0,60. Entre 16 y 40 años no correlacionan. Los valores (media \pm ES) de porcentaje del segmento anterior entre 8 y 15 años agrupados por estadio carpal de maduración ósea (Fishman 1982) incrementan significativamente (ANOVA) al aumentar el estadio carpal. Conclusión: Valores relacionados a la tercera vértebra cervical hasta la pubertad correlacionan con la edad. Por la correspondencia con estadios carpales de maduración ósea los valores obtenidos podrían ser de utilidad para pronosticar el potencial de crecimiento residual antes del cierre de las epífisis.

GASTROENTEROLOGÍA 1

045. (4) RELEVANCIA FUNCIONAL Y BASES MOLECULARES DE LA INDUCCIÓN DE TRANSPORTADORES ABC POR EL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA (GNT) EN LA LÍNEA CELULAR DE HEPATOMA HUMANO HEPG2

Ciriacci, Nadia¹; Rigalli, Juan Pablo¹; Arias, Agustina¹; Villanueva, Silvina Stella Maris¹; Luquita, Marcelo Gabriel¹; Ghanem, Carolina Inés²; Mottino, Aldo Domingo¹; Catania, Viviana Alicia¹; Ruiz, María Laura¹.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR)¹ Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²

La P-glicoproteína (P-gp) y la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (MRP2) son bombas de flujo de xenobióticos claves en la quimiorresistencia de células tumorales. Su modulación por compuestos dietarios puede afectar la disponibilidad y eficacia de drogas citostáticas. Previamente observamos inducción de P-gp y MRP2 por GNT (proteína: 1 y 10 μ M; ARNm: 10 μ M, 48h) en células HepG2. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de GNT sobre la actividad de P-gp y MRP2, sobre la citotoxicidad por sorafenib (Sfb) y las bases moleculares de la inducción. Las células se incubaron con GNT (1 y 10 μ M, 48h) o vehículo (C). Se evaluó la actividad de P-gp mediante la acumulación intracelular de calceína. GNT 1 y 10 μ M redujo la acumulación (36 y 43%) respecto a C ($n=3$, $p < 0,05$). La actividad de MRP2 se evaluó por extrusión de dinitrofenil S-glutathion, observándose una excreción mayor en células tratadas con GNT 1 y 10 μ M (23 y 26%) respecto

a C ($n=3$, $p < 0,05$). El efecto fue prevenido por inhibidores de los transportadores (PSC833 para P-gp y MK571 para MRP2). La prevención de la toxicidad de Sfb se evaluó por el método del MTT. Se observó un aumento en el IC50 de células tratadas con GNT 1 y 10 μ M (46 ± 7 y $43 \pm 3 \mu$ M) respecto de C ($35 \pm 3 \mu$ M, $n=4$, $p < 0,05$) que fue prevenido por inhibidores de P-gp y MRP2. La ausencia de inducción en el ARNm por GNT 1 μ M sugiere un mecanismo traduccional o postraduccional. Cicloheximida (100 μ M) previno la inducción de ambas proteínas por GNT 1 μ M, confirmando un efecto traduccional, en contraste con la regulación transcripcional previamente descrita a 10 μ M. El rol del receptor de pregnanos X (PXR) se evaluó por silenciamiento del mismo, previéndose la inducción proteica de P-gp por GNT 1 y 10 μ M y de MRP2 por GNT 10 μ M. Conclusión: GNT induce la actividad de P-gp y MRP2, reduciendo la toxicidad por Sfb. La inducción por GNT 1 μ M cursaría a nivel traduccional, mientras que por GNT 10 μ M sería a nivel transcripcional siendo PXR un mediador clave.

046. (36) ESTRADIOL 17 β -D-GLUCURÓNIDO (E17G) INDUCE ENDOCITOSIS DE BSEP Y MRP2 DEPENDIENTE DE CLATRINA EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR)

Miszczuk, Gisel¹; Boaglio, Andrea; Barosso, Ismael; Larocca, Cecilia; Roma, Marcelo; Crocenzi, Fernando.

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

Previamente, demostramos que los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2, ambos esenciales para la formación de bilis, sufren internalización endocítica en diferentes modelos de colestasis, tal como la inducida por E17G, siendo este fenómeno responsable de la falla secretora biliar. Se desconoce el mecanismo por el cual E17G induce dicha endocitosis, siendo su elucidación el objetivo de este trabajo. Métodos: Las DAHR se obtuvieron por el método de doble perfusión de hígados con colagenasa, se enriquecieron por elutriación, se cultivaron 4,5 hs. en placas cubiertas con colágeno (37°C, 2×10^4 cél/mL) en medio L15 y, finalmente, se expusieron a E17G 200 μ M durante 20 min, o a su vehículo (DMSO; grupo control). Se realizaron pre-tratamientos de 15 min para inhibir la endocitosis dependiente de clatrina con *i*) monodansil-cadaverina (MDC) 100 μ M o *ii*) depleción de K⁺ (-K⁺), así como la endocitosis dependiente de caveolina con filipina (F) 1 μ g/mL. La actividad de Bsep y Mrp2 se evaluó determinando, por análisis de imágenes, el% de DAHR (> 200) que exhibieron acumulación vacuolar canalicular (AVc) de los sustratos fluorescentes CGamF (Bsep) y GS-MF (Mrp2) por microscopía de fluorescencia, luego de ser incubadas durante 15 min con 0,3 μ M CGamF o con 2,5 μ M CMFDA (precursor de GS-MF). Resultados: E17G disminuyó, respecto del control (100%), la AVc de CGamF y GS-MF ($45,8 \pm 7,5\%$ y $48,7 \pm 8,6\%$, respectivamente, $p < 0,05$). Dicho fenómeno fue prevenido con inhibidores de la endocitosis dependiente de clatrina (MDC+E17G: $88,8 \pm 13,4\%$ y $101,7 \pm 7,4\%$, -K⁺+E17G: $81,9 \pm 12,3\%$ y $90,0 \pm 16,5\%$). En cambio, la inhibición de la endocitosis dependiente de caveolina con F no afectó la disminución de la AVc de CGamF y GS-MF inducida por E17G (F+E17G: $48,6 \pm 10,7\%$ y $40,9 \pm 11,7\%$, respectivamente). Conclusión: La alteración del transporte mediado por Bsep y Mrp2 inducida por E17G es debida al proceso de internalización endocítica dependiente de clatrina que sufren ambos transportadores.

047. (141) ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA: MARCADORES PLASMÁTICOS DE DAÑO

Ríos, Daniela Alejandra¹; De Matteo, Elena¹; Casciato, Paola²; Mullen, Eduardo³; Galoppo, Marcela⁴; Valva, Pamela¹; Preciado, María Victoria¹.

Laboratorio de Biología Molecular, División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez¹ Servicio de Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires² Anatomía Patológica, Hospital Italiano de Buenos Aires³ Servicio de Hepatología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez⁴

La fibrosis y la esteatosis son las principales alteraciones histológicas de la enfermedad hepática crónica (EHC). La biopsia es el

método patrón para determinar el daño hepático por eso el estudio de métodos menos invasivos es una prioridad. El objetivo fue evaluar la utilidad de dos marcadores plasmáticos como indicadores de daño en la EHC de diversa etiología: Hepatitis C crónica (HCV) y Esteatohepatitis No Alcohólica (EHNA). Se analizaron biopsias hepáticas y plasmas concomitantes de 84 pacientes (HCV: 22 niños, 22 adultos; EHNA: 15 niños, 25 adultos). En biopsias se realizó la caracterización histológica. En plasma se cuantificó el Inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (TIMP-1) y la citoqueratina-18 clivada (M30). Se incluyeron controles sin daño hepático (10 niños, 10 adultos). TIMP-1 y M30 discriminaron pacientes de controles; pero la asociación con los parámetros histológicos varió según los grupos etarios y la etiología de la EHC. En los casos HCV⁺ se observó aumento de TIMP-1 en relación a la severidad de la fibrosis, pero sólo se asoció en niños ($p=0,039$). Además, en ellos los niveles de M30 se asociaron a esteatosis severa ($p=0,01$). En la EHNA, TIMP-1 no mostró diferencias con la severidad del daño en ningún grupo, pero M30 se asoció a la severidad de la fibrosis en adultos ($p=0,004$). Se evaluó el valor diagnóstico de cada marcador a través del área bajo la curva ROC (AUROC). En niños HCV⁺, el AUROC de TIMP-1 para discriminar fibrosis avanzada fue 0,800 (95%IC 0,598-0,932) y el de M30 para determinar severidad de esteatosis fue 0,833 (95%IC 0,634-0,951). En adultos con EHNA el AUROC de M30 para determinar severidad de fibrosis fue 0,933 (95%IC 0,728-0,996). Los indicadores propuestos serían marcadores menos invasivos de daño hepático. En niños HCV⁺, TIMP-1 sería indicador de fibrosis avanzada y M30 de severidad de esteatosis. En adultos con EHNA, M30 sería marcador de progresión de fibrosis. El estudio de un mayor número de casos permitirá validar los hallazgos.

048. (154) SRC PARTICIPA EN LAS ALTERACIONES COLESTÁSICAS INDUCIDAS POR ESTRADIOL-17 β -D-GLUCURÓNIDO (E17G) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR) A TRAVÉS DE LA VÍA RE α -EGFR

Barosso, Ismael; Miszczuk, Gisel; Zucchetti, Andrés; Tabora, Diego; Crocenzi, Fernando; Sánchez Pozzi, Enrique. *Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario*

Previamente, se demostró que RE α precede a EGFR en las alteraciones colestásicas producidas por E17G en DAHR. SRC interactúa con EGFR y RE α en modelos experimentales que utilizan estradiol no conjugado, por lo que el objetivo del trabajo fue evaluar si SRC actúa como efector en las acciones de E17G. DAHR fueron pretratadas con dos inhibidores específicos de SRC: PP2 (5 μ M) y el inhibidor de SRC 1 (IS, 1 μ M) durante 15 min y luego se trataron con E17G (100 μ M) por 20 min. Además, preparados de DAHR fueron coincubados con IS junto con ICI182,780 (ICI, inhibidor de RE α , 1 μ M) por 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% de acumulación vacuolar canalicular (AVc) de ambos sustratos. Las fosforilaciones (activaciones) de RE α , EGFR y SRC se evaluaron por Western blot. Resultados: Se expresan como media \pm ES y con respecto al Control (C). PP2 y IS protegieron parcialmente la disminución de AVc de CGamF (E17G+PP2: 67 \pm 3%*, E17G+IS: 68 \pm 3%*, E17G: 51 \pm 3%) y GS-MF (E17G+PP2: 69 \pm 4%*, E17G+IS: 71 \pm 10%*, E17G: 52 \pm 4%*) inducida por E17G. No se observó un efecto preventivo aditivo cuando DAHR se coincubaron con ICI (AVc CGamF: E17G+ICI: 66 \pm 2%*, E17G+ICI+IS: 67 \pm 3%*; AVc GS-MF: E17G+ICI: 70 \pm 5%*, E17G+ICI+IS: 69 \pm 4%*). $n=4$, ^ Diferencia significativa con C ($p<0,05$), * Diferencia significativa con C y E17G ($p<0,05$). IS no bloqueó la activación de EGFR (272 \pm 56%) ni de RE α (189 \pm 30%) indicadas por E17G (EGFR 325 \pm 17%, RE α 233 \pm 29%). Por otro lado la fosforilación de SRC inducida por E17G (164 \pm 18%) fue evitada por Tyr (inhibidor de EGFR) 106 \pm 20% e ICI 118 \pm 14%, $n=10$. Conclusión: SRC participa en la vía de señalización RE α -EGFR que lleva a la colestasis por E17G

(efecto no aditivo). SRC está cascada abajo de EGFR (inhibición de EGFR previene activación de SRC).

049. (159) CONTAJE NEURONAL EN EL PLEXO DE AUERBACH DE INTESTINO DELGADO DE RATAS BETA CON DISTINTA CALIDAD DE ACIDOS GRASOS EN LA DIETA
Feltrer, Ana L¹; Labourdette, Verónica²; Posadas, Marta²; Olguin, María C³; Hisano, Noriyuki¹.
*Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario*¹ *Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario*² *Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario*³

Se sabe que los ácidos grasos dietarios son importantes en el metabolismo lipídico. Existen evidencias de la influencia de estos sobre las neuronas del sistema nervioso entérico. Exploramos el efecto de dietas con distinta calidad de ácidos grasos sobre las neuronas del plexo de Auerbach. Ratas machos de la línea beta (obesas, triacilglicerolélicas, normocolesterolémicas, diabéticas tardías) de 70 días recibieron dietas isocalóricas e isolipídicas. Fueron divididas en: Dieta AIN (control, n:6): AIN 93 (con aceite de girasol, rico en ácido linoleico). Dieta JB (n:7): AIN 93 modificada reemplazando el aceite de girasol por primer jugo bovino (fuente de ácidos grasos saturados). Dieta JBW (n:7): AIN 93 modificada reemplazando el aceite de girasol por primer jugo bovino y adicionada con aceite de pescado conteniendo 0,025g de ácidos grasos poliinsaturados w3 cada 100g de alimento. La relación w6/w3 fue 4:1. Fueron colocadas en jaulas individuales con alimentación y agua *ad libitum*, 12 hs luz/ 12 hs oscuridad, temperatura 25 °C. Después de 90 días fueron eutanasiados con sobredosis de pentotal sódico. Se obtuvo sangre por punción venosa para estudios bioquímicos. Con una incisión media abdominal se disecó el tubo digestivo. Un segmento de intestino delgado fue fijado en paraformaldehído 4% y procesado con la técnica del NADPH. Los preparados fueron observados al microscopio, fotografiados con una cámara digital a 40 x y estudiados con un programa analizador de imágenes. Se contaron las neuronas/mm². Los datos se expresan como promedio \pm D.S. Biomasa (g): AIN 425,00 \pm 39,41; JB 418 \pm 24,53; JBW 412,50 \pm 23,18. Triacilglicerolemia (TAG) mg/dl: AIN 190,17 \pm 95,51; JB 238,71 \pm 78,85; JBW 126,43 \pm 40,97 ($p<0,05$). Cantidad de neuronas/mm²: AIN 198,56 \pm 23,60; JB 71,90 \pm 12,62; JBW 232,19 \pm 24,13 ($p<0,05$). En el conteo neuronal, quedó reflejada la agresión de los ácidos grasos saturados de la dieta (menor cantidad de neuronas NADPH+ intestinales) así como el efecto protector que ejercieron los ácidos grasos omega 3.

050. (224) EL FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL ES SINTETIZADO EN EL PÁNCREAS EXOCRINO DE RATA

Najenson, Ana Clara¹; Rodríguez, Myrian Roxana¹; Bianchi, Mariana⁴; Casco, Víctor⁴; Vatta, Marcelo S.³; Bianciotti, Liliana G.^{1,2}
*Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA*¹ *Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*² *Cátedra de Fisiología, Instituto de Química y Metabolismo de los Fármacos (IQUIMEFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*³ *Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos*⁴

El factor natriurético atrial (ANF) es una hormona peptídica sintetizada principalmente por el atrio cardíaco derecho de mamíferos que se libera al torrente sanguíneo en respuesta al estiramiento auricular. Adicionalmente, distintos estudios muestran que existen fuentes extracardíacas de síntesis de ANF en las que el péptido ejercería efectos paracrinis y/o autocrinis. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio permitieron determinar que los receptores de ANF se expresan en el páncreas exocrino y que a través del receptor NRP-C, el ANF regula la funcionalidad de la glándula tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. En virtud a los efectos biológicos demostrados, se decidió investigar si el ANF es sintetizado en el páncreas exocrino. Mediante RT-PCR e

inmunoblotting se determinaron tanto la expresión del ARNm de ANF como la del péptido en acinos pancreáticos aislados y para la localización tisular, se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia en secciones de páncreas. Los estudios mostraron que, al igual que el mensajero del péptido natriurético tipo C (CNP), el ARNm de ANF se expresa en el páncreas exocrino. Los análisis de inmunoblotting e inmunofluorescencia demuestran que el ANF es traducido y procesado como péptido activo. Estos estudios avalan que el páncreas exocrino es fuente de síntesis de ANF funcional. Se postula que este péptido actuaría de manera autocrina, y/o eventualmente paracrina sobre otros tejidos del sistema digestivo donde ha demostrado ejercer efectos biológicos.

051. (244) REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR DE XENOBIÓTICOS MRP2 EN CÉLULAS INTESTINALES DE ORIGEN HUMANO CACO-2

Tocchetti, Guillermo Nicolás; Arias, Agustina; Arana, Maite Rocío; Perdomo, Virginia; Ruiz, María Laura; Rigalli, Juan Pablo; Luquita, Marcelo Gabriel; Villanueva, Silvina Stella Maris; Mottino, Aldo Domingo
Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario

La proteína asociada a resistencia a multidroga 2 (MRP2), una bomba exportadora de xenobióticos aniónicos, protege la mucosa intestinal de la absorción de drogas y contaminantes dietarios. Se evaluó la regulación aguda de MRP2 en células Caco-2, a través de cambios en el balance de expresión en membrana plasmática (MP) vs. intracelular (MI) detectados por inmunoblot, en respuesta al tratamiento con dos agentes de acción contrapuesta y ya demostrada en células hepáticas. El tratamiento con estradiol 17-glucuronido (E217G, 400 μ M, 30 min), un derivado endógeno del estradiol de acción proendocrítica, disminuyó la expresión de MRP2 en MP (-47%, $P < 0,05$, $N=4$) y la aumentó en MI (+127%, $P < 0,05$, $N=4$) respecto de células controles (C), consistente con un proceso de internalización. En contraste, el agente proinsertor dibutilil-AMPc (dbAMPc, 10 μ M, 30 min) indujo aumento de MRP2 en MP (+178%, $P < 0,05$, $N=8$) y disminución en MI (-31%, $P < 0,05$, $N=8$). Villina y UGT1A, utilizados como marcadores de MP y MI no fueron afectados. La detección in situ de MRP2 por microscopía confocal permitió ilustrar los cambios de localización referidos. Estudios funcionales utilizando el sustrato modelo de MRP2, dinitrofenil-S-glutation, demostraron pérdida de actividad de eflujo por E217G (-24%, $P < 0,05$, $N=6$) y aumento por dbAMPc (+17%, $P < 0,05$, $N=6$). Experimentos similares incorporando el inhibidor de proteína quinasa C clásicas (PKC α) Gö6976 o de proteína quinasa A (PKA) KT5720 al medio de incubación, demostraron la participación de ambas quinasas como mediadoras de E217G y dbAMPc, respectivamente. Se concluye que la expresión de MRP2 en MP de células Caco-2 es regulable en forma postraducciona, afectando la actividad de eflujo del transportador. Si bien se desconocen las implicancias fisiológicas y fisiopatológicas de estos hallazgos, se sugiere la posibilidad de una regulación similar a la demostrada en hígado y basada en el balance entre efectos proinsertores y prointernalizadores.

052. (361) REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) INTESTINAL EN UN MODELO IN VIVO DE SÍNDROME METABÓLICO

Londero, Ana Sofía¹; Arana, Maite Rocío¹; Tocchetti, Guillermo Nicolás¹; Perdomo, Virginia Gabriela²; Ruiz, María Laura¹; Rigalli, Juan Pablo¹; Mottino, Aldo Domingo¹; Luquita, Marcelo Gabriel¹; García, Fabiana³; Villanueva, Silvina Stella Maris¹
*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario*¹ *Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)- CONICET*² *Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas-CONICET, Universidad Nacional de Rosario*³

En los últimos años el síndrome metabólico (SM) cobró relevancia debido a su rol en el desarrollo de enfermedades tales

como obesidad, diabetes y afecciones cardiovasculares. Dado su carácter multifactorial, los pacientes reciben con frecuencia diversos tratamientos farmacológicos los cuales son administrados mayormente por vía oral. En este sentido la función de barrera química intestinal, conformada por MRP2 y enzimas de biotransformación de fase II, desempeñan un papel importante en la biodisponibilidad y por ende en la eficacia y seguridad de los mismos. En el presente estudio, realizado en un modelo experimental reconocido de SM, evaluamos la expresión y actividad del transportador apical de aniones orgánicos MRP2 y de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) en yeyuno de ratas Wistar machos luego de 3 semanas de administración de 10%P/V de fructosa (F) en el agua de bebida. Los resultados se expresan en porcentaje, $n=6$. La expresión de MRP2 a nivel proteína (western blot) y de ARNm (PCR en tiempo real) disminuyeron significativamente un 89% y 47%, respectivamente, en F respecto de C ($p < 0,05$), consistente con una disminución en la señal de MRP2 detectada in situ por microscopía confocal. La actividad de MRP2 se estimó en saquitos intestinales aislados y evertidos mediante su capacidad de secretar dinitrofenil-glutation (DNP-SG) al lado mucoso, a partir de su precursor 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 100 μ M). La excreción de DNP-SG, fue menor en el grupo F (56%) respecto de C, $p < 0,05$. La expresión y actividad de GST citosólica, involucrada en la conversión de CDNB en DNP-SG no se modificó por el tratamiento. En resumen, la expresión de MRP2 (proteína y ARNm) y por ende la capacidad de excretar xenobióticos como el DNP-SG, resultaron disminuidos en el modelo de SM. Conclusión: SM afectaría la biodisponibilidad y toxicidad de xenobióticos que son sustratos de MRP2, pudiendo explicar la mayor sensibilidad que presentan los pacientes con SM a la toxicidad por drogas.

053. (364) EL ENTEROGLUCAGON (GLP-2) PREVIENE LA PÉRDIDA DE EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) INTESTINAL INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO (LPS)

Arana, Maite Rocío; Tocchetti, Guillermo; Londero, Ana Sofía; Perdomo, Virginia; Luquita, Marcelo; Villanueva, Silvina; Mottino, Aldo.
Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario

La bomba exportadora de xenobióticos MRP2, expresada en la superficie del intestino proximal, limita la absorción de contaminantes dietarios y drogas de uso terapéutico. La endotoxemia inducida por LPS aumenta la permeabilidad intestinal, en parte al disminuir la actividad de MRP2. Recientemente demostramos que el enteroglucagon, específicamente el 'glucagon-like peptide 2' (GLP-2), aumenta la expresión de MRP2 (proteína y ARNm) en yeyuno de rata, derivando en mayor actividad de transporte. En el presente estudio, se trataron ratas wistar hembras con LPS (5 mg/kg p.c.) por 24 hs (grupo L), con GLP-2 (25 μ g/100 g p.c.) por 72 hs (grupo G), con ambos compuestos (grupo L+G), o con vehículo (grupo C). Los resultados mostraron una disminución significativa de la expresión de MRP2, evaluada por western blot, en el grupo L (-74%) y un aumento en el grupo G (+60%) respecto de C ($n=6$, $p < 0,05$). El tratamiento conjunto (+16%) no mostró diferencias con C sugiriendo un efecto preventivo para GLP-2. Los datos de ARNm de MRP2 (PCR cuantitativa) mostraron una variación en el mismo sentido que la proteína, con disminución en L (-86%), aumento en G (+111%), y compensación sólo parcial en L+G (-65%) en relación a C ($n=6$, $p < 0,05$). La actividad de MRP2 se estimó en saquitos intestinales aislados mediante su capacidad de secretar al lado mucoso dinitrofenil-glutation, sustrato modelo de MRP2 generado endógenamente a partir de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (100 μ M). La actividad fue menor en el grupo L (-48%) y mayor en los grupos G (+40%) y L+G (+30%) respecto de C ($n=6$, $p < 0,05$). Concluimos que el tratamiento con GLP-2 previene la regulación negativa de la expresión de MRP2 (proteína y ARNm) y de su capacidad de excretar un sustrato modelo, observadas en el modelo de endotoxemia por LPS en la rata. Los datos reafirman el valor de GLP-2 como posible agente terapéutico en situaciones de injuria

intestinal, en las cuales la barrera química contra la absorción de xenobióticos se ve afectada.

054. (638) LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDO HIALURÓNICO MEDIANTE 4-METILUMBELIFERONA (4MU) MODULA EL PROCESO DE ANGIOGÉNESIS EN UN MODELO DE HEPATOCARCINOMA ORTOTÓPICO ASOCIADO A FIBROSIS

Piccioni, Flavia¹; Fiore, Esteban¹; Bayo, Juan¹; Peixoto, Estanislao¹; Rizzo, Manglio¹; Malvicini, Mariana^{1,2}; Atorrasagasti, Catalina^{1,2}; García, Mariana G.^{1,2}; Alaniz, Laura^{1,3}; Mazzolini, Guillermo^{1,2}.

Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)² Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires³

La cirrosis se caracteriza por una acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular, entre ellos el ácido hialurónico (HA). Es considerada una enfermedad pre-neoplásica que favorece la aparición del hepatocarcinoma (HCC), uno de los tumores sólidos más vascularizados. 4-metilumbeliferona (4MU), un agente oral biodisponible, es un inhibidor específico de la síntesis de HA con efecto anti-tumoral en un modelo de HCC ortotópico con fibrosis subyacente (Piccioni F. et al, *Glycobiology* 2012). El objetivo del trabajo fue estudiar si 4MU es capaz de modular el proceso de angiogénesis en un modelo de HCC asociado a fibrosis. La fibrosis hepática se indujo en ratones C3H/HeJ por tioacetamida i.p. durante 42 días. En la 4^a semana, se inocularon células de HCC (Hepa129) en el hígado mediante laparotomía. Los animales se trataron diariamente con 4MU por vía oral hasta el final del experimento. Evaluamos los efectos de 4MU sobre la angiogénesis mediante la cuantificación de VEGF e IL-6 en extractos proteicos de los tumores, y de VEGF en suero. Además, se evaluó la densidad vascular en el tejido hepático mediante inmunohistoquímica para CD31. Por otro lado, se estudió la expresión de los genes VEGF, IL-6, CXCL12 y su receptor CXCR4 en tejido tumoral y no tumoral. Como resultado, 4MU redujo significativamente los niveles de IL-6 en tejido hepático ($p < 0,05$ vs. Salino, ANOVA) y de VEGF en tejido tumoral y no tumoral ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ vs. Salino, ANOVA, respectivamente). Lo mismo se observó para VEGF en suero ($p < 0,001$ vs. Salino, ANOVA). Por otro lado, el tratamiento con 4MU disminuyó la expresión de CD31 en el tejido hepático respecto al grupo control (Salino) ($p < 0,0001$, T-Test). En cuanto al nivel de expresión de genes, 4MU indujo una reducción de IL-6 (ns) y de CXCL12 ($p < 0,001$ vs. Salino), y un aumento de la expresión de CXCR4 ($p < 0,01$ vs. Salino). En conclusión, nuestros resultados sugieren que 4MU es capaz de modular el proceso angiogénico tanto en el tumor como en el microambiente fibrótico hepático, y estos efectos podrían sustentar, en parte, la actividad antitumoral de 4MU.

055. (641) PAPEL DE LA PROTEÍNA SPARC (SECRETED PROTEIN ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE HEPATITIS FULMINANTE

Peixoto, Estanislao¹; Atorrasagasti, Catalina^{1,2}; Aquino, Jorge B.^{1,2}; Militello, Rodrigo³; Bayo, Juan¹; Fiore, Esteban¹; Piccioni, Flavia¹; Salvatierra, Edgardo⁴; Malvicini, Mariana^{1,2}; Alaniz, Laura^{1,2}; García, Mariana G.^{1,2}; Bataller, Ramón⁵; Corrales, Fernando⁶; Gidekel, Manuel⁷; Podhajcer, Osvaldo⁴; Colombo, María Isabel^{2,3}; Mazzolini, Guillermo^{1,2}. Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Ciencia. Biomédicas, Universidad Austral¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)² Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.³ Laboratorio de Terapia Molecular y Celular, Fundación Instituto Leloir⁴ University of North Carolina at Chapel Hill, NC.⁵ CIMA, Universidad de Navarra, España.⁶ Universidad de la Frontera, Temuco and Creative Biosciences, Santiago, Chile.⁷

SPARC es una glicoproteína de la matriz extracelular involucrada en diversos procesos biológicos y desempeña un papel crucial en tejidos sometidos a injuria. Resultados previos muestran que

la reducción de la expresión de SPARC en ratones disminuye la fibrogénesis hepática. Sin embargo, no se conoce el rol de SPARC en modelos de injuria hepática aguda. El principal objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de SPARC en el daño hepático agudo. Se emplearon tres modelos de daño hepático agudo tanto a ratones *wild type* (SPARC^{+/+}) como *knock out* (SPARC^{-/-}) para el gen de SPARC: concanavalina A (ConA), ligando de FAS (JO2), o galactosamina/LPS. Para cada modelo se evaluó la inducción de SPARC por qPCR. El grado de daño hepático se evaluó mediante análisis anatómo-patológico y midiendo los niveles de transaminasas. Para estudiar el rol preventivo de la inhibición de la expresión de SPARC en ratones con ConA se empleó un adenovirus que expresa la secuencia antisentido de SPARC. Para estudiar el efecto terapéutico se empleó un ARN de interferencia específico para SPARC. También se empleó un adenovirus con secuencia sentido de SPARC para reestablecer la expresión de SPARC en ratones SPARC^{-/-} tratados con ConA. Como resultado, se observó un aumento de expresión de SPARC en los modelos de daño hepático agudo. Ratones SPARC^{-/-} presentaron disminución del daño hepático en los 3 modelos de injuria hepática. La inducción de la expresión de SPARC en ratones SPARC^{-/-} reestablece la sensibilidad al efecto de ConA. La inhibición *in vivo* de la expresión de SPARC tanto de manera preventiva como terapéutica disminuyó la magnitud del daño hepático. En conclusión, estos resultados sugieren que SPARC podría considerarse como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de procesos que involucren injuria hepática aguda.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 1

056. (5) DIFERENTES FUENTES DE AMP CÍCLICO INVOLUCRADAS EN LA SEÑALIZACIÓN DEL GPCR CRHR1

Inda, María Carolina^{1,2}; Bonfiglio, Juan José^{1,2}; Senin, Sergio¹; Dos Santos Claro, Paula¹; Silberstein, Susana^{1,2}. Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) - CONICET - Partner Institute of the Max Planck Society¹ Depto. de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²

La hormona CRH ejerce un rol central en la respuesta coordinada al estrés, dirigiendo la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y actuando como neuromodulador en el sistema nervioso central. Nuestro objetivo es estudiar las vías de señalización celular de CRH mediada por el receptor CRHR1, con potencial relevancia terapéutica en desórdenes ligados a estrés. CRHR1 es un GPCR cuya señalización canónica involucra la activación de la proteína Gs y las adenilil ciclasas transmembrana (tmACs). Se ha descrito recientemente que existe una adenilil ciclasa soluble (sAC), que tiene una localización y una regulación diferente. Utilizamos a la línea celular HT22 como modelo hipocámpal en la cual se generaron clones estables del CRHR1. Empleando inhibidores farmacológicos específicos (tmACs -ddA-, sAC -2HE y KH7-) y el silenciamiento de sAC analizamos la contribución de las distintas fuentes de cAMP en la señalización de CRH. Por métodos bioquímicos y con sensores de FRET, demostramos que CRH genera un aumento de AMPc que depende tanto de las tmACs como de sAC. Como efectores clásicos de la vía de cAMP, demostramos también que la actividad de PKA (sensor de FRET) y la fosforilación de CREB (WB) dependen de ambas fuentes de cAMP. La fosforilación de las MAPK ERK1/2 es fundamental para la acción de CRH. Por WB, demostramos que sAC contribuye a la activación ERK1/2 con un perfil diferencial al de las tmACs. Más aún, en la línea de corticotrofos ATT20, que tiene CRHR1 endógeno, sAC también contribuye a la activación de ERK1/2 en respuesta a CRH. Sin embargo, otros agonistas de GPCRs ligados a Gs, como isoproterenol y PACAP38, no señalizan a través de sAC, indicando que es un componente específico de la vía de CRHR1. La identificación de sAC como una segunda fuente de AMPc en respuesta a un GPCR es relevante en el contexto del paradigma de señalización desde microdominios y la regulación diferencial de las ACs. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11).

057. (6) RSUME ESTABILIZA A HIF-2ALFA A TRAVÉS DE LA INHIBICIÓN FUNCIONAL DEL SUPRESOR TUMORAL VHL

Tedesco, Lucas¹; Bonfiglio, Juan José^{1,2}; Fuertes, Mariana¹; Barontini, Marta³; Silberstein, Susana^{1,2}; Antico Arciuch, Valeria¹; Wu, Yonghe⁴; Renner, Ulrich⁴; Stalla, Gnter K⁴; Arzt, Eduardo^{1,2}.

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)-CONICET- Partner Institute of the Max Planck Society¹ Depto. de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires² Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez³ Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania⁴

Los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs) son instrumentales en la respuesta a hipoxia celular. La estabilidad de las subunidades HIF-alfa es regulada, en normoxia, por el supresor tumoral von Hippel-Lindau (VHL), que media su ubiquitinación y posterior degradación. Patologías asociadas a VHL se caracterizan por la desregulación de HIF produciendo tumores altamente vascularizados. Previamente observamos que RSUME aumenta la estabilidad de HIF-1alfa y actividad de HIF-1, a través de VHL. Además, que RSUME se expresa en órganos sensibles al síndrome VHL. En este trabajo demostramos el efecto de RSUME sobre VHL, a través de la estabilidad de HIF-2alfa, clave en el síndrome VHL. Utilizando células RCC-786-O, deficientes en VHL, demostramos por Western Blot, que RSUME no tiene efecto sobre la estabilidad de HIF-2alfa, pero revierte la ubiquitinación y degradación de HIF-2alfa por expresión de VHL. Por Pull-down y co-inmuno-precipitación determinamos que RSUME y VHL interaccionan físicamente. Esto fue corroborado por microscopía confocal en células COS-7 transfectadas con RSUME. Luego estudiamos si el efecto de RSUME es a través del complejo VHL-RSUME. En células RCC-786-O, observamos que RSUME estabiliza a HIF-2alfa y que inhibe su interacción con VHL. En muestras de Feocromocitomas y Hemangioblastomas determinamos expresión proteica de RSUME. Finalmente, estudiamos el rol de RSUME en el desarrollo tumoral VHL-dependiente inyectando ratones nude con clones derivados de células RCC-786-O, que expresan VHL junto al silenciamiento de RSUME o su control. El silenciamiento de RSUME produjo una reducción del crecimiento tumoral ($p < 0,05$). Además, mostró reducción en HIF-2alfa, VEGF y vascularización tumoral (CD31) ($p < 0,05$). Concluimos que RSUME estabiliza a HIF-2alfa a través de su interacción con VHL y que RSUME resulta un blanco importante a estudiar en el desarrollo tumoral en el síndrome de VHL. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11)

058. (13) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIADA POR EL RECEPTOR P2X7 EN PRESENCIA DE LA VARIANTE POLIMÓRFICA P2X7-GLN460ARG VINCULADA A DEPRESIÓN

Budziński, Maia Ludmila¹; Aprile García, Fernando^{1,2}; Yankilevich, Patricio¹; Antunica Noguero, María^{1,2}; Proto Cassina, Luciano¹; Senin, Sergio¹; Liberman, Ana Clara¹; Arzt, Eduardo^{1,2}.

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)-CONICET - Instituto Partner de la Sociedad Max Planck¹ Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular²

Los receptores P2X7 son canales de calcio que tienen un rol central en la fisiopatología del sistema nervioso. Estos receptores presentan una variante polimórfica (Gln460Arg), fuertemente asociada a trastornos psiquiátricos. Previamente demostramos que solo cuando se coexpresan la variante salvaje y mutante se compromete la funcionalidad del canal. A continuación, analizamos el perfil de expresión génica asociado a la activación de las distintas variantes de P2X7 utilizando un microarray y herramientas bioinformáticas. Al comparar el perfil de expresión génica de la línea HEK293 parental con clones salvajes (P2X7-WT) reportamos,

por primera vez, genes modulados por la activación de P2X7. Al agrupar funcionalmente estos genes, vemos un enriquecimiento en términos relacionados con función neuronal y neurogénesis. De manera similar, las vías de señalización que se encuentran alteradas están relacionadas con inflamación, desarrollo neuronal y metabolismo de neurotransmisores. A continuación buscamos genes con expresión alterada debido a la expresión de P2X7 en heterocigosis, comparando clones P2X7-WT y coexpresores P2X7-WT/P2X7-Gln460Arg ($p < 0,01$). El análisis bioinformático global muestra una fuerte asociación con procesos inflamatorios o trastornos psiquiátricos. Con la finalidad de obtener genes candidatos se realizó un análisis bioinformático restrictivo. Se seleccionaron 2 genes por su fuerte asociación con inflamación, función neuronal y desórdenes psiquiátricos: CHUK (conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase) ($p < 0,00023$) y RCAN1 (regulator of calcineurin1) ($p < 0,00034$). Estos genes fueron validados por RTqPCR en clones 1321N1 y en cerebros de ratones knock-in para las distintas variantes de P2X7. Estos resultados sugieren que la coexpresión del receptor P2X7 salvaje y la variante asociada a depresión, genera un patrón distintivo de activación transcripcional asociado a trastornos inflamatorios y neuropsiquiátricos y, además, revela posibles blancos terapéuticos. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11)

059. (27) ESFINGOSINA-1-FOSFATO INDUCE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B A TRAVÉS DEL RECEPTOR S1P1: PARTICIPACIÓN DE PKC Y AKT

Campos, Ludmila E¹; Castro, Melina G¹; Rodríguez, Yamila I¹; Álvarez, Sergio E^{1,2}.

Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas¹ Universidad Nacional de San Luis²

Esfingosina-1-fosfato (S1P) es un esfingolípido que ha sido asociado con el desarrollo embrionario, inflamación crónica, angiogénesis, crecimiento celular y cáncer. A nivel intracelular, S1P es producido por las quinasas Sphk1 y Sphk2 y puede actuar como un segundo mensajero intracelular, o ejercer sus funciones a través de receptores de membrana acoplados a proteína G, designados como S1P₁₋₅. Nuestros trabajos previos demostraron un rol de S1P como mediador intracelular en la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo cual es de gran importancia en el desarrollo y progresión de cáncer. En este trabajo revelamos un mecanismo alternativo a través del cual S1P extracelular, activa la señalización de NF- κ B en líneas celulares de melanoma que no expresan Filamina-A (FLNa). Mediante ensayos farmacológicos mostramos que el receptor S1P₁ está involucrado en la señalización. Para explorar el mecanismo intracelular, evaluamos la participación de las quinasas PKC, Sphk1 y Akt. Mientras la inhibición de Sphk1 no afecta la activación de NF- κ B, tanto la activación directa de PKC con éster de forbol como su silenciamiento indican que es importante para la señalización. Notablemente, nuestros resultados demuestran que la actividad basal de Akt está incrementada y sostenida en el tiempo en aquellas células que no expresan FLNa. Por su parte, la inhibición de la señalización de Akt reduce la activación de NF- κ B inducida por S1P. Aunque esto sugiere que FLNa modula la activación de NF- κ B regulando la actividad de Akt, el mecanismo aún no se conoce. En resumen, establecimos que S1P induce la activación de NF- κ B a través del receptor S1P₁, y que el mecanismo molecular involucra la participación de Akt y PKC y es regulado negativamente por FLNa.

060. (134) EL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G-CSF) INDUCE LA EXPRESIÓN DE LA INTEGRINA β 1 Y PROMUEVE LA MIGRACIÓN DE UNA LÍNEA DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS A TRAVÉS DE LAS VÍAS DE MAPK Y PI3K/AKT

Furmento, Verónica Alejandra; Blank, Viviana Claudia; Marino, Verónica Julieta; Roguin, Leonor Patricia.

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

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 estimula la expresión de la metaloproteínasa-2 y la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular mediante la activación de Erk1/2, PI3K/Akt y del factor nuclear κ B. Asimismo, si bien comprobamos que el G-CSF constituye un estímulo suficiente para estimular la migración de las células Swan 71, las vías de transducción que participan en este proceso no habían sido dilucidadas. Con el fin de estudiar las cascadas de señalización involucradas en la migración celular inducida por el G-CSF empleamos dos estrategias para bloquear las vías de MAPKs p38 y Erk1/2, y de PI3K: empleo de inhibidores farmacológicos y de mutantes dominantes negativos (DN). Mediante "ensayos de la herida" ("wound healing assay") observamos que luego de incubar las células Swan 71 con 100 ng/ml de G-CSF durante 16 h se produce un aumento del 20% ($p < 0,05$; $n = 6$) en el cierre de la herida con respecto a células incubadas en ausencia de la citoquina. Este efecto fue revertido en presencia de 2 μ M SB203850 (inhibidor de p38) ($p < 0,001$; $n = 4$), 1 μ M PD98059 (inhibidor de MEK1/2) ($p < 0,05$; $n = 4$) y 1 μ M Ly294002 (inhibidor de PI3K) ($p < 0,01$; $n = 4$). Resultados similares fueron obtenidos cuando las células Swan 71 fueron transfectadas con DN de p38 ($p < 0,001$; $n = 4$), Erk1/2 ($p < 0,001$; $n = 4$) y PI3K ($p < 0,001$; $n = 4$). Además, por ensayos de Western blot demostramos que 100 ng/ml de G-CSF estimulan la expresión de la integrina β 1 luego de 4 y 8 h de incubación. En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren que tanto las vías de MAPKs p38 y Erk1/2 como la de PI3K/Akt favorecen la migración de células Swan 71 inducida por el G-CSF. A su vez, esta citoquina estimula la expresión de la integrina β 1, un receptor clave para la adquisición de un fenotipo invasivo en células trofoblásticas.

061. (192) PARTICIPACIÓN DE ERK1/2 EN LA EXPRESIÓN DE LA MAPK FOSFATASA MKP-3 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MDA-MB-231

Nudler, Silvana; Bravo, Melissa; Cohen Sabban, Juan Manuel; Mori Sequeiros García, María Mercedes; Gorostizaga, Alejandra Beatriz; Paz, Cristina.
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-UBA-CONICET

ERK1/2, miembros de la familia de las MAPK con un rol preponderante en la proliferación celular, son reguladas por quinasas que promueven su activación y fosfatasas que promueven su inactivación (MAPK fosfatasas, MKP). MKP-3 es específica para ERK1/2 e inducible sólo por estímulos proliferativos. Previamente demostramos la regulación del ARNm y de la proteína MKP-3 por suero fetal bovino (SFB, 10%) en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Aquí analizamos la participación de ERK1/2 en esa regulación. El análisis por Western blot mostró que el SFB (E) aumenta cuatro veces los niveles de la proteína respecto al valor basal (C) a las 2h ($C = 0,30 \pm 0,05$; $E = 1,22 \pm 0,25$, $p < 0,05$), efecto que se anula a las 3h. También demostramos que los niveles basales de la proteína aumentan conforme progresa el tiempo de exposición al PD98059 (PD), inhibidor de la quinasa que activa a ERK1/2, a partir de las 2 h ($C = 0,52 \pm 0,20$; $PD = 1,59 \pm 0,20$, $p < 0,05$). Mediante RT-PCR semicuantitativa, y usando un único par de primers, habíamos demostrado la presencia de dos transcritos de MKP-3 (formas L o larga y S o corta) en estas células. En este trabajo confirmamos la presencia de ambos mensajeros y la mayor abundancia de la isoforma L, mediante PCR en tiempo real y el uso de primers específicos para cada isoforma. El análisis de los niveles del ARNm (L) mostró que el PD reduce notablemente los niveles del mismo en células tanto controles como estimuladas con SFB, sugiriendo que ERK1/2 estimula la transcripción y/o estabilización del ARNm de MKP-3. Estos resultados, sumados a que la inhibición de ERK1/2 aumenta los niveles de la proteína MKP-3, indican que ERK1/2 regula los niveles del mensajero y de la proteína aunque de manera opuesta. La inestabilidad de MKP-3 promovida por ERK1/2 podría explicar –al menos en parte– la persistente activación de ERK1/2 que muestran estas células aún luego de 48 h de privación de suero.

062. 218) FUNCIÓN DE LA IL-1B EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL Y EN LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN FIBROSIS QUISTICA

Clauzure, Mariángel; Valdivieso, Ángel Gabriel; Massip Copiz, María Macarena; Cancio, Carla Estefanía; Mori, Consuelo; Asensio, Cristian; Santa-Coloma, Tomás Antonio
Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET

La fibrosis quística (FQ) está caracterizada por una condición inflamatoria general con elevada concentración de citoquinas en esputo, incluyendo interleuquina 1-B (IL-1B). Trabajos previos de este laboratorio demostraron el rol de IL-1B como modulador extracelular de la expresión de ARNm de CFTR. Esta modulación es bifásica: estimuladora a dosis bajas ($< 0,7-1,0$ ng/ml) e inhibitoria a dosis altas ($> 2,5$ ng/ml). Por otro lado, en FQ se encontró reducida la expresión de MTND4, una subunidad clave para la actividad de Complejo I mitocondrial (Cm-I). Consecuentemente, se encontró una actividad reducida de Cm-I. En este trabajo se demostró que hay un aumento en la expresión y secreción de IL-1B en células IB3-1 (FQ) y en células Caco-2/pRS26 (shRNA específico para CFTR) respecto de las células controles. Asimismo, se demostró que IL-1B (5 ng/ml) reduce la actividad de Cm-I y aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células S9 (células IB3-1, "FQ rescatadas") o Caco-2/pRSctrl (shRNA control) a valores comparables a los de IB3-1 o Caco-2/pRS26. La incubación con un anticuerpo bloqueante de IL-1B, con antagonista del receptor de IL-1 o con inhibidores de NF- κ B o de p38, restauró la actividad de Cm-I y redujo las ROS mitocondriales y citoplasmáticas en las células IB3-1 o Caco-2/pRS26 a valores normales. Inhibidores de MEK1/2 o de JNK, no mostraron efecto. En conclusión, los resultados sugieren que la secreción de IL-1B y su señalización autócrina es responsable de la reducción de la actividad Cm-I y del aumento de ROS observados en células con la actividad del CFTR alterada. Resultados similares con respecto a la falla mitocondrial del Cm-I han sido observados en ratones transgénicos que expresan CFTR mutado. Agradecimientos: Subsidios CONICET (PIP 2012-2014, 0685), ANPCYT (PICT-2012, 1278) y UCA. Becas CONICET (MMMM), ANPCYT (CEC) y UCA (MC).

063. (251) RELEVANCIA DE LA VÍA APOPTÓTICA-LISOSOMAL EN LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR MANGANESO EN CÉLULAS C6 DE GLIOMA DE RATA

Gorojod, Roxana Mayra¹; Alaimo, Agustina¹; Pavia, Patricia²; Porte Alcón, Soledad¹; Saravia, Flavia Eugenia²; Kotler, Mónica Lidia¹
*Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-Oncología, Depto. de Química Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (QUIBICEN)- CONICET-FCEN-UBA*¹ *Laboratorio de Neurobiología, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA / Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)- CONICET*²

El manganismo es un desorden neurodegenerativo originado por sobre-exposición crónica a Mn cuyo cuadro clínico y vías de señales se asemejan a los de la Enfermedad de Parkinson Idiopática. Este metal se acumula preferentemente en los ganglios basales y en particular, en las mitocondrias y lisosomas, donde puede generar especies reactivas de oxígeno que afectan las membranas de estas organelas. La permeabilización de la membrana lisosomal (PML) conduce a la liberación de hidrolasas al citosol y a la apoptosis. En este trabajo se investigó el posible nexo entre la PML y la activación de mecanismos apoptóticos como consecuencia de la exposición a Mn en células C6 de glioma de rata. Además, se realizaron ensayos *in vivo* para evaluar la presencia de alteraciones en los lisosomas luego de la intoxicación aguda con Mn en ratas. Se observó que el Mn induce un aumento (2-4 veces; $p < 0,001$) en el tamaño de las vesículas ácidas que puede ser totalmente prevenido por preincubación con antioxidantes. Asimismo, la exposición al metal genera PML y liberación de

Catepsina D (CatD) al citosol, procesos que tienen lugar río arriba de la injuria mitocondrial. El estudio del rol de las catepsinas en la vía de muerte celular apoptótica demostró que las CatD y B regulan los niveles de expresión de FasL, favorecen el clivaje de caspasa-8 y Bid ($p < 0,001$) y amplifican la vía de muerte mitocondrial. Los estudios *in vivo* sugieren la existencia de alteraciones en los ganglios basales involucrados en la toxicidad del Mn. En particular, se detectó una disminución en la inmunomarcación de GFAP en el *striatum* y una alteración en la expresión de la CatD en las neuronas del *striatum* y la *substantia nigra pars compacta*. En conjunto, nuestros resultados demuestran por primera vez que los lisosomas constituyen un blanco estratégico de la toxicidad del Mn. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento de los mecanismos de daño activados en el manganeso y probablemente en otras enfermedades neurodegenerativas.

064. (259) REGULACIÓN DE LA TIROSINA QUINASA C-SRC EN FIBROSIS QUÍSTICA. ROL DE LA IL-1 β

Massip Copiz, María Macarena; Valdivieso, Angel Gabriel; Clauzure, Mariángeles; Cancio, Carla Estefanía; Mori, Consuelo; Asensio, Cristian; Santa Coloma, Tomás Antonio *Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET*

La Fibrosis Quística (FQ) es una de las enfermedades hereditarias autosómicas recesivas más frecuentes. 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 c-Src estaba aumentada en células FQ y que el LPS (lipopolisacárido bacteriano) tenía un rol diferencial en dicha activación. Teniendo en cuenta que en FQ se encuentra elevada la concentración de interleuquina 1- β (IL-1 β) y que nuestro laboratorio ha demostrado que a dosis altas la IL-1 β inhibe la expresión del ARNm del CFTR, los objetivos de este trabajo fueron estudiar el rol de la IL-1 β en la activación de c-Src y corroborar el aumento de la actividad de c-Src en ratones KO para CFTR. Se utilizaron dos modelos celulares: células IB3-1 (con la mutación deltaF508) y S9 (IB3-1 corregidas que expresan CFTR wt) y células CaCo-2, que expresan CFTR wt, transfectadas con shARNs contra CFTR (CaCo-2/pRS26). En este último modelo se corroboró mediante Western Blots (WB) que la actividad de c-Src era mayor en las líneas celulares transfectadas que mostraban mayor inhibición del CFTR. Preliminarmente, utilizando diferentes estrategias de bloqueo de la IL-1 β , se observó mediante WB, una disminución diferencial de la actividad de c-Src en células con fenotipo FQ (IB3-1; CaCo-2/pRS26) comparadas con las células control (S9; CaCo-2/pRSctrl). Paralelamente, se está estudiando si es posible observar el aumento de la actividad de c-Src en diferentes órganos de ratones KO para CFTR comparándolos con ratones WT. Preliminarmente se ha observado en pulmón y páncreas un aumento de la actividad de c-Src. En conclusión, la inhibición de la actividad o expresión del CFTR produce un incremento en la actividad de c-Src y estaría involucrada parcialmente la vía de la IL-1 β . Agradecimientos: Subsidios ANPCYT PICT-2012-1278, CONICET PIP 2012-2014-0685 y UCA. Becas CONICET(MMMC), ANPCYT(CEC) y UCA(MC).

065. (369) RNAS TRANSCRIPTOS DE HETEROCROMATINA CENTROMÉRICA INHIBEN LA PROLIFERACIÓN Y LA DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS 3T3-L1

Susperreguy, Sebastián; Toneatto, Judith; Naselli, Agustina; Galigniana, Natalia; Charo, Nancy; Piwien Pilipuk, Graciela. *Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET*

Las regiones centromérica y pericentromérica de los cromosomas eucariotas se caracterizan por presentar secuencias de ADN repetitiva, designadas en ratón, satélite menor y mayor. Recién en la última década, transcritos originados en estas regiones han sido descriptos en el ensamblado de la heterocromatina centromérica y la regulación de la actividad de proteínas asociadas al ciclo celular. En nuestro laboratorio estudiamos los

eventos moleculares que asocian a los procesos de diferenciación adipocítica y proliferación celular con la expresión de estos transcritos. Resultados previos demostraron un aumento en la expresión de los transcritos del satélite menor y mayor entre los días dos y cuatro de iniciada la diferenciación de 3T3-L1. Por otro lado, demostramos un aumento de estos transcritos en células en crecimiento exponencial comparadas con células quiescentes. Esto último fue corroborado por un reciente informe que asocia diversos cánceres en humanos con el incremento de estos transcritos. De acuerdo a esto, nos propusimos como objetivo, evaluar el rol funcional de estos transcritos sobre la proliferación celular y en la diferenciación de células 3T3-L1. Para ello, clonamos en el vector pCDNA3.1 los fragmentos de 300 y 500 pb de los transcritos del satélite menor (centromérico) y generamos clones que los sobreexpresan de manera estable para ser comparados con el vector vacío. Evaluamos la proliferación celular por citometría de flujo marcando las células con CFSE y las fases del ciclo celular donde las células puedan encontrarse usando yoduro de propidio. Por otro lado, analizaremos si se observan cambios en la diferenciación celular a los 8 días de iniciado el proceso, mediante coloración con Oil Red para evidenciar vacuolas lipídicas. Resultados preliminares indican que la sobreexpresión de transcritos originados en el satélite menor inhibe la diferenciación de células 3T3-L1 y también disminuyen su tasa de proliferación.

066. (373) INTERACCIÓN ENTRE EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDE (GR) Y EL DE PROGESTÁGENOS (PR) EN CÉLULAS VIVAS MEDIANTE ANÁLISIS DE CORRELACIÓN CRUZADA DE FLUORESCENCIA

Marini, Melisa Soledad¹; Ogara, María Florencia¹; Stortz, Martín¹; Levi, Valeria²; Pecci, Adalí¹ *Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias¹ Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA²*

El receptor de glucocorticoide (GR) y de progestágenos (PR) son miembros de la familia de receptores esteroideos. Poseen características estructurales y funcionales similares y reconocen las mismas secuencias en el ADN. La activación del PR está asociada a la proliferación celular y la progresión de tumores mamarios, mientras que la activación del GR favorece la diferenciación celular. Así, la abundancia relativa de ambos receptores podría modular la respuesta proliferativa del epitelio mamario. En vista a estos antecedentes, el objetivo del trabajo fue analizar la capacidad de ambos receptores de formar parte de un mismo complejo. Se realizaron ensayos de co-immunoprecipitación de proteínas a partir de extractos celulares de la línea celular T47D/A1-2 (que coexpresa GR y PR) tratados con la nucleasa benzonasa. Se observó que ambos receptores co-precipitan independientemente de la integridad del ADN. A fin de evaluar si PR y GR tienen la potencialidad de formar complejos *in vivo* se transfectaron células T47D con vectores de expresión que codifican para ambos receptores fusionados a proteínas fluorescentes (mCherry-GR y GFP-PR) y se realizaron determinaciones de correlación cruzada de fluorescencia. En particular, utilizamos la técnica de N&B de dos colores en la cual se determinó el parámetro de correlación cruzada de Brillo (Bcc), el cual se relaciona con el grado de interacción entre dos moléculas fluorescentes. A partir de este análisis se observó que en las células tratadas conjuntamente con el progestágeno R5020 y el glucocorticoide Dexametasona, el Bcc fue mayor (Bcc=0,042 \pm 0,004) comparado con el obtenido en células tratadas con cada hormona por separado (Bcc=0,008 \pm 0,004). Mutaciones en los dominios de dimerización del GR afectaron la capacidad de formar complejos con PR, sugiriendo la existencia de heterodímeros PR-GR.

067. (408) LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CANAL DE CLORURO CFTR DETERMINA UNA DISMINUCIÓN DEL PH EXTRACELULAR EN CULTIVOS CELULARES

Cancio, Carla Estefanía; Mori, Consuelo; Clauzure, Mariángeles; Massip Copiz, María Macarena; Asensio, Cristian; Valdivieso, Angel Gabriel; Santa Coloma, Tomás Antonio

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

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones que afectan la actividad del canal de cloruro CFTR. Además de transportar Cl⁻, su actividad se ha visto asociada al transporte de bicarbonato, con implicancias en la regulación del pH extracelular. Recientemente reportamos una reducción de la actividad del Complejo I mitocondrial en FQ que está mediada por IL-1beta. La reducción de la respiración celular en FQ podría conducir a un aumento en la producción de lactato que, sumado a la alteración del transporte de bicarbonato, podría profundizar la reducción del pH extracelular. Nuestro objetivo es determinar si la falla del CFTR induce una disminución en el pH extracelular en cultivos celulares y los posibles mecanismos involucrados. Como modelos de FQ se utilizaron células IB3-1 (FQ) y células C38 (IB3-1 con CFTR corregido); y células Caco-2 (expresan CFTR) transfectadas con un plásmido de ARN de interferencia contra el CFTR (shRNAi, Caco-pRS26) y con un plásmido control (Caco-pRS30003). Se cultivaron 20000 células/cm² en medio DMEM/F12 con 5% de suero fetal bovino, se dejaron crecer 3 días y luego fueron incubadas en medio libre de suero a diferentes concentraciones de bicarbonato. Los resultados mostraron una disminución del pH extracelular en células IB3-1 (pH=7,65) respecto a las células C38 (pH=7,94) de 0,29 ± 0,06 puntos (media±SE, n=3) en medio sin HEPES. Resultados similares fueron obtenidos en células IB3-1 (pH=7,02) y C38 (pH=7,31) incubadas en medio con HEPES. Estos resultados se repitieron en células Caco-pRS26 con respecto a las células Caco-pRS30003. Podemos concluir que efectivamente existe una reducción en el pH extracelular en cultivos de modelos celulares FQ. Esta disminución posiblemente esté relacionada con una mayor producción de lactato y una menor secreción de bicarbonato. Agradecimientos: CONICET, PIP-2012-2014-0685 y PICT 2012-1278 de la ANPCYT. Beca Agencia (CEC), beca CONICET (MMMC) y beca UCA (MC).

068 (443) LA INDUCCIÓN DE DICKKOPF-1 MEDIADA POR ANDRÓGENOS EN LA PAPILA DÉRMICA INHIBE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO PILOSO HUMANO

Ceruti, Julieta María; Castellanos, María Lía; Kusinsky, Ana Gabriela; Leirós, Gustavo José; Balaña, María Eugenia Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein (ICT 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. Resultados previamente publicados por nuestro laboratorio mostraron que la inhibición de la diferenciación de las HFSC por los andrógenos podría ser una de las causas. Se ha reportado que en respuesta a los andrógenos, dickkopf-1 (DKK-1) se sobreexpresa y es secretada en DPC alopécicas, inhibiendo el crecimiento y causando apoptosis en queratinocitos de la ORS. En el presente trabajo estudiamos el rol de DKK-1, antagonista de Wnt, en la diferenciación de una línea celular de HFSC en un sistema de co-cultivo con DPC que expresan establemente el receptor de andrógenos (DPC-AR). Mediante PCR cuantitativa en tiempo real y western blot comprobamos que la expresión de DKK-1 es regulada positivamente por DHT (~20 veces) en DPC-AR. Este aumento no se observa cuando las DPC son incubadas con flutamida, un antagonista androgénico. La diferenciación de HFSC en co-cultivo con DPC-AR, medida por el aumento del marcador de pelo K6hf, fue impedida en presencia de DHT o de hDKK-1 recombinante. Es sabido que la vía Wnt/β-catenina afecta el crecimiento del pelo positivamente y hemos reportado que los andrógenos la inhiben afectando la diferenciación de las HFSC. El tratamiento de DPC-AR con hDKK-1 o DHT disminuyó la relación proteica de β-catenina citoplasmática vs total, indicando una inhibición de la

vía Wnt canónica. Estos resultados sugieren que el bloqueo de los andrógenos sobre la diferenciación de las HFSC a pelo podría estar mediado por DKK-1.

069. (456) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL GR SOBRE NF-KB A TRAVÉS DEL RECEPTOR H1 A HISTAMINA

Zappia, Carlos Daniel¹; Granja Galeano, Gina¹; Shayo, Carina²; Fernández, Natalia¹; Fitzsimons, Carlos³; Monczor, Federico¹.

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 Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, The Netherlands.³

La interacción entre la señalización de receptores acoplados a proteína G y los receptores a glucocorticoides (GR) ha sido previamente reportada. A dosis terapéuticas, los ligandos del GR poseen una potente actividad antiinflamatoria, resultando irreemplazables para el tratamiento de numerosas patologías. A su vez, los antihistamínicos, agonistas inversos del receptor H1 a histamina (H1R), son ampliamente utilizados para combatir situaciones de tipo alérgico-inflamatorias. Por su parte, NF-κB es un importante factor de transcripción proinflamatorio cuya actividad es inhibida por interacción con el GR. Habiendo descrito en nuestro laboratorio la modulación sobre la actividad transactivadora del GR por parte de la señalización del H1R, nuestro objetivo es evaluar dicha modulación sobre la actividad del factor NF-κB. Para ello, cotransfectamos células HEK293T con el GR, el H1R y con un plásmido reportero que codifica para la enzima luciferasa en respuesta a la activación de NF-κB. Con el objeto de inducir la actividad del factor NF-κB, estimulamos las células con TNF-α. En este sistema, el agregado previo de dexametasona inhibe la respuesta a TNF-α y dicho efecto resulta potenciado cuando las células son preincubadas con el antihistamínico mepiramina 10μM (pEC50 8,41 vs 9,18 p<0,01). En un modelo de inflamación respiratoria, las células pulmonares A549, medimos mediante PCR cuantitativa la expresión de los genes endógenos, interleucina 8 y ciclo-oxigenasa 2, participantes clave de los procesos inflamatorios. El tratamiento con dexametasona inhibe la expresión de dichos genes y tal inhibición nuevamente es potenciada significativamente por mepiramina. En conjunto, la potenciación de la respuesta a dexametasona por mepiramina, podría resultar un mecanismo útil que justifique la combinación de agonistas inversos del receptor H1 y agonistas del GR, permitiendo reducir la dosis de estos últimos y minimizar sus efectos adversos sin comprometer su eficacia terapéutica.

070. (462) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR GLUCOCORTICOIDE POR LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR CANNABINOIDE TIPO 1. PAPEL EN EL HIPOCAMPO Y EN LOS PROCESOS DE MEMORIA Y APRENDIZAJE

Granja Galeano, Gina¹; Domínguez Rubio, Ana Paula²; Zappia, Carlos Daniel¹; Zorrilla Zubilete, María³; Fitzsimons, Carlos⁴; Franchi, Ana María²; Monczor, Federico¹

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Laboratorio de la Fisiología de la Preñez y el Parto, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET² Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³ Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, The Netherlands.⁴

Los receptores cannabinoides (CB) y glucocorticoides (GR) se coexpresan en diversas áreas del SNC incluyendo el hipocampo, involucrado en procesos de aprendizaje y memoria. Previamente describimos que la activación del CB1 modula la actividad del GR *in-vitro*. Con el fin de confirmar dicha regulación *in-vivo*, se estudió la respuesta a Dexametasona (Dex) en hipocampo de ratones machos de la cepa CD1 de 2 meses de edad con fenotipo

salvaje (WT) o knock-out CB1^{-/-} (KO) usando qPCR para evaluar la expresión de GILZ, gen regulado por el GR. Los ratones se trataron vía *i.p.* con 100 µl de vehículo o de antagonista CB1 AM251 (1 µg/g), y luego de 2 hs con 100 µl de vehículo o de Dex (15 µg/g). A las 6 hs se sacrificaron por dislocación cervical. En los ratones WT, la administración de Dex aumentó 2 veces la expresión de GILZ y el cotratamiento con AM251 potenció dicha respuesta en un 60%. En los ratones KO el tratamiento con Dex aumentó la expresión de GILZ 1,6 veces respecto al WT, sin observarse efectos del AM251, indicando que el CB1 inhibe la actividad transcripcional del GR en hipocampo. Dado que el GR regula procesos de aprendizaje y memoria de experiencias post-traumáticas, realizamos ensayos de comportamiento animal con el fin de evaluar la participación del sistema cannabinoide en dichos procesos. Los resultados obtenidos a partir del test de campo abierto indicaron que los ratones KO presentan una actividad locomotora conservada y un déficit en la memoria de habituación, evaluada por una re-exposición al mismo ambiente a las 24 hs. Por otro lado, al evaluar la memoria asociativa en un test de evitación inhibitoria, los ratones KO presentaron una mayor latencia que los WT a pasar al ambiente aversivo. Nuestros resultados indican la existencia de un mecanismo por el cual el sistema cannabinoide regula la respuesta genómica a glucocorticoides en el hipocampo, que estaría implicado en los procesos de aprendizaje y memoria de experiencias post-traumáticas.

071. (481) LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ANTI-INFLAMATORIA TRISTETRAPROLINA (TTP) EN EL EPITELIO MAMARIO ES RELEVANTE PARA EL MANTENIMIENTO DE LA LACTANCIA

Goddio, María Victoria¹; Pérez-Cuervo, Lourdes¹; Gattelli, Albana¹; Tocci, Johanna¹; Veggetti, Mariela¹; Mouthinho, Lirane¹; Meiss, Roberto²; Kordon, Edith¹
Instituto de Fisiología, Biología molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-UBA-CONICET¹ Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires²

El desarrollo de la glándula mamaria es un proceso complejo, de múltiples etapas. Del embarazo a la lactancia, el crecimiento lobuloso-alveolar es seguido por la diferenciación completa del epitelio mamario, responsable de la producción y secreción de leche. Al destete se produce un cambio rápido en la señalización de supervivencia a muerte celular que involucra la expresión y actividad de factores pro-inflamatorios. Tristetraprolina (TTP) es una proteína con efectos anti-inflamatorios por inducir inestabilidad y baja traducibilidad del ARN mensajero que codifica para estas citoquinas. Nuestros resultados previos muestran que la expresión TTP está asociada al grado de diferenciación de las células mamarias alcanzando los niveles más altos en este tejido durante la lactancia. Para demostrar que TTP es relevante en el mantenimiento del amamantamiento utilizamos ratones doble-transgénicos en los cuales la expresión de la recombinasa Cre en la mama luego del parto resulta en la delección del gen TTP. Se analizaron muestras de tejidos tomados a diferentes tiempos de lactancia e involución de la glándula mamaria. El análisis de los cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina muestran en los animales experimentales alteraciones morfológicas de los alvéolos partir de los 10 días de amamantamiento así como una mayor deposición de colágeno luego del retiro de la crías. Hallamos además, por inmuno-histoquímica, diferencias significativas en la cantidad de células apoptóticas en hembras amamantando, detectadas por la presencia caspasa-3 activa, así como un aumento en los niveles de Stat-3 fosforilado. Además, por RT-PCR cuantitativa detectamos un aumento de expresión de las citoquinas LIF, IL6 y TNF alfa. En conjunto, estos hallazgos indican que la disminución en los niveles de TTP desencadena eventos moleculares e histológicos asociados a la involución mamaria. Por lo tanto, la presencia de esta proteína contribuye significativamente al mantenimiento del amamantamiento.

072. (522) ESTUDIO DEL EFECTO ANTIADIPOGÉNICO DEL 1,8-CINEOL EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS 3T3-L1

Muñoz Bernart, Melina¹; Toneatto, Judith¹; Moreno, Silvia²; Piwien-Pilipuk, Graciela¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Fundación Instituto Leloir, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA)-CONICET²

Diversos fitoquímicos son capaces de regular el proceso de adipogénesis, hecho que recibe considerable atención debido a las limitaciones y efectos colaterales de las drogas que se disponen actualmente para el tratamiento de la obesidad. El compuesto natural 1,8-cineol (eucaliptol) es el principal epoxi-monoterpeno presente en el aceite esencial de eucalipto. Si bien se sabe que presenta actividad antiinflamatoria, en el presente estudio se reporta por primera vez, su potencial efecto inhibitorio de la diferenciación adipocítica. En el modelo de diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 encontramos que el tratamiento con 0,125% de 1,8-cineol bloqueó el proceso de adipogénesis sin afectar la viabilidad de los preadipocitos 3T3-L1 evaluada por el ensayo de MTS. Los eventos moleculares que tienen lugar durante el proceso de adipogénesis involucran la expresión de factores de transcripción de expresión temprana (C/EBPβ) y tardía (PPARγ). C/EBPβ se presenta en dos formas: LAP (*Liver Activating Protein*) y LIP (*Liver Inhibitory Protein*), siendo la primera la mayoritaria. Cuando se induce la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 en presencia del compuesto vegetal se inhibió la expresión del factor de transcripción C/EBPβ, tanto de su forma LAP como LIP. Esta falla en la correcta expresión de C/EBPβ conlleva a una disminución de la expresión de PPARγ, receptor nuclear indispensable para la adquisición y mantenimiento del fenotipo adipocítico. En síntesis, estos resultados demuestran que el 1,8-cineol ejerce un efecto antiadipogénico al interferir en la expresión de factores de transcripción cruciales en la adquisición del fenotipo adipocítico. De este modo, el 1,8-cineol además de su empleo como agente antiinflamatorio podría ejercer algún efecto beneficioso en el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas.

073. (559) LAS INMUNOFILINAS DE ALTO PESO MOLECULAR FKBP51 Y FKBP52 REGULAN AL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB AL INDUCIRSE EL PROCESO DE ADIPOGÉNESIS

Naselli, Agustina; Fernández-Ceschán, María I.; Charo, Nancy L.; Toneatto, Judith; Piwien-Pilipuk, Graciela
Instituto de Biología y Medicina 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, como diabetes tipo 2. Hemos demostrado que las inmunofilinas (INMs) FKBP51 y -52 modifican su nivel de expresión de manera opuesta durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1, aumentando progresivamente la expresión de FKBP51 y disminuyendo la de FKBP52. FKBP51 sufre una dinámica relocalización mitocondria-núcleo durante el proceso de adipogénesis y dicha redistribución es regulada por la vía AMPc- PKA. Ello nos llevó a hipotetizar que FKBP51 podría participar en el control de factores que se activan por PKA, como por ejemplo CREB (*cAMP Response Element Binding protein*), factor de transcripción que regula la expresión de genes proadipogénicos. Empleando inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, observamos en el núcleo de preadipocitos 3T3-L1 muy bajo nivel de FKBP51, como de la forma fosforilada de CREB. En cambio, al inducir la diferenciación de los preadipocitos hay un marcado aumento de la señal de ambas proteínas en el núcleo evidenciándose una importante co-localización de las mismas. De manera relevante, CREB co-inmunoprecipita con FKBP51 demostrándose que ambos factores interactúan. Así mismo, CREB no sólo co-inmunoprecipita con FKBP51 sino también lo hace con FKBP52, INM que también transloca a núcleo al inducirse el proceso de adipogénesis. Debido a la alta homología entre estas dos INMs y debido a que se encuentra documentado que ejercen efectos antagonistas sobre los factores con los que interactúan, nos encontramos avocados a dilucidar la importancia funcional

de la interacción de CREB con dichas INMs empleando ensayos de gen de reporte, resultados que serán presentados y discutidos durante la presentación del presente trabajo.

GENÉTICA 1

074. (25) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE GENES VINCULADOS AL COMPLEJO TEOLOMÉRICO SHELTERINA EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO

Paviolo, Natalia S.; Cerliani, María B.; Richard, Silvina M.; Bolzn, Alejandro D
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-CONICET

El complejo proteico shelterina regula la estabilidad telomérica. Dicho Complejo está conformado por seis proteínas de unión al ADN telomérico: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 y RAP1. Alteraciones en su funcionamiento pueden llevar a inestabilidad telomérica y al desarrollo de células tumorales. Previamente, nuestro grupo de trabajo analizó el perfil de expresión de los genes *trf1*, *trf2*, *pot1a* y *tin2* en melanoma murino, demostrando una disminución significativa en la expresión de *trf1* en tejido tumoral, respecto de piel normal. En el presente trabajo, se estudió el patrón de expresión de los genes restantes del complejo, *tpp1* y *rap1* y se caracterizó la expresión de los mismos en melanoma y en diversos tejidos normales de ratón. Se empleó la línea tumoral B16 de melanoma de ratón, inoculada subcutáneamente en el flanco de ratones C57BL/6. De cada ratón, se extrajeron 3 tejidos: hepático, esplénico y melanoma. Como controles se utilizaron, hígado, bazo y piel de ratones normales inoculados con medio de cultivo D-MEM. Se emplearon hígado y bazo debido a que el perfil de expresión de estos genes está disminuido en hígado y sobreexpresado en bazo. Se cuantificó la expresión mediante qPCR, utilizando GAPDH como gen de referencia. El análisis estadístico de los datos se realizó con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Nuestros resultados indican una disminución significativa en la actividad transcripcional de *rap1* pero no de *tpp1* en melanoma, en relación a la expresión del mismo en tejido normal de piel de ratón. Los niveles de expresión de estos genes encontrados en hígado y bazo se corresponden con lo indicado en la bibliografía para estos tejidos. En conjunto, estos resultados indican que en melanoma murino existe una alteración en los niveles de expresión de por lo menos dos de los genes vinculados al mantenimiento del telómero.

075. (45) CARACTERIZACION DE LA DISTRIBUCION INTRACELULAR Y SECRECION DE TIROGLOBULINA DE RATA CON MUTACIONES LOCALIZADAS EN LA REGION I. CONSECUENCIAS SOBRE LA HORMONOGÉNESIS TIROIDEA

Citterio, Cintia E.^{1,2}; Morales, Cecilia M.^{1,2}; Moya, Christian M.²; Rivolta, Carina M.^{1,2}; Rey, Osvaldo¹; Targovnik, Héctor M.^{1,2}
Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²

Tiroglobulina (TG) es la glicoproteína matriz para la síntesis de hormonas tiroideas. El monómero TG pesa 330 kDa y presenta cuatro regiones estructurales y funcionales; las regiones I, II y III están conformadas por dominios repetitivos ricos en cisteínas y la región carboxilo terminal posee homología con la acetilcolinesterasa. La maduración conformacional de la región I es un paso limitante en el proceso de maduración de TG. Defectos en la biosíntesis de TG causan hipotiroidismo congénito por deficiencia de TG con una incidencia de 1:100000 nacidos. El objetivo de este estudio fue caracterizar los efectos de mutaciones espontáneas no descriptas previamente, localizadas en la región I de la TG de rata, sobre la distribución intracelular y secreción de dicha proteína. Se expresó TG con las mutaciones p.L571P, p.Q676R

y p.Q907R (TGmut), en comparación con TG *wild type* (TGwt), en un sistema previamente validado de expresión eucarionte en monocapas de células, y se pusieron a punto técnicas inmunológicas de detección de TG. El análisis de los lisados celulares y sobrenadantes de cultivo mediante Western Blot evidenció la presencia TGwt y TGmut en forma intracelular; por el contrario no se detectó TGmut secretada al sobrenadante de cultivo mientras que TGwt fue detectada en el mismo. En las imágenes de inmunofluorescencia con marcación de TG y 58K (marcador de complejo de Golgi), TGwt presentó una distribución homogénea en el citoplasma celular con una acumulación perinuclear, lo que es característico de una proteína de secreción; por otro lado, TGmut evidenció una masiva acumulación intracelular. Esto último podría indicar que TG no completaría sus modificaciones post-traduccionales y por lo tanto no se secretaría. En conclusión, las mutaciones analizadas, afectaron la distribución intracelular y la adquisición de competencia secretora de TG. Por lo tanto, la hormonogénesis tiroidea estaría imposibilitada por la falta de llegada de TG al lumen folicular.

076. (116) HETEROGENEIDAD DE LAS BASES MOLECULARES DE LAS TALASEMIAS NO DEPENDIENTES DE TRANSFUSIONES (NTDT) EN ARGENTINA

Scheps, Karen¹; Francipane Liliana.²; Bergonzi Mara F.²; Lapunzina Pablo²; Nevado Julián²; Copelli Silvia B.¹; Varela Viviana¹

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET¹ División Genética, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires² INGEMM -Instituto de Genética Médica y Molecular, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, España³

Son un grupo de síndromes que incluyen las talasemias (tal) intermedias (TI) de bases moleculares heterogéneas y la enfermedad de Hb H, pérdida funcional de 3 copias de genes *HBA*. Las TI presentan modificadores primarios (mutaciones en el gen *HBB*), secundarios (afectan el desbalance de cadenas de globina) y terciarios (de predisposición o protección frente a complicaciones). Objetivo: Investigar las bases genéticas en 30 pacientes con NTDT: 27 con TI y 3 con Hb H. Materiales y métodos: Se purificó ADNg. Los genes *HBB* y *KLF1* se analizaron por secuenciación. Las deleciones e inserciones en el *cluster* α se analizaron por PCR-GAP, MLPA y 4 muestras, por FISH y SNP array con la plataforma CytoSNP850K(Illumina). Se estudiaron 3 SNPs asociados a niveles aumentados de Hb F: *rs7482144* (*HBG2*-158, alelo de protección T) por PCR-RFLP, y *rs4895441* (*HBS1L-MYB*, alelo de protección G) y *rs11886868* (*BCL11A*, alelo de protección G) por PCR *Real Time*. Se evaluó el SNP *rs10421768* (*HAMP*:c.-582 A>G, asociado a predisposición a sobrecarga de hierro) por PCR-RFLP. Resultados: En 20 muestras con TI y 3 con Hb H se hallaron los defectos moleculares: 7 presentaron 2 mutaciones β -tal, 13 asociaciones de mutaciones β -tal heterocigota con copias extra de genes α : 9 con $\alpha\alpha$ ^{ami3,7} y 4 con duplicación completa del *cluster*; en los 3 pacientes con Hb H se observó asociación de $-\alpha^{3,7}$ con $-\text{MED1}$ (1) y en 2 con deleciones nóveles en 16p13.3 (88,165-490,645)x1 y 16p13.3(88165-1507988)x1. En los restantes se observó sólo 1 mutación β -tal heterocigota o 2 mutaciones β -tal compatibles con tal mayor; 12 pacientes resultaron GG para *rs11886868* y 1 también GG para *rs4895441*. No se detectaron variantes en *KLF1* asociadas a tal o aumento de Hb F. En el *rs10421768* se halló GG en 1 paciente y AG en 9. Conclusión: Se determinaron las bases moleculares del 80% de los casos. Se caracterizaron los modificadores de TI y se describieron 2 deleciones crípticas nóveles, que optimizaron el consejo genético y tratamiento.

077. (135) DESARROLLO DE ANTICUERPO INHIBIDOR CONTRA EL FVIII EXÓGENO EN PACIENTES ARGENTINOS CON HEMOFILIA A SEVERA: ESTIMACIÓN DEL RIESGO ASOCIADO A CADA TIPO DE MUTACIÓN CAUSAL DEL F8

Marchione, Vanina Daniela¹; Radic, Pamela¹; Abelleiro, Martín¹; Larripa, Irene¹; Neme, Daniela³; Candela, Miguel^{2,3}; De Tezanos Pinto, Miguel^{2,3}; De Brasi, Carlos^{1,2}; Rossetti, Liliana¹ *Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina*¹ *Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHEMA), Academia Nacional de Medicina*² *Fundación de la Hemofilia*³

Uno de cada 5 pacientes Argentinos con Hemofilia A severa (HAs) desarrolla anticuerpos neutralizantes contra el FVIII de coagulación (inhibidor, INH). Varios estudios demostraron que la mutación causal es el factor más importante para la formación de INH. El objetivo del presente estudio es estimar el riesgo de desarrollar INH asociado a cada genotipo del *F8* en pacientes Argentinos con HAs. Consideramos un grupo no sesgado de pacientes ($n=107$) con una prevalencia global de INH de 17,6% para estimar las frecuencias de cada tipo/localización de mutaciones del *F8* y un grupo inclusivo ($n=304$, 103 casos y 201 controles) para estimar los riesgos de INH relativo (OR) y absoluto (IP). El análisis molecular del *F8* fue realizado por un algoritmo desarrollado en nuestro laboratorio. El estudio caso/control permitió estimar los riesgos específico de INH como [OR; IP(CI95%)] clasificando como de alto riesgo a las deleciones multi-exón [4,2; 61%(21-100)], inversión del intrón 22 [1,7; 23%(18-27)] y mutaciones *nonsense* en la cadena liviana del FVIII [2,4; 38%(14-91)]; como de riesgo intermedio a las deleciones de un exón, *indel frameshifts* y *nonsense* en la cadena pesada; y como grupo de bajo riesgo a las mutaciones *missense* [0,1; 3%(0,8-8)]. Cuando clasificamos grupos de mutaciones respecto al algoritmo de estudio molecular, los grandes rearrreglos (de detección rápida), vs pequeñas mutaciones, casi duplicaron el riesgo de INH [1,9; 23%(19-28)] y esta asociación resultó altamente significativa $p=0.008$. La idea de ordenar el estudio molecular del tipo de mutación causal de las HAs (1ro las inversiones del *F8* y las grandes deleciones) que puede completarse en menos de una semana permite estimar en poco tiempo los riesgos de INH de cada paciente. Esta información caso-específica ayudará al médico a ser más preciso en la elección de los tratamientos y regímenes más adecuados para su monitoreo clínico periódico.

078. (196) NUEVOS APORTES A LA GENÉTICA Y FENÓMICA DE LA RESISTENCIA A HORMONAS TIROIDEAS

Osorio Larroche, Carolina; Olcese, María Cecilia; Belforte, Fiorella S.; Morales, Cecilia M.; Targovnik, Héctor M.; Rivotta, Carina M. *Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)- CONICET-UBA; Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*

El Síndrome de Resistencia a Hormonas Tiroideas (RTH), es un desorden genético autosómico dominante, causado por mutaciones en el gen THR- α (17q11 2-21) y gen THR- β (3p 22-24) los cuales codifican para los Receptores de Hormonas Tiroideas. El 90% de estas mutaciones ha sido descrito para el gen THR- β localizándose el 75% en los exones 9 y 10, y el 25% en los exones 7 y 8. En este estudio, se analizaron 10 familias no relacionadas con cuadro clínico bioquímico compatible con RTH. Los exones 7, 8, 9 y 10 se amplificaron por PCR a partir de ADN de sangre periférica. Posteriormente los fragmentos fueron purificados por columna y secuenciados. Se identificaron 3 mutaciones, una de ellas no descrita previamente, c.C1355T;p.P452L (de novo) y otras dos reportadas en bibliografía c.C802G;p.A268G (herencia materna), c.G1033C;p.G345R (de novo). Se realizó un estudio poblacional por SSCP en geles de poliacrilamida al 10% para determinar que la variante p.P452L no se trata de un polimorfismo. Dichas mutaciones se localizan en regiones con un alto grado de conservación evolutiva. Se examinaron las variaciones estructurales y fisicoquímicas utilizando los programas Swiss-PdbViewer versión 4.0.3 y PyMOL v1.7.2, en base a estructuras cristalográficas del dominio de unión al ligando de la isoforma 1 del receptor β humano (Protein Data Bank: archivos 3GWS, 1NAX, 1BSX y 3D57). Nuestros resultados sugieren que la mutación

p.A268G induce cambios en el valor de energía de minimización tal como fue calculado mediante el programa Swiss PDB Viewer 4.04. La mutación p.G345R ocasiona un impedimento estérico del receptor sobre T3 y la p.P452L produce cambios en la superficie electrostática de la proteína. Las técnicas de biología molecular contribuyen a la identificación y caracterización de mutaciones en el gen THR β y son fundamentales para el diagnóstico preciso y tratamiento adecuado de esta patología.

079. (284) MUTACIONES DEL GEN RB1 EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA UNILATERAL ESPORÁDICO

Szijan, Irene¹; Ottaviani Daniela¹; Luce Leonela¹; Ferrer Marcela²; Giliberto Florencia¹; Parma Diana¹ *Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*¹ *División Neurocirugía. Hospital de Clínicas "Jose de San Martín", Universidad de Buenos Aires*²

El retinoblastoma (RB), un neoplasma embrionario, es el cáncer ocular primario más común en la niñez. Puede ocurrir como hereditario o no hereditario en iguales proporciones. El RB bilateral (40%) es siempre hereditario, el RB unilateral (60%) es no hereditario más frecuentemente (80%). La tumorigénesis se inicia con la inactivación, por diferentes mecanismos genéticos, de ambas copias del gen supresor tumoral *RB1*. La primera mutación es germinal en RB hereditario y la segunda somática, en RB no hereditario las dos mutaciones son somáticas. El objetivo de este trabajo es analizar el ADN de sangre y tumor (si es asequible) de 51 pacientes con RB unilateral esporádico para detectar las mutaciones germinales y somáticas. Se usó un protocolo de múltiples pasos (heteroduplex, secuenciación, MLPA, segregación de polimorfismos) para identificar 9 mutaciones germinales y 7 somáticas. La mayoría de las mutaciones germinales eran deleciones del gen *RB1* entero, las mutaciones somáticas fueron diversas, con varias duplicaciones. Cinco mutaciones eran noveles, en un tumor no se detectó mutación y en otro había tres mutaciones diferentes. La pérdida de heterocigocidad (LOH) se detectó como segunda mutación en 18 de los 32 tumores analizados (56%), de los cuales sólo 6 eran frescos congelados y los restantes estaban en parafina, es decir con ADN no apto para secuenciar. Los 9 pacientes con mutación germinal tenían un estadio avanzado y fueron enucleados, los demás pacientes unilaterales fueron enucleados en el 90% de los casos y un 29% de estos recibieron además quimio o radioterapia. Los pacientes unilaterales con mutación germinal representan un 18% del total de los 51 con RB unilateral estudiados. Esto indica la importancia del análisis genético en pacientes con RB unilateral para determinar si es hereditario o no. Conclusiones: Estos resultados permiten caracterizar el espectro de las mutaciones presentes en nuestra población y pueden mejorar el diagnóstico genético de RB.

080. (290) CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA TIROPEROXIDASA HUMANA. EXPRESIÓN NORMAL Y PATOLÓGICA DE LA ENZIMA EN EL SISTEMA DE BACULOVIRUS: UN MODELO MOLECULAR DE EXPRESIÓN FUNCIONAL

Belforte, Fiorella S.^{1,2}; Targovnik, Alexandra M.³; González Lebrero, Rodolfo⁴; Olcese, María Cecilia^{1,2}; Osorio Larroche, Carolina^{1,2}; Miranda, María Victoria³; González-Sarmiento, Rogelio⁵; Targovnik, Héctor M.^{1,2}; Rivotta, Carina M.^{1,2} *Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA, Hospital de Clínicas "José de San Martín"* *Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*² *Instituto de Nanobiotecnología. Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*³ *Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas y Depto. de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*⁴ *Unidad de Medicina Molecular, Depto. de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Salamanca*⁵

La Tiroperoxidasa humana (hTPO) es una glicoproteína de membrana apical de células foliculares tiroideas responsable de

catalizar la oxidación de yoduro y su organificación en los residuos de tirosina de la Tiroglobulina (Tg), propiciando la síntesis de hormonas tiroideas por acoplamiento de los residuos yodados. Las mutaciones en el gen hTPO son la causa principal de defectos hereditarios de organificación de yodo (IOD). El objetivo del estudio fue investigar el impacto funcional de mutaciones con cambio de sentido en el gen de hTPO previamente identificadas en nuestro laboratorio (p.C808R, p.G387R y p.P499L). Se procedió al clonado secuencial del mensajero de hTPO en el vector pGEMT a partir de muestras de tejido tiroideo humano, con el fin de obtener un secuencia codificante completa de tipo salvaje (WT) de hTPO. Se efectuó mutagénesis dirigida empleando el kit *QuickChange Site Directed Mutagenesis* siendo las secuencias codificantes tanto WT como mutantes clonadas en el vector de transferencia pAcGP67B y las proteínas recombinantes expresadas en el Sistema de Baculovirus utilizando la línea celular SF9. Se recurrió al fraccionamiento subcelular de cultivos infectados y a su caracterización por SDS-PAGE y Western blot. Las fracciones enriquecidas con proteínas recombinantes fueron evaluadas bioquímicamente determinando parámetros cinéticos de la versión WT y mutantes de hTPO mediante el algoritmo Gauss-Newton. Se evidenció una disminución de la actividad enzimática en los tres mutantes, con menor afinidad por el sustrato (KM mayores) así como eficiencias de reacción inferiores (Vmax/KM) con respecto a hTPO WT. En conclusión, resultaron posibles el clonado y puesta a punto de la expresión, purificación y caracterización funcional de hTPO recombinante empleando el Sistema de Baculovirus obteniéndose por primera vez las constantes cinéticas asociadas a la hTPO y variantes portadoras de mutaciones responsables de IOD.

081. (320) ESTUDIO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B (HBV) EN DONANTES DE SANGRE DE ARGENTINA: ANÁLISIS DE GENOMA COMPLETO Y DETECCIÓN DE MUTACIONES EN PROTEÍNAS VIRALES

Salido, Jimena¹; Cánepa, Camila¹; Pataccini, Gabriela¹; Ruggieri, Matías¹; Berini, Carolina¹; Pedrozo, Williams³; Malan, Richard³; Blejer, Jorgelina⁴; Oubia, Jos²; Biglione, Mirna¹; Mathet, Verónica²; Delfino, Cecilia^{1,2}

*Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (INBIRS)-CONICET*¹ *Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (INPAM)-CONICET-UBA*² *Banco de Sangre Central de la Provincia de Misiones, Posadas, Misiones*³ *Sección Medicina Transfusional, Fundación Favaloro, Hospital Universitario.*⁴

Antecedentes: el genoma de HBV (ADN) posee 4 marcos abiertos de lectura (ORF) principales y yuxtapuestos que codifican para las proteínas pC, C, preS1/preS2/S, X y polimerasa (P). Cepas con ciertas mutaciones tienen importantes implicancias clínicas y terapéuticas. Se han descrito 9 genotipos (A-H, J) y múltiples subgenotipos (SG) con diferente distribución mundial. Objetivo: analizar la diversidad genética de 8 genomas completos (GC) de HBV obtenidos de donantes de sangre (DS) del Centro y Norte de Argentina. Metodología: se realizó la amplificación de 8 GC de muestras de DS provenientes de la Fundación Favaloro de la CABA (FF2, FF3, FF5, FF6, FF7 y FF11) y del Banco Central de Sangre de la Provincia de Misiones (CM1 y CM4) por nested-PCR. El producto fue secuenciado y alineado utilizando el software CLUSTALX v1.83, junto a secuencias del Genbank. El árbol filogenético se construyó empleando Neighbor-joining con el programa MEGA v 4.0. Las proteínas de HBV fueron deducidas a secuencias aminoácidas usando el programa BioEdit 7.1. Resultados: FF3 clasificó como SG B2 junto a secuencias de China y Vietnam; FF6, FF7 y FF11 como SG C2 con secuencias de China y Japón; CM1 y CM4 agruparon dentro del SG D3 con secuencias de Bélgica; y FF2 y FF5 resultaron emparentadas con secuencias de Chile (SG F1b) y Argentina (SG F4), respectivamente. Se observaron mutaciones en todos los ORFs analizados. En 5 secuencias se detectaron mutaciones en el ORF X; 3 exhibieron variantes en el ORF S (en el codón de inicio del preS2) y 4 en el dominio rt de la proteína P. Conclusiones: este estudio demuestra que poblaciones de donantes de sangre de nuestro país se encuentran infectadas con cepas de HBV procedentes de diferentes regiones del mundo,

como Asia y Europa. Se destaca la presencia de mutaciones asociadas a infección crónica por HBV y hepatocarcinoma en individuos considerados sanos.

082. (339) DETECCIÓN DE DELECCIONES Y DUPLICACIONES POR MLPA EN PACIENTES CON DISTROFINOPATÍA

Luce, Leonela Natalia; Szijan, Irene; Giliberto, Florencia *Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Las Distrofinopatías son enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X, producidas por mutaciones en el gen de la distrofina. Acorde al patrón de expresión de la distrofina se definen dos cuadros fenotípicos diferentes: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) que afecta a 1:3500 niños, y Distrofia Muscular de Becker (DMB) que afecta a 1:18.000. DMD resulta de una pérdida total de la proteína distrofina, mientras que DMB de una expresión reducida o truncada pero parcialmente funcional. Ambas distrofias se transmiten en forma hereditaria (67%) o por mutaciones de novo (33%). Las alteraciones moleculares descriptas incluyen grandes delecciones (65%), duplicaciones (10%) y mutaciones puntuales (25% restante). La diferencia en la gravedad clínica entre Duchenne y Becker se explica por la Teoría del Marco de Lectura. El objetivo del trabajo consistió en identificar mutaciones en el gen de la distrofina tanto en varones como en mujeres de familias afectadas con distrofinopatía. Se estudiaron 75 muestras mediante la técnica de MLPA (Salsa PO34/PO35 MRC-Holland) y los resultados fueron analizados mediante los programas GeneMarker y Coffalyser. Del total de muestras analizadas 37 provenían de varones afectados, en 29 de ellos (78%) se encontró la alteración molecular (21 delecciones, 6 duplicaciones y 2 mutaciones puntuales). De 10 mujeres sintomáticas, se halló alteración en 5 (4 delecciones y 1 duplicación). De 28 muestras restantes pertenecientes a mujeres asintomáticas y una vellosidad coriónica, 4 resultaron portadoras, 11 fueron NO portadoras y 13 no pudieron ser descartadas. Los resultados obtenidos permiten destacar la potencia diagnóstica del MLPA, con una eficiencia de detección resultó del 78%, permitiendo confirmar el diagnóstico clínico en los afectados e identificar a los familiares portadores. Los estudios realizados colaboran con la caracterización de las distrofinopatías en nuestro país y conducen a una mayor comprensión de las bases genéticas y moleculares, siendo información imprescindible para los grupos de trabajo dedicados al desarrollo de un tratamiento o cura.

083. (349) DISTRIBUCIÓN DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs) PREDICTORES DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIVIRAL EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (HCV) EN LAS DISTINTAS REGIONES GEOGRÁFICAS DE ARGENTINA

Trinks, Julieta¹; Hulaniuk, María Laura¹; Caputo, Mariela²; Locarno, Laura³; Furfuro, Sandra³; Pontoriero, Ana¹; Sanabria, Daiana⁴; Badano, Inés⁴; Debiaggi, María Florencia⁵; Vittori, Lourdes⁵; Bartoli, Sonia⁶; Marino, Miguel³; Corach, Daniel²; Flichman, Diego⁷

*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires*¹ *Servicio de Huellas Digitales Genéticas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*² *Laboratorio de Análisis de ADN, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza*³ *Lab. de Biología Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones*⁴ *Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, Neuquén*⁵ *Centro Regional de Hemoterapia, Hospital "Pablo Soría", San Salvador de Jujuy*⁶ *Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*⁷

Recientemente, se han identificado SNPs predictores de la respuesta terapéutica y de la anemia hemolítica inducida por ribavirina en los genes IL28B e ITPA, respectivamente. Su prevalencia varía según la etnia y, si bien la misma fue estudiada en

el área central argentina y metropolitana de Buenos Aires (Trinks y cols, 2014), no se cuenta con información de la población en diferentes regiones del país. Con el objetivo de determinar la prevalencia de estos SNPs en las distintas áreas geográficas del país, se recolectaron 571 muestras de ADN de voluntarios anti-HCV (-) no relacionados entre sí agrupadas según lugar de nacimiento: NEA (150), NOA (131), Cuyo (175) y Patagonia (115). Los SNPs rs1127354 (ITPA) y rs12979860 (IL28B) se caracterizaron por secuenciación nucleotídica. Los linajes ancestrales se determinaron en 298 muestras mediante análisis de haplogrupos en el ADN mitocondrial e Y-SNPs por PCR en Tiempo Real seguida de desnaturalización de alta resolución. Se empleó el test de Fisher considerándose $p < 0,05$ como valor estadísticamente significativo. El genotipo rs12979860CC (IL28B) -asociado a una respuesta terapéutica favorable- fue menos prevalente en el NOA en comparación con la Patagonia ($p < 0,05$), Cuyo ($p < 0,05$) y NEA; mientras que el genotipo rs1127354CC (ITPA) -asociado a un alto riesgo de anemia hemolítica- fue más prevalente en el NOA en comparación con la Patagonia ($p < 0,01$), Cuyo ($p < 0,05$) y NEA. La frecuencia de rs12979860CC y rs1127354noCC fue significativamente mayor entre individuos con linajes biparentales no nativos americanos (64,2 y 23,9%), intermedio entre mestizos (44,0 y 20,1%; $p < 0,05$) y menor entre individuos con ancestralidad nativa americana (30,2 y 6,3%; $p < 0,05$). Estos resultados destacan la importancia de la determinación previa de estas variantes para evaluar el riesgo-beneficio de la terapéutica de acuerdo a la ancestralidad del paciente, especialmente en regiones con alta prevalencia de la etnia nativa americana.

084. (363) ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN EYA1 EN HIPOACUSIA SINDRÓMICA - BOR (BRAQUIO-OTORENAL SYNDROME)

Buonfiglio, Paula Inés¹; Lotersztein, Vanesa²; Elgoyhen, Ana Belén¹; Dalamon, Viviana¹
Instituto de Investigaciones de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)-CONICET¹ Servicio de Genética, Hospital de Clínicas "Jose de San Martín", Universidad de Buenos Aires²

El Síndrome Braquio-Oto-Renal (BOR) es un trastorno autosómico dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable que se caracteriza por un conjunto de anomalías de tipo braquial, ótica y renal. Entre ellas se encuentra la hipoacusia de tipo neurosensorial, conductiva o mixta (entre el 70% y 93% de los afectados), malformaciones de las estructuras del oído externo, medio e interno, fístulas-quistes braquiales y alteraciones renales. Además los pacientes afectados pueden presentar desde hipoplasia renal hasta agenesia uni o bilateral del órgano. Esta diversidad de fenotipo es común entre distintas familias e incluso en forma intrafamiliar. La incidencia es de 1: 40.000 y afecta al 2% de los pacientes con hipoacusia profunda. El 40% de los pacientes con síndrome de BOR presentan mutaciones en el GEN EYA1 y se han descrito alteraciones también en los genes SIX1 y SIX5. Todos actúan en la vía de regulación de la proliferación y supervivencia de precursores celulares de la organogénesis de lo que se transformará subsecuentemente en el neuroepitelio coclear y vestibular, así como en el riñón en desarrollo. El gen EYA1 (homólogo del gen de *Drosophila* eyes absent) está compuesto por 16 exones que codifican para una proteína de 559 aminoácidos. El objetivo del presente estudio fue establecer el diagnóstico molecular de pacientes hipacúsicos con un fenotipo sospechoso de Síndrome de BOR. Para ello, se realizó la búsqueda de mutaciones en los 16 exones del gen EYA1 mediante técnicas de biología molecular. Se eligieron 8 pacientes con hipoacusia moderada y manifestaciones compatibles con el síndrome de BOR. Del total de pacientes analizados, 4 eran familiares y 4 esporádicos. Se amplificó por PCR simplex cada uno de los 16 exones y regiones aledañas de splicing del gen EYA1, se secuenciaron en duplicado y en forma bidireccional. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de referencia. Se logró establecer la mutación causal de la patología en 3 casos (dos familiares y uno esporádico). Dos de las mutaciones fueron nuevas y la restante fue reportada en una familia de Taiwan. Se identificaron otras 12 variaciones de

secuencia (10 intrónicas y 2 exónicas) cuya relación con la patología no ha podido ser establecida hasta el momento. Todas las muestras evidenciaron al menos una alteración. La importancia de realizar este estudio molecular, que se realiza por primera vez en nuestro país, radica en la identificación de individuos con riesgo nefrotóxico, permite el asesoramiento genético y la predicción de la progresión de la patología.

085. (410) DISTRIBUCIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPS) ASOCIADOS AL RIESGO DE ENFERMEDAD HEPÁTICA EN UNA POBLACIÓN MULTI-ÉTNICA Y MESTIZA

Pontoriero, Ana C¹; Trinks, Julieta¹; Hulaniuk, María Laura¹; Caputo, Mariela²; Fortuny, Lisandro³; Burgos Pratz, Leandro³; Frias, Analía⁴; Torres, Oscar⁴; Núñez, Félix⁵; Gadano, Adrián⁵; Argibay, Pablo¹; Corach, Daniel²; Flichman, Diego⁶
Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental¹ Servicio de Huellas Digitales Genéticas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² Servicio Hemoterapia, Hospital Italiano de Buenos Aires³ Servicio de Hemoterapia, Maternidad "Ramón Sardá"⁴ Servicio de Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires⁵ Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁶

Diversos SNPs en los genes PNPLA3 y VDR fueron asociados al riesgo de desarrollar hepatopatías tales como esteatosis, fibrosis y cirrosis. Si bien la prevalencia de los mismos difiere entre los grupos étnicos, existe escasa información sobre su frecuencia en poblaciones latinoamericanas caracterizadas por un alto grado de mestizaje. El objetivo de este estudio fue analizar la prevalencia de estos SNPs en la población sana de diferentes grupos étnicos de Argentina. Previa firma del consentimiento informado, se analizaron 372 muestras de ADN de voluntarios no relacionados entre sí y agrupados en argentinos (102), bolivianos (116), paraguayos (85) y peruanos (69). Los SNPs en PNPLA3 (rs738409) y VDR (rs1544410, rs7975332 y rs731236) fueron caracterizados mediante secuenciación nucleotídica. La composición étnica se determinó en 259 muestras mediante análisis de haplogrupos del ADNmt e Y-SNPs (linaje materno y paterno, respectivamente) por PCR en Tiempo Real, seguida de *melting* de alta resolución. Para el análisis estadístico se empleó el test exacto de Fisher. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. La frecuencia del genotipo GG del SNP rs738409 (PNPLA3) y del haplotipo CCCAA del gen VDR -relacionados con un mayor riesgo de desarrollo de hepatopatías- fue significativamente mayor en muestras con ancestralidad materna y paterna nativa americana (63,7% y 64,6%), intermedia en voluntarios mestizos (45,1% y 44,9%; $p < 0,05$) y menor en muestras con ancestralidad no nativa americana (30,1% y 29,6%; $p < 0,05$). Los resultados indican que existiría un sesgo significativo en la distribución de los SNPs predictores de esteatosis, fibrosis y cirrosis, relacionado con la ancestralidad de la población. Estos hallazgos podrían ser útiles para el diseño de nuevas guías de manejo de pacientes y campañas de prevención dirigidas a poblaciones de alto riesgo, como aquellas donde prevalecen el mestizaje y los linajes nativos americanos.

086. (418) PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE. UN NUEVO CASO EN HETEROCIGOSIS COMPUESTA

Cerbino, Gabriela Nora¹; Melito, Viviana Alicia^{1,2}; Guolo, Marcelo Nestor¹; Battle, Alcira¹; Parera, Victoria Estela¹; Rossetti, María Victoria^{1,2}
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET¹ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es una porfiria hepática aguda producida por fallas en la porfobilinógeno deaminasa (PBGD), tercera enzima del camino biosintético del hemo. Los síntomas incluyen ataques neuroabdominales agudos. Se hereda en forma autosómica dominante con muy pocos casos en homo-

cigosis o doble heterocigosis. El objetivo fue ampliar el estudio genético de una familia procedente de Paraguay cuyos resultados bioquímicos no concordaban con los datos genéticos esperados. Bioquímicamente se determinaron precursores y porfirinas en orina y actividad de PBGD en sangre. A partir de sangre periférica se extrajo el ADN genómico y el gen que codifica para la PBGD se amplificó y secuenció automáticamente. La madre sintomática había sido analizada previamente y era portadora de la mutación (c.772-1 G>A). Se analizaron 3 de las hijas encontrándose que 2 de ellas eran PAI sintomática (PAI-S) y la tercera PAI latente (PAI-L). El estudio molecular reveló que las dos primeras portaban 2 mutaciones: la materna y una segunda mutación *missense* en el exón 15 (p.R321H; c.962G>A). La hermana con PAI-L portaba sólo la segunda mutación encontrada en el padre asintomático. Están descritos sólo 6 casos de PAI en homocigosis o doble heterocigosis de los cuales 5 corresponden a casos infantiles con una actividad enzimática reducida en un 90% y severo cuadro neurológico. En 4 de ellos la mutación comprometía argininas del sitio activo. En los nuevos casos diagnosticados en esta familia la actividad está reducida en un 50-60%, presentan un cuadro clínico leve y se manifestó en la edad adulta. Si bien en PAI no se ha encontrado una relación fenotipo/genotipo, las características de estas pacientes doble heterocigotas podrían estar relacionadas con un menor efecto de las mutaciones halladas sobre la actividad y/o expresión de la enzima deficiente.

087. (439) ANÁLISIS DE RECEPTORES B ESTEREOTIPADOS EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA
Stanganelli, Carmen Graciela^{1,2}; Bezares, Fernando³; Slavutsky, Irma^{1,4}

*Academia Nacional de Medicina*¹ *Instituto de Investigaciones Hematológicas (IHHEMA)*² *Hospital Álvarez*³ *Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET*⁴

Los receptores B (BCR) altamente homólogos, denominados estereotipados (BCRE), están presentes en una fracción de pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC), encontrándose agrupados en un sistema de clusters por similitud de la región HCDR3 (heavy chain complementary-determining region 3). En este trabajo, evaluamos el estado mutacional de *IGHV* (immunoglobulin heavy chain variable region) y la presencia de BCRE en 109 pacientes con LLC (73 varones; edad media: 65 años; 87% en estadios iniciales). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Se efectuó PCR con posterior secuenciación y análisis utilizando las bases de datos IMGT/V-QUEST, IgBlast y ClustalX. Se consideraron como no mutadas (NM) las secuencias con una homología $\geq 98\%$ y mutadas (M) aquellas con $< 98\%$ respecto de la línea germinal. El 59,8% de los casos presentaron *IGHV* M y el 40,2% NM. La distribución por familias mostró mayor frecuencia de VH3 (49%), VH4 (23%) y VH1 (20%), siendo los genes más involucrados: *IGHV1-69* (8,9%), *IGHV3-23* (11,6%), *IGHV3-48*, *IGHV3-21* e *IGHV2-5* (5,4% cada uno). Once pacientes (10%) mostraron BCRE, 7 NM, 5 (71%) con 100% de homología. El 54,5% (6 casos) de los BCRE pertenecían a la familia VH3, involucrando los genes: *IGHV3-21* (BCRE cluster#2; 3 casos), asociado a enfermedad agresiva, *IGHV3-30* (clusters#N6 y #7; 2 casos) e *IGHV3-48* (cluster#20; 1 caso). El 36,4% (4) correspondieron a la familia VH1: *IGHV1-69* (clusters#7; 2 casos), e *IGHV1-3* (cluster#1 y #27, 2 casos), y 1 paciente (9%) a la familia VH4: *IGHV4-34* (cluster #4), relacionado a enfermedad indolente. El porcentaje de BCRE varía entre 10 y 32% en otras cohortes publicadas, siendo nuestra frecuencia concordante con lo observado en las series de Escandinavia y Uruguay. La identificación de BCRE es de importancia clínica dado el valor pronóstico de algunos clusters, constituyendo una fuerte evidencia de la participación del reconocimiento antigénico en el desarrollo y expansión del clon leucémico.

088. (441) VISUALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS UTILIZANDO BIBLIOTECAS DE ADN MARCADAS

Asensio, Cristian Jorge Alejandro; Massip Copiz, María M.; Clauzure, Mariángeles; Valdivieso, Angel G.; Santa Coloma, Tomás A

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-CONICET-UCA

Los proteomas eucariotas son diversos en secuencias y estructuras proteicas. La unión de ADN de cadena simple a proteínas podría servir como otro método para detectarlas sobre membranas de nitrocelulosa. Utilizando una biblioteca de ADN biotinilado de secuencia al azar, exploramos si la interacción ADN-proteína sirve como técnica de marcación de proteínas celulares separadas en geles y electrotransferidas a nitrocelulosa. Evaluamos los alcances de la técnica estudiando diversas variables experimentales: 1) la longitud y diversidad de las secuencias de ADN (secuencias aleatorias o únicas); la estructura (cadena simple o doble) y el plegamiento del ADN; la intensidad de marcación con biotina. 2) el tipo de lisado (órganos o líneas celulares) y su abundancia y diversidad en proteínas. 3) la intensidad de la interacción ADN-proteínas, la influencia del buffer de unión/lavados (pH, sales, etc.) y la competencia con ADN no marcado. 4) la compatibilidad con el rojo ponceau, los western blots y con la ECL efectuados sobre la misma membrana de nitrocelulosa. Los resultados indican: a) en lisados hay numerosas proteínas que unen ADN y algunas sirven como normalizadoras de carga para comparar distintas calles; b) los patrones no coinciden completamente con el obtenido con rojo ponceau y algunas proteínas pueden ser detectadas con mayor sensibilidad que este; c) los patrones proteicos difieren parcialmente entre distintos órganos o líneas celulares lo que implica un posible uso de la técnica en la visualización diferencial de proteomas. Además, hemos explorado si una biblioteca de ADN con secuencias aleatorias puede comenzar a ser seleccionada (aumentando la especificidad) contra alguna banda proteica efectuando rondas sucesivas como en una selección tradicional de aptámeros de ADN. Agradecimientos: Subsidios: CONICET PIP 2012-2014-0685; ANPCYT PICT 2012-1278; UCA. Becas: CONICET (MMMC) y UCA (MC).

089. (460) POTENCIAL MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DEL SUBGENOTIPO F DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B (HBV) BASADO EN LA IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE AMINOÁCIDOS

Cánepa, Camila¹; Berini, Carolina¹; Salido, Jimena¹; Paccini, Gabriela¹; Ruggieri, Matías¹; Mathet, Verónica²; Biglione, Mirna M¹; Delfino, Cecilia María^{1,2}

*Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS)- CONICET-UBA*¹ *Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET-UBA*²

Antecedentes: el HBV se divide en 9 genotipos (A-H,J) y múltiples subgenotipos (SGs) con diferente distribución mundial. En base a secuencias de genoma completo (GC) se estableció que la divergencia entre genotipos es del 8%, 4% entre SG y $< 4\%$ para clados. El genotipo F circula mayoritariamente en poblaciones del continente americano, clasificándose en SGs (F1-F4) y clados (F1a/b, F2a/b). Objetivo: evaluar a partir de secuencias de GC de los SGs F publicadas en GenBank la clasificación filogenética postulada y analizar si es posible identificar dichos SGs a partir de polimorfismos aminoacídicos (aac). Metodología: se analizaron 133 GC (GenBank) alineadas con CLUSTALX v1.83. Se construyó un árbol filogenético y se calcularon divergencias inter e intra-SG ($\% \pm SD$; Mega 5). Las secuencias genómicas fueron traducidas a secuencias proteicas según los marcos abiertos de lectura correspondientes (Bioedit 7.1). Para validar la herramienta se utilizaron 5 secuencias de cada SG elegidas al azar. Resultados: se confirmaron los 4 SGs definidos, con divergencias inter-SG entre $4,2 \pm 0,3\%$ y $5,7 \pm 0,4\%$ e intra-SG $< 1,8 \pm 0,1\%$. Se observó que las secuencias agrupadas en clados correspondían a una misma población/región. Se detectaron nuevos polimorfismos propios de cada SG en las proteínas Pres-1/Pre-S2/S, X y Polimerasa; se determinó que 5 posiciones específicas de una región de la polimerasa (aac 186 del dominio espaciador -aac 267 del rt) permiten la clasificación de secuencias en SGs con 100% de eficiencia, sin

necesidad de construir un árbol filogenético. Conclusiones: en base a este estudio proponemos reevaluar la utilidad de clasificar los SGs en clados y, de ser tenidos en cuenta, determinar una definición más precisa para su clasificación. Se identificaron nuevos polimorfismos específicos de cada SG del genotipo F en base a los cuales se estableció una herramienta rápida y eficiente que permite clasificarlos; ésta podría ser aplicable a otros genotipos del HBV u otros virus.

NEUROCIENCIAS 1

090. (10) EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA EXPRESIÓN TEMPORAL DE LOS NEUROPEPTIDOS GALANINA Y TIROSINA Y SUS RECEPTORES EN LA MÉDULA ESPINAL DORSAL DE ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO

Coronel, María F.^{1,2}; Villar, Marcelo J²; Brumovsky, Pablo R²; González, Susana L.^{1,3}
Instituto de Biología y Medicina Experimental (INBIOMED)-CONICET¹ Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral² Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³

Los pacientes con lesiones espinales desarrollan dolor neuropático refractario a los tratamientos disponibles. Nuestros estudios previos indican que el tratamiento con progesterona (PG) post-lesión espinal, previene la producción de citoquinas proinflamatorias y el desarrollo de dolor crónico. Estos mediadores inflamatorios pueden modular a su vez la expresión de neuropéptidos involucrados en el procesamiento nociceptivo a nivel espinal. En este trabajo analizamos, mediante RT-PCR en tiempo real, la expresión temporal de los neuropéptidos galanina (Gal) y tirosina (NPY) y sus receptores (GalR1, GalR2 e Y1) en la médula espinal lesionada, y su modulación por PG. Ratas macho Sprague-Dawley controles (C) o con hemisección espinal recibieron inyecciones diarias de PG (Hx+PG; 16 mg/kg, sc) o vehículo (Hx). La conducta neuropática (alodinia mecánica y térmica) se evaluó con los tests de von Frey y Choi. En el período agudo post lesión se observó un incremento en los niveles del ARNm de Y1 ($p < 0,05$ vs C) y una disminución en la expresión de GalR2 ($p < 0,05$ vs C). El tratamiento con PG previno el aumento de Y1 y causó una disminución en la expresión de GalR1 ($p > 0,05$ vs C, $p < 0,05$ vs Hx en ambos casos). En el período crónico, el grupo Hx presentó alodinia mecánica y térmica, mayores niveles de ARNm de Gal, GalR1, NPY e Y1 ($p < 0,05$ vs C en todos los casos) y una menor expresión de GalR2 ($p < 0,05$ vs C). La administración crónica de PG previno tanto el aumento en la expresión de neuropéptidos y sus receptores asociados ($p > 0,05$ vs C, $p < 0,05$ vs Hx en todos los casos) como el desarrollo de alodinia. Los resultados demuestran que la lesión medular causa cambios significativos en la expresión de Gal, NPY y sus receptores a nivel espinal. La PG, modulando la reacción inflamatoria desencadenada por la injuria, podría prevenir la activación de mecanismos espinales mediados por neuropéptidos, ofreciendo una promisoría alternativa terapéutica para el tratamiento del dolor crónico post injuria espinal (PIP-CONICET 576).

091. (11) EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD 1 DEL RECEPTOR NMDA (NR1) EN EL ASTA DORSAL DE ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO: POSIBLE PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MEF2C

Raggio, María Celeste¹; Coronel, María Florencia¹; Labombarda, Florencia^{1,2}; González, Susana Laura^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental (INBIOMED)-CONICET¹ Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²

El dolor neuropático es una consecuencia devastadora de la lesión medular y resulta refractario a los tratamientos disponibles. La expresión aumentada de la subunidad 1 del receptor NMDA (NR1) y su posterior fosforilación mediada por la proteína quinasas C gamma (PKC γ) genera hiperexcitabilidad de las neuronas del

asta dorsal de la médula espinal, un proceso clave en el desarrollo de dolor crónico. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que incrementan dicha expresión. En este trabajo empleamos ratas macho Sprague-Dawley controles (C) o con hemisección espinal (HX) para evaluar, por medio de RT-PCR en tiempo real, los niveles de expresión espinal de ARNm de NR1, PKC γ , de los factores de transcripción neuronales MEF2C y Sp1, que controlan la expresión de NR1, y de HDAC5, una histona deacetilasa clase II que reprime la actividad de MEF2C. La conducta neuropática (alodinia) se evaluó periódicamente utilizando los tests de von Frey (alodinia mecánica) y Choi (alodinia térmica). Los animales C y HX se sacrificaron a los 28 días, un período que coincide con el establecimiento de conductas neuropáticas en los animales lesionados. En los animales HX se observó una disminución del 50% en la expresión de HDAC5 ($p < 0,05$ vs. C), que coincidió con el aumento significativo en los niveles de ARNm de MEF2C ($p < 0,05$), NR1 ($p < 0,001$) y PKC γ ($p < 0,05$), sin observarse cambios en la expresión del factor Sp1. Dado que MEF2C es capaz de regular su propia expresión, nuestros resultados sugieren que el incremento en el ARNm de dicho factor en la médula dorsal de animales con dolor neuropático estaría mediado por una disminución en la represión ejercida por HDAC5. En esas condiciones, MEF2C, en cooperación con Sp1, podría inducir la expresión de la subunidad NR1 en el asta dorsal de la médula espinal, representando un potencial blanco terapéutico para el tratamiento del dolor crónico. (PIP CONICET 576).

092. (28) EFECTOS DEL 17 β -ESTRADIOL EN LA MORFOLOGÍA DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA1 DE LAS RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR) NORMOGLUCÉMICAS Y DIABÉTICAS

Brocca, María Elvira¹; Pietranera, Luciana^{1,2}; Roig, Paulina¹; Lima, Analía¹; De Nicola, Alejandro Federico^{1,2}
Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²

Previamente demostramos una reducción significativa en la longitud dendrítica apical y en la densidad de espinas de las neuronas de la región CA1 del hipocampo de las ratas SHR, y esta alteración podía prevenirse bajo tratamiento con 17 β -estradiol (E2). Debido que la diabetes e hipertensión son consideradas enfermedades comórbidas, nos propusimos estudiar el efecto de la inducción de diabetes por estreptozotocina (STZ) en la longitud dendrítica (LD) y en el número de espinas de las neuronas CA1 hipocámpales de ratas SHR tratadas o no con E2. Para esto inyectamos STZ (40 mg/kg) o vehículo, en forma iv en ratas machos SHR de 5 meses y las sacrificamos al mes de la inyección. Dos semanas previas al sacrificio, implantamos un único pellet de benzoato de E2 o colesterol a un grupo de ratas SHR normo e hiperglucémicas. Para estudiar la morfología neuronal utilizamos una versión modificada de la técnica de Golgi y posterior análisis de Sholl. Los resultados mostraron en las SHR diabéticas una reducción en la presión arterial ($p < 0,001$, vs. SHR), un aumento en la LD apical y basal de las neuronas CA1 ($p < 0,01$ en ambos casos, vs. SHR), y una disminución en la densidad de espinas ($p < 0,05$ en ambos casos, vs. SHR). El tratamiento con E2 aumentó la LD apical tanto en las ratas SHR normo ($p < 0,05$ vs. SHR) como hiperglucémicas ($p < 0,01$ vs. SHR+STZ) e incrementó la densidad de espinas basales y apicales de las neuronas CA1 ($p < 0,001$, en ambos casos). Además el E2 produjo una reducción adicional de la tensión arterial en las ratas SHR diabéticas ($p < 0,001$ vs. SHR). Estos datos sugieren que, 1) el aumento en la longitud del árbol dendrítico de las SHR diabéticas podría compensar la pérdida de las espinas dendríticas. 2) Los cambios morfológicos de las neuronas de las SHR debidos al tratamiento con E2 persisten luego de la inducción de la diabetes. 3) Una disminución de la presión arterial también podría contribuir a los efectos centrales del E2 en las ratas SHR diabéticas.

093. (44) EFECTOS EPIGENÉTICOS DIFERENCIALES DEL NZTE ADMINISTRADO ANTES O DESPUÉS DE LA FE-

CUNDACIÓN DE RATAS-MADRE EN LA EXPRESIÓN DE LAS CONDUCTAS DE SUPERVIVENCIA E INTERACCIÓN SOCIAL DE SUS HIJOS EN EL PERÍODO PREPUBERAL

Ratti, Silvia G.; Gaglio, Eliana; Álvarez, Edgardo O.
Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental

Anteriormente se han presentado evidencias que ZnTe administrado crónicamente en dosis bajas a ratas madre, modifica la exploración lateralizada y las interacciones sociales de sus hijos en la etapa prepupal. Estos cambios estuvieron acoplados a la modificación de los patrones de metilación del ADN hipocámpal sin cambios en la corteza prefrontal. El objetivo del presente trabajo fue comparar si la administración del ZnTe antes o después de la fecundación podía alterar las conductas de supervivencia y de interacción social de la descendencia. Para ello, se trabajó con ratas prepupales provenientes de: (1) ratas-madre sin tratamiento (Control, n=20); (2) ratas madres expuestas a 0,3 µg/L de ZnTe disueltos en el agua de beber después de la fecundación durante la preñez, lactancia y período prepupal de las crías (PostF, n=12) y (3) ratas madre expuestas a 0,3 µg/L de ZnTe antes del apareamiento (Pre F, n=19). Al día 30, los hijos de los tres grupos se sometieron a la Prueba de Natación Forzada (NF, 3 min) y a la Prueba de Interacción Social Intruso-Residente (IS, 5 min). Los resultados mostraron que los animales controles nadaron 226 ± 9 C/3min que representó el 62,5 \pm 3,3% del tiempo total. El grupo PostF nadó 178 ± 9 C/3min con un 48,6 \pm 2,4%, significativamente distinto de Control ($p < 0,01$) y el grupo PreF nadó 271 ± 7 C/3min, con un 75 \pm 2%, no diferenciándose de Control. En la Prueba de IS, los animales controles tardaron 13 ± 3 C/3min en enfrentar al animal intruso. Los animales del grupo PostF tardaron 74 ± 34 C/3min para la misma conducta, siendo la diferencia significativa ($p < 0,05$). En cambio, los animales del grupo PreF presentaron una latencia de $8,5 \pm 3$ C/min, no diferenciándose del control. En conclusión: los resultados respaldan la idea que los elementos traza afectan diferencialmente los procesos epigenéticos que regulan las conductas de supervivencia e interacción social en la rata.

094. (69) CAMBIOS TEMPORALES EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSLOCADORA TSPO Y DE ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICAS EN LA MÉDULA ESPINAL DE ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA

Sánchez Granel, María Luz¹; Coronel, María Florencia¹; Labombarda, Florencia^{1,2}; González, Susana Laura^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²

El dolor neuropático que surge luego de lesiones del sistema nervioso resulta refractario a los tratamientos disponibles. Previamente demostramos que progesterona (PG), un esteroide neuroactivo, podía representar una opción para prevenir el desarrollo de dolor neuropático luego de una lesión espinal. En este trabajo estudiamos los cambios temporales en la expresión de la proteína translocadora de 18kDa (TSPO) y de las enzimas esteroideogénicas 5α-reductasas (5αRed) I y II, moléculas clave en los procesos de dolor a nivel espinal, y su posible modulación por PG en un modelo experimental de dolor crónico. Ratas macho Sprague-Dawley controles (C) o con hemisección espinal se inyectaron 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) y los niveles de ARNm de TSPO y 5αRed I y II se determinaron por RT-PCR en tiempo real. En los animales HX se observó un aumento temprano en la expresión de TSPO ($p < 0,05$ vs C a 1d y 14d) y de 5αRedII ($p < 0,05$ vs C a 1d; $p < 0,01$ vs C a 14d), mientras que en la fase crónica, y coincidiendo con la conducta alodínica (28d), se observó una disminución significativa en la expresión de 5αRedI ($p < 0,01$ vs C) y 5αRedII ($p < 0,05$ vs C). A 28d, el grupo HX+PG mostró un marcado aumento en los niveles de ARNm de TSPO ($p < 0,001$ vs HX y C), 5αRedI ($p < 0,01$ vs HX) y 5αRedII ($p < 0,001$ vs HX y C). De acuerdo con datos previos, los animales HX+PG no desarrolla-

ron alodinia. Nuestros resultados sugieren que en la etapa aguda post lesión, el incremento en la expresión de TSPO y la 5αRedII podría representar una respuesta protectora del tejido frente a la injuria, que no se mantiene en la fase alodínica. La PG favorecería la expresión de TSPO y la producción de metabolitos reducidos, posibles responsables de los efectos antialodínicos observados en la fase crónica de la lesión espinal (PIP CONICET 576).

095. (87) COMPARACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE ZNTE A RATAS-MADRE DURANTE LA PREÑEZ O LACTANCIA EN LA EXPRESIÓN DE CONDUCTAS EXPLORATORIAS LATERALIZADAS E INTERACCIÓN SOCIAL DE SUS HIJOS EN EL PERÍODO PREPUBERAL

Ratti, Silvia G.; Gaglio, Eliana; Álvarez, Edgardo O.
Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental

Evidencias previas de nuestro laboratorio han mostrado que ZnTe en dosis no tóxicas administrado crónicamente durante la preñez y lactancia en la madre y después del destete, en las crías (exposición crónica; EC), modifica la exploración lateralizada y las interacciones sociales en la etapa prepupal. El objetivo del presente trabajo fue comparar si la administración de los elementos traza en etapas críticas como la preñez (P) o lactancia (L) podía alterar la exploración motivada lateralizada y la interacción social de la descendencia. Para ello, se trabajó con ratas prepupales provenientes de: (1) ratas-madre sin tratamiento alguno (Control, n=11); (2) ratas madres expuestas a 0,3 µg/L (1,55 nM) de ZnTe disueltos en el agua de beber durante todo el período (EC, n=8); (3) ratas madre expuestas a 0,3 µg/L de ZnTe en la preñez (P, n=20) y (4) ratas madre expuestas a 0,3 µg/L de ZnTe en la lactancia (L, n=18). Al día 30, los hijos de los cuatro grupos se testaron en el Laberinto Doble Hole-Board Lateral (LDHB) que mide la exploración preferencial izquierda/derecha (Izq/Der) en Cuentas/3 min (C/3min) y a la Prueba de Interacción Social Intruso-Residente (IS) durante 5 min. Los resultados en LDHB confirmaron que las ratas controles tienen exploración preferencial izquierda (71 ± 8 C/3min, Izq, Versus 41 ± 4 C/3 min, Der, $p < 0,01$). En cambio, tanto en el Grupo EC como P y L la lateralidad exploratoria fue anulada. En la Prueba IS, los animales controles tardaron 13 ± 2 C/3min en enfrentar al intruso. Los animales del Grupo EC tardaron $42,5 \pm 26$ C/3min para la misma conducta ($p < 0,05$ Versus Control) mientras que los animales del Grupo P y L no se diferenciaron del Control. En conclusión: los resultados sugieren que tanto la duración como el momento de la administración de los elementos traza afectan diferencialmente la expresión conductual en la rata.

096. (102) ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA CO-ACTIVACIÓN DE DOS RECEPTORES NEUROPEPTIDÉRGICOS ASOCIADOS A FUNCIONES ANALGÉSICAS A NIVEL ESPINAL EN RATAS CON DOLOR NEUROPÁTICO

Malet, Mariana¹; Gastón, Guillermo Ariel¹; Policastro, Lucía²; Brumovsky, Pablo R.¹
Universidad Austral¹ Comisión Nacional de Energía Atómica²

Los neuropéptidos galanina (Gal) y tirosina (NPY) poseen una acción antinociceptiva probada en roedores con dolor neuropático. Tal acción depende de la activación ya sea del receptor de tipo 1 de Gal (GalR1) o NPY (Y1R). Sin embargo, el efecto de la activación conjunta de ambos receptores aún no ha sido evaluado. Nuestro objetivo es analizar el efecto antinociceptivo resultante de la co-administración intratecal de agonistas GalR1 (M617) e Y1R (Leu³¹, Pro³⁴-NPY). Postulamos que, en ratas con dolor neuropático, la activación de ambos receptores a nivel espinal usando 50% de la concentración máxima de cada agonista resultará en un efecto, al menos comparable, a aquel obtenido cuando los agonistas son administrados por separado y en su máxima concentración. Usando Sprague-Dawley se indujo neuropatía mediante compresión del nervio ciático (modelo de Bennett). Se incluyeron también animales control. Los agonistas fueron infundidos en bolo por vía intratecal mediante un catéter permanente. Se infundieron 10µg/10µl de M617 o Leu³¹, Pro³⁴-NPY, mientras

que la dosis combinada contó con 5µg/10µl de cada agonista. Se evaluó la acción antinociceptiva frente a estímulos mecánicos utilizando el método de Von Frey. En animales lesionados, la inyección de Leu³¹, Pro³⁴-NPY aumentó el umbral mecánico a niveles comparables al grupo control (sin dolor), mostrando un pico a los 45 minutos de inyección. Por el contrario, M617 resultó en un aumento más moderado del umbral, sin alcanzar los niveles basales observados en animales control. La co-administración de Leu³¹, Pro³⁴-NPY y M617 al 50% de sus concentraciones máximas resultó en un aumento del umbral comparable al observado con Leu³¹, Pro³⁴-NPY (pico a los 60 minutos). En conclusión, estos resultados preliminares sugieren que la administración conjunta de ambos agonistas, inclusive a dosis menores que las necesarias para su acción efectiva, resulta en un efecto analgésico eficiente en animales con dolor neuropático.

097. (123) INMUNOREACTIVIDAD PARA CALBINDINA EN EL GIRO DENTADO (GD) DE PACIENTES CON EPILEPSIA TEMPORAL (ELT) Y ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO (EH) TRATADOS QUIRÚRGICAMENTE

D'aleccio, Luciana¹; Konopka, Hector²; Acuña, Andrés¹; Escobar, Erica⁴; Seoane, Eduardo³; Kochen Silvia¹
Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN)-CONICET¹ Centro de Epilepsia, Servicio de Neurología, Hospital Ramos Mejía.² Servicio de Neurocirugía, Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía³ Servicio de Patología, Hospital Neuropsiquiátrico B. A. Moyano⁴

Introducción: Las alteraciones en la neuroplasticidad hipocampal han surgido como marcador histopatológico de la EH con posibles implicancias clínicas y conductuales (depresión). Se ha encontrado una disminución de la neuroplasticidad y de la neurogénesis hipocampal (NGH) en modelos crónicos de epilepsia que difieren de los modelos agudos experimentales. Métodos: El objetivo de este estudio preliminar, fue determinar la inmunorreactividad para calbindina (CB), (proteína que se expresa en células postmitóticas y marca el inicio de la sinaptogénesis), en el GD de pacientes con EH y ELT asociada o no a depresión. Secciones de hipocampos obtenidos de 10 pacientes con ELT resistente y EH operados, fueron procesadas mediante inmunoperoxidasa para CB. Se realizó una evaluación psiquiátrica prequirúrgica mediante la SCID I y II del DSM IV. Cinco controles post mortem fueron procesados simultáneamente. Se determinó la inmunorreactividad para calbindina (CB) en el giro dentado (GD) del hipocampo, el área reactiva, el valor medio de grises (VMG) y el recuento celular por campo mediante el análisis de imagen computarizado (Image J). Se utilizó el Test de Student como prueba estadística. Resultados: Se incluyeron pacientes con ELT sin depresión (n=7), pacientes con ELT y depresión (ELT+D) (n=3), y controles post-mortem normales (n=5). Se encontraron células granulares CB positivas en los GD de los pacientes y de los controles. En los ELT se encontró una disminución significativa del número total de CB en GD y un aumento del área reactiva y de la intensidad (p<0,01) respecto al control. En pacientes con ELT+D el número total de CB en GD fue significativamente menor en relación a los pacientes con ELT y a los controles (p<0,01). El VMG fue mayor en comparación a los otros grupos (p<0,01). Conclusión: Estos hallazgos podrían indicar una alteración en la etapa de sinaptogénesis en el proceso de NGH. Este hallazgo se vería intensificado en los pacientes que además presentan comorbilidad con depresión.

098. (133) ROL PROTECTOR DEL ÁCIDO LIPOICO EN EL GLAUCOMA EXPERIMENTAL

Reides, Claudia G.; Lasagni Vitar, Romina M.; Lerner, Fabián; Ferreira, Sandra M.; Llesuy, Susana F.
Cátedra de Química General e Inorgánica, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET-UBA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

El objetivo del trabajo fue evaluar el rol protector del ácido lipico (AL) frente al daño oxidativo en estructuras visuales priMarías del cerebro en un modelo de glaucoma experimental. Se trabajó

con 4 grupos de ratas Wistar (3 meses): grupo glaucoma (G), grupo glaucoma tratado con AL 50 mg/kg de peso (GT), grupo control (C) y grupo control tratado con AL (CT). A los 7 días de la cirugía se determinaron en homogeneizados de corteza visual izquierda (CVI), derecha (CVD) y núcleo geniculado (NG) los siguientes parámetros: lipoperoxidación (TBARS), capacidad antioxidante total (TRAP), las actividades de tioredoxina reductasa (TR) y glutatión peroxidasa (GPx). Los resultados en el glaucoma con respecto al control fueron: TBARS aumentaron 41% en CVI (p<0,05), 53% en CVD (p<0,05) y 61% en NG (p<0,01); (Control (pmol/mg proteína): CVI 2,57±0,34, CVD 2,74±0,28, NG 1,48±0,21); TRAP disminuyó 41% en CVI (p<0,01), 38% en CVD (p< 0,05) y 67% en NG (p<0,01); (Control (nmol/mg proteína): CVI 2,20±0,07, CVD 2,28±0,08, NG 9,5±0,5); TR disminuyó 37% en CVI (p<0,05), 31% en CVD (p<0,05) y 46% en NG (p<0,01);(Control (nmol/min.mg proteína): CVI 12±0,8, CVD 13±0,5, NG 14±0,5); GPx aumentó 24% en CVI (p<0,05), 26% en CVD (p<0,05) y 79% en NG (p<0,01); (Control (nmol/min.mg proteína): CVI 7,1±0,4 p<0,05, CVD 7,9±0,5, NG 5,7±0,6). La peroxidación lipídica en GT es similar a la de los grupos C y CT. Este resultado sugiere que el daño a lípidos en CV y NG podría ser revertido por la administración de esta dosis de AL. La disminución del TRAP, el aumento de la actividad de GPx y la disminución de la actividad de TR en CVI, CVD y NG puede ser una respuesta al incremento del proceso oxidativo. La terapéutica del glaucoma podría contemplar el uso de AL como una posible estrategia para la neuroprotección, considerando que el daño glaucomatoso se extiende a nivel cerebral más allá de la retina y del nervio óptico.

099. (157) LA PROGESTERONA INHIBE LA GLIOSIS REACTIVA Y LA REACCIÓN INFLAMATORIA VÍA SU RECEPTOR NUCLEAR CLÁSICO EN LA MÉDULA ESPINAL LESIONADA

Labombarda, Florencia^{1,2}; Jure, Ignacio¹; González, Susana^{1,3}; De Nicola, Alejandro^{1,2}
Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Laboratorio de Nocicepción y Dolor Neuropático, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET³

La reacción inflamatoria y la gliosis reactiva (proliferación de astrocitos y células microgliales) son responsables del daño secundario y la desmielinización luego de una injuria espinal (SCI). Previamente hemos descripto que un tratamiento de tres días con progesterona (16 mg/kg/día) (PROG) luego de SCI disminuye la gliosis reactiva y aumenta el número de precursores de oligodendrocitos, mientras que un tratamiento crónico (21 días) diferencia dichos precursores en oligodendrocitos maduros y estimula la remielinización. Actualmente estudiamos el efecto de la PROG sobre la expresión de los ARNm de citoquinas (IL1b, TNFa y IL-6) y enzimas pro-inflamatorias (COX-2 e iNOS) en función del tiempo, mediante PCR en Tiempo Real. Los resultados mostraron que el pico máximo de los ARNm de los mediadores inflamatorios ocurrió 6 h post injuria con respecto a los controles (CTL) (p<0,01 SCI vs CTL, ANOVA). El tratamiento con PROG disminuyó la expresión de los ARNm de todas las citoquinas y enzimas pro inflamatorias medidas a lo largo del tiempo (p<0,01 SCI vs SCI+PROG, ANOVA). También determinamos por inmunohistoquímica el número de astrocitos (células GFAP +) y células microgliales (Ox-42 +) 6h post SCI. Luego de la SCI aumentó la gliosis reactiva (p<0,001 SCI vs CTL, ANOVA), la cual fue inhibida por el tratamiento con PROG (p<0,001 SCI vs SCI +PROG, ANOVA). Finalmente debido a que las acciones de la PROG involucran múltiples mecanismos, evaluamos el rol del receptor clásico (PR) en ratones PRKO luego de 6h de injuria. La PROG no inhibió el pico de expresión de los ARNm de las citoquinas y las enzimas pro-inflamatorias (p>0,05 SCI vs SCI+PROG, ANOVA), ni disminuyó la gliosis reactiva en los PRKO (p>0,05 SCI vs SCI+PROG, ANOVA). Estos datos demuestran que la PROG inhibe la reacción inflamatoria y la gliosis reactiva vía su PR. Este podría ser uno de los mecanismos por los cuales el esteroide favorece el proceso remielinización.

100. (160) LA PROGESTERONA AUMENTA LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN OLIG 2 EN LOS PRECURSORES DE OLIGODENDROCITOS LUEGO DE UNA LESIÓN MEDULAR

Jure, Ignacio¹; González, Susana^{1,3}; De Nicola, Alejandro^{1,2}; Labombarda, Florencia^{1,2}

Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Laboratorio de Nocicepción y Dolor Neuropático, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET³

Una de las consecuencias de las lesiones en la médula espinal (SCI) es la desmielinización, producida por la apoptosis de oligodendrocitos. 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. Además hemos descrito que la PROG aumenta el ARNm de Olig 2, factor clave en el proceso de diferenciación de los OPC a oligodendrocitos maduros. En este trabajo nos propusimos primeramente estudiar si el aumento del ARNm de Olig2 inducido por PROG se refleja en un aumento en el número de células que expresan Olig2. Mediante inmunohistoquímica describimos que luego de 3 días de lesión espinal no hubo cambios significativos en el número de células Olig 2 positivas con respecto a las ratas intactas (CTL) ($p > 0,05$ CTL vs SCI, ANOVA) tanto en el funículo ventral como lateral de la sustancia blanca de la región inmediatamente rostral a la injuria. Sin embargo, el tratamiento con PROG (16mg/kg/día) incrementó significativamente la densidad de células Olig 2 positivas en ambos funículos ($p < 0,05$ SCI vs SCI+PROG, ANOVA). En segundo lugar determinamos la identidad de la población celular que expresó Olig2. El resultado de la doble inmunofluorescencia con Olig2 y PDGFR alpha (marcador de OPC), mostró que luego de la lesión espinal aumentaron las células PDGFR alpha + /Olig2 - ($p < 0,05$, CTL vs SCI) y que el tratamiento con PROG incrementó el número de células PDGFR alpha + /Olig2 + ($p < 0,01$ SCI vs SCI+PROG). Estos datos nos permiten concluir que si bien la lesión aumentó el número de OPC, el tratamiento con el esteroide incrementó los OPC que expresan el factor que induce la diferenciación de los mismos (Olig2). Este podría ser uno de los posibles mecanismos por los cuales la PROG estimula la oligodendrogénesis en la médula espinal lesionada.

101. (163) INTERACCIÓN DE ANGIOTENSINA II Y OXITOCINA EN LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES INDUCIDAS POR EXPOSICIÓN REPETIDA A ANFETAMINA: ROL DE LOS RECEPTORES AT₁

Casarsa, Brenda S.¹; Marinzalda, María De Los Angeles¹; Marchese, Natalia A.²; Basmadjian, Martín²; Baiardi, Gustavo¹; Bregonzio, Claudia²

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT)-CONICET¹ Depto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC)-CONICET²

Ang II (intracerebroventricular -icv-) a través de receptores AT₁ (R-AT₁), estimula la liberación de oxitocina (OT). Es conocida la estrecha relación de Ang II y OT con la memoria y la ansiedad. Además, resultados de nuestro laboratorio mostraron un rol clave de Ang II en las respuestas neuroadaptativas inducidas por anfetamina (ANF). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de Ang II icv en animales expuestos a ANF sobre: memoria de trabajo, ansiedad y activación de neuronas oxitocinérgicas, 7 ó 21 días posteriores a ANF. Asimismo, evaluar el rol de los R-AT₁ en dichas respuestas. Se usaron ratas Wistar macho (250-320g), pretratadas con bloqueante de los R-AT₁-candesartan- (3mg/kg v.o)/vehículo por 10 días e inyectadas con ANF (2,5mg/kg i.p/

salina del día 5 al 10. El día 10 ó 26, se colocaron las cánulas icv. El día del experimento (18 ó 32), recibieron Ang II (400pmol icv.), 60 min después se realizaron los test: Hole Board (HB) o Plus Maze (PM) y los cerebros fueron procesados para la inmunomarcación de Fos-OT en los núcleos supraóptico y paraventricular e inmunomarcación de c-Fos en hipocampo. Resultados: Ang II produjo un deterioro en la memoria de trabajo en el test de HB, ANF previno este efecto y candesartan impidió el efecto de ANF. En el test de ansiedad, PM: Ang II indujo un efecto ansiogénico, ANF lo previno y candesartan no modificó el efecto de ANF en ningún caso. Se encontró un aumento en la activación neuronal inducida por ANF, que se previno con candesartan a los 21 días. Ang II incrementó el número de neuronas inmunoreactivas a Fos-OT y ANF potenció esta respuesta. Concluimos que la exposición repetida al psicoestimulante induce cambios neuroadaptativos a largo plazo sobre el sistema renina angiotensina cerebral, involucrados en la memoria de trabajo y la respuesta de ansiedad. Estos cambios son consecuencia de los efectos de ANF sobre R-AT₁, que median a su vez la activación oxitocinérgica inducida por Ang II icv.

102. (169) PARTICIPACIÓN DE SIRT6 EN LA FISIOPATOLOGÍA RETINIANA. MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA TIPO1 (GLUT-1)

Silberman, Dafne Magalí¹; Ross, Kenneth²; Sande, Pablo H¹; Tsubota, Shunsuke³; Apte, Rajesh³; Ramaswamy, Sridhar²; Mostoslavsky, Raul²

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET-UBA¹ Cancer Center, MGH, Harvard Medical School² Washington University, School of Medicine³

La retina de mamíferos es un tejido de gran actividad metabólica y uno de los que más energía consumen. El movimiento de glucosa a través de la barrera hematoencefálica ocurre por el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1). SIRT6, una desacetilasa de histonas, regula epigenéticamente la actividad de genes glucolíticos clave, como GLUT1. Dada la importancia de la regulación de la homeostasis de la glucosa en el desarrollo de enfermedades metabólicas y la falta de antecedentes que involucren a SIRT6 en la fisiopatología retiniana, el objetivo de este trabajo fue caracterizar SIRT6 en la retina de ratón y estudiar su participación en la regulación de GLUT1. Se analizaron los niveles de ARNm por RT-PCR y proteicos por Western blot en extractos de cromatina de retina de ratones C57B6 y se analizó su actividad determinando los niveles de acetilación de H3K9 y H3K56. Se observaron niveles detectables de SIRT6 a nivel del ARNm y a nivel proteico. Los niveles reducidos de acetilación de H3K56 y de H3K9 demostraron que la enzima es activa en el tejido. Se determinó la localización de SIRT6 por hibridación *in situ* y se observó su presencia en los núcleos de las células de todas las capas de la retina. Se estudió el efecto del bloqueo global de SIRT6 analizando los niveles proteicos, de ARNm y su actividad en animales KO para SIRT6. Las retinas de los animales KO no presentaron niveles detectables de ARNm ni de proteína y presentaron niveles significativamente mayores de acetilación de H3K56 y de H3K9 respecto de los WT ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente) lo que confirma que estas lisinas son sustrato específico de SIRT6 en la retina. Además, se observó una regulación positiva de GLUT1 por Western blot ($p < 0,01$), PCR ($p < 0,01$) e inmunofluorescencia en ratones KO. El estudio electrorretinográfico demostró que la función visual está afectada en estos animales sugiriendo que la disponibilidad de glucosa en la retina de ratones KO estaría alterada comprometiéndola función visual.

103. (173) PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO ER ALFA Y ER BETA EN LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES DEL ESTRADIOL SOBRE LA NEUROLOGÍA DE LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA (SHR)

Pietranera, Luciana¹; Brocca, M. Elvira²; Roig, Paulina²; De Nicola, Alejandro F.¹

Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina, Instituto de

Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET, Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²

En trabajos anteriores describimos en un modelo de hipertensión experimental, la rata SHR, cambios hipocámpales tales como disminución de la neurogénesis en el giro dentado (GD), astrogliosis y menor número de células en el hilio. Estos cambios revierten luego del tratamiento con b-estradiol durante dos semanas. Existen dos subtipos del receptor clásico de estradiol (ER): ERA y ERB. Poseen una distribución neuroanatómica distinta aunque pueden coexpresarse en las mismas células y formar heterodímeros. El objetivo del presente trabajo fue investigar los posibles mecanismos de las acciones neuroprotectoras del b-estradiol sobre la encefalopatía hipocámpal de la rata SHR. Para ello se trataron ratas macho SHR (PA: 180 mmHg) y WKY de 16 semanas de vida con agonistas específicos para los receptores ERA (PPT) y ERB (DPN) mediante inyecciones s.c de 2,5mg/kg día por medio durante 2 semanas. Los animales se sacrificaron y en sus cerebros se estudiaron: la neurogénesis en el GD medida por la expresión de doblecortina, la reactividad astrocitaria GFAP positiva y la expresión de aromatasa en el hipocampo. El tratamiento con DPN fue capaz de revertir la disminución de la neurogénesis en el GD en las ratas SHR ($p < 0,001$) y la astrogliosis en el área CA3 e hilio del hipocampo ($p < 0,01$). El tratamiento con PPT fue capaz de revertir la astrogliosis en el área CA1, CA3 e hilio del hipocampo ($p < 0,001$) y aumentar la expresión de aromatasa en el hilio del GD del hipocampo ($p < 0,01$). Los resultados muestran que ambos receptores están involucrados en los efectos neuroprotectores del estradiol en el hipocampo de las ratas SHR. La activación del ERB con DPN revierte la disminución en la neurogénesis y disminuye parcialmente la astrogliosis. Los efectos neuroprotectores del este compuesto podrían sentar las bases para una posible utilidad terapéutica, dada la distribución diferencial del ERB que evitaría los efectos no deseados de un tratamiento estrogénico (cancerígenos y feminizantes).

104. (174) EFECTOS DE UN AGONISTA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN LA ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL CRÓNICA

Garay, Laura Inés^{1,2}; González Deniselle, María Claudia^{1,3}; Sitruk-Ware, Regine⁴; Guennoun, Rachida⁵; Schumacher, Michael⁵; De Nicola, Alejandra F.^{1,2} Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³ Population Council y Rockefeller University, New York, USA.⁴ UMR 788 Inserm y University Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France⁵

Estudios anteriores demostraron protección por Progesterona en la encefalitis autoinmune experimental (EAE), modelo de esclerosis múltiple (EM). Además de la neuropatología de la médula espinal, los pacientes con EM también presentan anomalías hipocámpales. En este trabajo, se estudiaron los efectos terapéuticos en el hipocampo de ratones con EAE crónica de la progestina Nestorona (NES, 0,4 mg/kg x 10 días) que posee 70% mayor afinidad por el receptor de progesterona que la hormona natural. Se analizaron a los 60 días del inicio de EAE el número de neuroblastos DCX+ y células proliferantes Ki67+, células microgliales/macrófagos Iba1+, astrocitos GFAP+ e interneuronas GABA+. Clínicamente, se evaluó el score clínico y la destreza física mediante rotarod. Los resultados mostraron que el número de células DCX+y Ki67+ aumentó en EAE vs control ($p < 0,05$), y más aún en EAE+NES (EAE vs. EAE+NES: $p < 0,01$). El número de células Iba1+ aumentó 2,18 veces en EAE vs. control ($p < 0,05$), mientras que el tratamiento con NES atenuó en 30% la microglia ($p < 0,05$ vs. EAE). Además, el número de interneuronas GABA+ aumentó significativamente en ratones EAE+NES vs. EAE ($p < 0,05$). A nivel clínico, el tratamiento con NES mejoró el

score y la performance motora en el rotarod. Por lo tanto NES protegió frente a las anomalías hipocámpales halladas en los ratones con EAE crónica y mejoró aspectos clínicos y funcionales, sugiriendo su potencial valor para la EM.

105. (181) EFECTOS DEL EJERCICIO AERÓBICO Y EL ENVEJECIMIENTO SOBRE EL SISTEMA BDNF- SEROTONINA Y LA FUNCIÓN COGNITIVA EN RATAS

Pietrelli, Adriana¹; Matkovic, Laura³; Vaccotto, Marina²; Brusco, Alicia Herminia² Depto. de Investigación en Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales (UCES)¹ Laboratorio de Neuroprotección, Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis" (IBCN)-UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Laboratorio de Esteroides, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³

El ejercicio aeróbico (AE) beneficia la salud cerebral y la conducta. La Serotonina (5-HT) y el Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) son mediadores de las respuestas conductuales. BDNF está involucrado en la maduración, plasticidad estructural y función del sistema serotoninérgico.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos en el largo plazo del AE y la edad sobre el sistema BDNF- 5-HT y la función cognitiva en ratas. Se diseñó un programa de AE crónico con el treadmill. Dos grupos: entrenamiento aeróbico (AT), y controles sedentarios (SC) fueron estudiados en la mediana edad y la vejez (8 y 18 meses). Se determinaron los niveles de BDNF y 5-HT en la corteza frontal (FC), hipocampo (H) y rafe dorsal (DR) con un kit ELISA y del receptor 5-HT1A (5-HT1AR) y transportador (5-HTT), por Western Blotting. La función cognitiva fue evaluada con el Test de Reconocimiento de Objetos (ORT). AE aumentó ($p < 0,05$) BDNF en la CF e H de AT. La 5-HT fue mayor ($p < 0,05$) en el cerebro y DR de los AT viejos. 5-HT1AR and 5-HTT fueron afectados por el AE y la edad. El ORT mostró que AT tuvo mayor capacidad ($p < 0,05$) discriminativa de objetos nuevos y desplazados. El AE afectó positivamente al sistema BDNF-5-HT, mejoró la función cognitiva y es neuroprotector del envejecimiento.

106. (184) EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON FE SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO DEPENDIENTE DE CLORPROMAZINA EN CEREBRO DE RATA

Piloni, Natacha E.; Puntarulo, Susana Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET

Clorpromazina (CPZ) es un neuroléptico empleado para la esquizofrenia que involucra la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). El Fe es un elemento esencial, que actúa como catalizador de la generación de ROS. La administración subcrónica de Fe-dextrán genera aumento en el contenido cerebral de Fe, estrés oxidativo y activación de vías de defensa celular. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la sobrecarga subcrónica de Fe, sobre el daño oxidativo producido por CPZ. Ratas Sprague Dawley recibieron 6 dosis intraperitoneales (ip) de 50 mg/kg de Fe-dextrán (Fe) o solución salina (control), una cada 48 h. A las 8 h de la administración de la última dosis de Fe, ambos grupos recibieron una dosis ip de CPZ de 10 mg/kg de peso (Fe-CPZ y CPZ). El cerebro fue extraído a las 9, 10 y 12 h post-administración de Fe, y 1, 2 y 4 h post-administración de CPZ. La velocidad de generación de radicales lipídicos determinada por Espectrometría de Resonancia Paramagnética Electrónica, se incrementó en el cerebro tratado con CPZ a las 1 y 2 h (272 ± 27 y 285 ± 50 nmol/mg PF/30 min, respectivamente), con respecto al control (173 ± 4 nmol/mg PF/30 min). Los animales que recibieron el pretratamiento con Fe no mostraron diferencias con el control. La actividad de catalasa (CAT), determinada espectrofotométricamente no mostró diferencias entre las muestras que recibieron CPZ y el control ($0,0017 \pm 0,0050$ pmol/mg prot). Los animales pretratados con Fe, mostraron una actividad de $0,0035 \pm 0,0003$ y $0,0030 \pm 0,0001$ pmol/mg prot, respectivamente a las 2 y 4 h

de la administración de CPZ. La administración subcrónica de Fe desencadena efectos, en el medio lipofílico, que protegen al cerebro frente a la oxidación dependiente de CPZ. Se propone que el anión superóxido generado en presencia de CPZ participa en la producción de peróxido de hidrógeno y favorece el daño a membranas, y el aumento de la actividad de CAT generado por el tratamiento con Fe limita el deterioro oxidativo.

107. (200) EXPRESIÓN DE CALBINDINA EN INTERNEURONAS GABAÉRGICAS EN CORTEZA DE PACIENTES CON EPILEPSIA TEMPORAL (ELT), ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO (EH) Y PSICOSIS, QUE RECIBIERON TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.

Acuña, Andrés¹; Konopka, Héctor¹; Escobar, Erica¹; Seoane, Eduardo¹; Kochen, Silvia²; D'Alessio, Luciana¹

Instituto de Biología Celular y Neurociencias E De Robertis (IBCN)¹ Centro de Epilepsia, Hospital General de Agudos J. Ramos Mejía²

Introducción: La calbindina es una proteína ligadora de calcio presente en interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral. Se postula que cumplirían una función de buffer de Ca⁺ frente a la excitotoxicidad y se encuentra reducida en la esquizofrenia. El objetivo de este trabajo fue estudiar la inmunorreactividad para calbindina (CB) en la corteza temporal de pacientes con epilepsia con y sin psicosis (P) comórbida, operados. **Métodos:** Secciones histológicas de cortezas temporales de 14 pacientes con ELT resistente y EH fueron procesadas mediante inmunoperoxidasa para calbindina. Se realizó una evaluación psiquiátrica prequirúrgica mediante la SCID I y II del DSM IV. Cuatro controles post mortem fueron procesados simultáneamente. Se determinó la inmunorreactividad para calbindina en las capas II y III. Se determinó el área reactiva, el valor medio de grises (VMG) y el recuento celular por campo mediante análisis de imagen computarizado (imagen J). Se utilizó el Test de Student como prueba estadística. **Resultados:** Se estudiaron secciones de cortezas temporales de pacientes con ELT (n=7), pacientes con (ELT + P, n=3) y controles postmortem normales (n=4). Se encontraron células CB positivas en la corteza temporal en todos los casos. En los ELT se encontró un aumento significativo del número total de CB positivas por campo y un aumento del área reactiva y de la intensidad (p<0,01) respecto al control. En pacientes con ELT+P se observó una disminución del número total de CB por campo en relación a los pacientes con ELT y a los controles (p<0,01). El VMG fue mayor que los controles (p<0,01) y similar que los ELT. **Conclusiones:** Similar a lo descrito en la esquizofrenia los pacientes con ELT+P presentaron una disminución de la CB que podría indicar un compromiso de la neurotransmisión gabaérgica. El hallazgo de una mayor inmunorreactividad en la epilepsia se podría explicar como una respuesta adaptativa frente las descargas epilépticas dada la acción buffer de la calbindina frente a la excitotoxicidad.

108. (212) LÓBULO PREFRONTAL: ASIMETRÍA Y LATERALIDAD EN IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA DE AMBOS SEXOS

Merlo, Alicia B; Albanese, Alfonso M; Miño, Jorge H.; Gómez, Elena E; Morgada, Victoria; Albanese, Eduardo F. *Facultad de Medicina, Universidad del Salvador*

En SAIC 2013 mostramos que en ambos sexos superficies del lóbulo prefrontal (LPF) en imágenes parasagitales de resonancia magnética (IPRM) disminuyen con el avance de la edad. **Objetivo:** Obtener en ambos sexos valores de asimetría y lateralidad de superficies del LPF y la posible influencia de la edad. **Materiales y Métodos:** Superficies de IPRM del LPF equidistantes del plano sagital medio de 64 sujetos femeninos y 65 masculinos de 21 a 84 años sin enfermedades psiquiátricas ni neurológicas se midieron por el programa Scion Image for Windows y se calculó la lateralidad (LAT). LAT= (valor derecho -valor izquierdo) x 100 / (valor derecho+valor izquierdo). EL signo resulta negativo si LAT es izquierda y positivo si es derecha; Asimetría (AS) es el valor absoluto de LAT. Por sexo se calculó la mediana de AS. Se agruparon por sexo los datos inferiores a su mediana y los

iguales o superiores y se determinó en cada grupo la media ± es de AS con LAT izquierda y derecha y de sus correspondientes edades. **Resultados:** La mediana de los valores de AS es 4.83% para el grupo femenino y 4.48% para el masculino. En cada sexo los valores de AS a LAT izquierda y derecha debajo de sus medianas no difieren significativamente (ANOVA). Los iguales a la mediana o más son para LAT izquierda y derecha en el grupo femenino 8,07% ± 0,13 y 11,95% ± 0,10 (p<0,01 ANOVA) y en el masculino 12,75% ± 0,20 y 10,15 ± 0,09% (p<0,01 ANOVA). Las edades de grupos no difieren significativamente. No correlacionan AS y edad. **Conclusión:** La LAT de la superficie prefrontal medida en imágenes de resonancia magnética cuyos valores de AS son iguales o superiores a la mediana muestran diferencias de sexo, relacionadas a la LAT. En el grupo femenino la diferencia es estadísticamente significativa a favor de LAT derecha y en el grupo masculino de LAT izquierda. La edad muestra no tener influencia en valores de AS y LAT.

ONCOLOGÍA 1

109. (12) ESTABLECIMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y GENOQUIMIOTERAPIA EN NUEVAS LÍNEAS PROVENIENTES DE PACIENTES DE MELANOMA

Fondello, Chiara; Villaverde, Marcela S.; Glikin, Gerardo C.; Finocchiaro, Liliana M. E.

Instituto de Oncología Angel H. Roffo

Objetivos: Obtener líneas de melanoma humano a partir de cultivos primarios de tumores de pacientes del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo". Evaluar el efecto antitumoral de la genotermoterapia sobre las líneas obtenidas, mediante el tratamiento combinado de bleomicina (antibiótico antitumoral con actividad endonucleasa) y la terapia génica por lipofección del gen Interferón beta humano (hIFN-β). **Resultados:** De seis tumores de melanoma humano provenientes de pacientes del Instituto Roffo y procesados en el laboratorio, se lograron obtener tres líneas celulares derivadas de tumores metastásicos (MLUTG-1, MLUTG-2 y MLUTG-4) mediante disgregación mecánica y repiques sucesivos. Las tres líneas celulares, cuyos tiempos de duplicación fueron 24,4 ± 0,6; 33,3 ± 0,4 y 59,4 ± 0,9 h (para MLUTG-1, MLUTG-2 y MLUTG-4, respectivamente), expresaron marcadores específicos para melanoma (S-100, HMB-45 y Melan-A), tal como se determinó por inmunocitoquímica. Se evaluó el efecto antitumoral de la lipofección del gen del hIFN-β combinado o no con bleomicina (ensayo APH). La lipofección con el gen del hIFN-β resultó en una disminución significativa de la sobrevivencia (p<0,001) para MLUTG-1 y MLUTG-2 (36,5 ± 0,7% y 35 ± 5%, respectivamente) y en un aumento de los niveles de oxidantes intracelulares (sonda DCFH-DA) en ambas líneas. En el caso de MLUTG-1, la efectividad de la lipofección del gen hIFN-β aumentó significativamente (p<0,01) por combinación con bleomicina (22,8 ± 1,7% de sobrevivencia). Las respuestas de MLUTG-4 a los tratamientos todavía no fueron evaluadas, ya que al ser la más reciente, y de muy bajos repiques, su sensibilidad es variable. **Conclusión:** Se lograron obtener y caracterizar tres líneas de melanoma humano, a partir de cultivos primarios de tumores de pacientes de nuestro Instituto. La lipofección con el gen del hIFN-β redujo significativamente la viabilidad de las células en las líneas evaluadas.

110. (16) SEÑALES DESENCADENADAS POR ANGIOTENSINA II Y ANGIOTENSINA 1-7 EN CÉLULAS MAMARIAS NORMALES Y TUMORALES.

Cambados, Nadia¹; Walther, Thomas²; Kordon, C. Edith¹; Schere Levy, Carolina¹

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Medizinische Fakultät Kinderchirurgie-Fetalzentrum, Universität Leipzig, Alemania².

Angiotensina II (AngII) y angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)] son péptidos del sistema renina angiotensina (RAS) que median importantes funciones biológicas. En varios tejidos la Ang-(1-7) 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 comparar los roles de Ang-(1-7) y AngII en células mamarias. En células epiteliales mamarias NMuMG encontramos que AngII indujo activación de AKT a partir del 1 min posterior al estímulo, mientras que Ang-(1-7) indujo pAKT luego de 15 min. La estimulación simultánea con ambas angiotensinas produjo un patrón de activación de pAKT similar al desencadenado por Ang (1-7). En células tumorales MDA-MB231, encontramos que AngII indujo una activación sostenida en el tiempo pAKT, mientras que la activación inducida por Ang-(1-7) fue transitoria. Además, Ang-(1-7) inhibió la activación de AKT desencadenada por AngII. En ensayos de migración en células MDA-MB231, observamos que AngII indujo migración significativa (1,7 veces respecto al control, $P < 0,0001$) mientras que Ang-(1-7) inhibió la migración inducida por AngII a valores similares al control ($p < 0,0001$). Determinamos además, que de ambas angiotensinas sólo la AngII indujo transición epitelio-mesénquimal (EMT) en células epiteliales NMuMG, tanto a nivel morfológico así como también por una inhibición significativa de la expresión de marcadores epiteliales como E-CAD ($P < 0,0001$). Conclusión: En células mamarias AngII y Ang-(1-7) tendrían efectos contrapuestos y Ang-(1-7) podría inhibir los efectos desencadenados por AngII. 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).

111. (51) ESTUDIO BIONFORMÁTICO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE DISTROFINA EN DISTINTOS TIPOS TUMORALES

Cotignola, Javier¹; Luce, Leonela N²; Abbate, Mercedes¹; Giliberto, Florencia²

Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (QUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires².

Hasta la actualidad, las alteraciones moleculares en el gen de la distrofina se relacionaban sólo con el desarrollo de distrofinopatías. Sin embargo, recientemente se publicó que la distrofina tiene actividad de supresor tumoral en tumores miogénicos humanos (Wang et al. Nat Genet. 2014 Jun; 46:601-6). Por lo tanto, nos propusimos evaluar la expresión del gen de la distrofina en distintos tejidos tumorales mediante análisis in-silico de resultados de microarrays de bases de datos públicas (NCBI/GEO). Evaluamos los niveles de expresión del gen de la distrofina en diferentes tejidos tumorales y normales. Procesamos datos provenientes de 21 trabajos independientes en donde se estudiaron diferentes tipos tumorales: melanomas, leucemias, linfomas, feocromocitomas, cánceres de mama, próstata, pulmón, esófago, colon, páncreas, cervix, cerebro y renal (1245 muestras tumorales y 701 muestras normales). Se calculó la expresión relativa de la distrofina de las 1946 muestras respecto de un gen de expresión invariable entre el tejido tumoral y normal. Se usó el test de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas entre los grupos en cada estudio individual. Determinamos que la expresión de la isoforma Dp427 está significativamente disminuida en la mayoría de los tumores analizados. El rango de disminución de la expresión, respecto al tejido normal, fue de 7% ($p = 0,010$) a 77% ($p = 1,6 \times 10^{-15}$) dependiendo del estudio. La disminución de la expresión en estos tumores avaría la función de supresor tumoral de la distrofina recientemente reportada. Sin embargo, en las leucemias linfoblásticas crónicas la expresión está aumentada entre un 66% ($p = 1,3 \times 10^{-5}$) y 464% (8×10^{-6}) al igual que en cáncer de colon (5%, $p = 0,009$); quedando por dilucidar la relación entre el aumento de la expresión y el desarrollo de estos tumores. La desregulación de la expresión de la distrofina es frecuente en el tejido tumoral, pudiendo convertirse en un nuevo blanco en el tratamiento antineoplásico.

112. (58) LOS INHIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASAS, BUTIRATO DE SODIO Y ÁCIDO VALPROICO, AUMENTAN LA SENSIBILIDAD A LA RADIACIÓN IONIZANTE EN CÉLULAS DE CÁNCER PAPILAR DE TIROIDES

Perona, Marina¹; Thomasz, Lisa^{1,2}; Rossich, Luciano¹; Rodríguez, Carla¹; Salvarredi, Leonardo¹; Dagrosa, Alejandra^{1,2}; Pawlak, Eva¹; Casal, Mariana¹; Pisarev, Mario Alberto^{1,3}; Juvenal, Guillermo Juan^{1,2}

Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²; Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³

Introducción: El cáncer de tiroides es una de las formas más comunes de tumores endocrinos representando alrededor del 0,5 al 1,5% de los tumores. El uso de los HDACI podría ser de utilidad para aumentar la respuesta a la radiación externa de cánceres de tiroides que no responden a los tratamientos terapéuticos convencionales. Objetivos: Estudiar el efecto de los HDACI butirato de sodio (NaB) y ácido valproico (AV) en el tratamiento del cáncer diferenciado de tiroides. Materiales y Métodos: Células de la línea de cáncer humano tiroideo papilar (TPC-1) fueron incubadas con NaB y AV e irradiadas con una fuente de ⁶⁰Co (1 Gy/min). Se midió la sobrevivencia celular mediante el ensayo clonogénico, la muerte celular, la distribución en el ciclo celular y el daño al ADN mediante la técnica de inmunofluorescencia de la *histona H2AX fosforilada* a distintos tiempos post irradiación. Se evaluó también la capacidad de rediferenciar las células mediante la captación de ¹²⁵I y el análisis de la expresión del transportador de yodo NIS. Resultados: El NaB y el AV redujeron los valores de fracción de sobrevivencia a 2 Gy de $31,8 \pm 1,5$ del control a $24,1 \pm 0,8$ ($p < 0,05$) y de $31,5 \pm 1,9$ a $10,8 \pm 0,8$ ($p < 0,001$) en aquellas células tratadas, respectivamente. Los HDACI aumentaron significativamente la muerte celular en los tiempos largos post irradiación. Se observó un arresto en la fase G2/M del ciclo celular en las células tratadas respecto a las irradiadas a las 24 horas ($p < 0,05$). El análisis del daño al ADN mostró un aumento en el número de focos/célula en las células tratadas con los HDACI en los tiempos estudiados. La incubación durante 24 horas con NaB o AV no produjo un aumento significativo ni en la expresión de NIS ni en la captación de ¹²⁵I a ninguna de las dosis utilizadas. Conclusiones: Los HDACI, butirato de sodio y ácido valproico, funcionarían como radiosensibilizadores de células de cáncer de tiroides diferenciado. No se observó ningún efecto de rediferenciación celular.

113. (61) ESTUDIO DEL STATUS MUTACIONAL DEL ONCOGEN BRAF EN PACIENTES CON MELANOMA CUTÁNEO EN DIFERENTES ESTADIOS Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Yépez Crow, Michelle¹; Barrio, María Marcela¹; Aris, Mariana¹; Mordoh, José^{1,2}

Centro de Investigaciones Oncológicas, Fundación Cáncer (CIO FUCA)¹; Instituto Médico Especializado Alexander Fleming²

El melanoma cutáneo (MC) es el cáncer de piel con mayor incremento en incidencia. Presenta alta tasa de mutaciones, siendo la más relevante la mutación nucleotídica T1799A, sustitución aminoacídica (V600E) del oncogén BRAF. La proteína serina-treonina quinasa BRAF^{V600E} es una variante constitutivamente activa asociada a la proliferación celular por la vía MAPK. En las líneas celulares de MC establecidas en nuestro laboratorio hay variantes BRAF^{V600E} (8/16), BRAF^{V600K} (4/16) y BRAF^{WT} (4/16); presentando las líneas BRAF^{V600E} mayor índice proliferativo y clonogénico *in vitro*. Dada su relevancia, se analizó el *status* mutacional de BRAF en biopsias tumorales de una población de pacientes con MC del Instituto Alexander Fleming. Para ello, se estableció una metodología de trabajo; desde la extracción de ADN tumoral a partir de biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina; hasta la amplificación de la región de interés y posterior análisis de su secuencia por el método de Sanger. Luego se determinó

el *status* mutacional de BRAF en cada biopsia, y su relación con características clínico-patológicas del tumor. La población de pacientes con MC analizada (n=34) presentó mayor proporción del oncogén BRAF mutado (21/34; 61,8%) que la reportada en bibliografía (50%). Se detectó prevalencia de BRAF^{V600E} (19/21; 90,5%) con respecto a BRAF^{V600K} (2/21; 9,5%). Se encontró una tendencia de asociación con el índice proliferativo de los tumores (Ki-67⁺); el índice de Breslow y la ulceración epidérmica de los tumores primarios; y la presencia de metástasis en ganglios linfáticos. Estos resultados indican que la población local de pacientes con MC tendría mayor prevalencia del oncogén BRAF; y que esta variable tendría relación con otros parámetros clínico-patológicos comúnmente asociados a la enfermedad. Esto abre la posibilidad de considerar el *status* mutacional del oncogén BRAF como factor pronóstico, con el fin de mejorar la estadificación del MC en los pacientes.

114. (73) EL BALANCE ENTRE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA REGULA LA POBLACIÓN DE CÉLULAS CON CARACTERÍSTICAS STEM EN GLÁNDULA MAMARIA MURINA

Recouvreux, María S; Sampayo, Rocío; Simian, Marina
Instituto de Oncología Angel H. Roffo

La progesterona (P) juega un rol preponderante en el desarrollo normal de la glándula mamaria así como también en la carcinogénesis de la misma. El receptor de P (PR) presenta dos isoformas, PR-A y PR-B, tanto en ratón como en humanos. El balance entre ambas isoformas es necesario para la correcta respuesta frente a la P; en este contexto es interesante notar que en tumores de mama humanos este balance se encuentra alterado. Con el objetivo de estudiar el rol de las isoformas del PR en la biología de la glándula mamaria, utilizamos un modelo de ratones transgénicos, uno que sobreexpresa PR-A y otro PR-B. Las características de las glándulas mamarias de estos ratones indicarían que el desbalance entre PR-A/PR-B sería de gran importancia para el desarrollo normal, la carcinogénesis y la regulación de las células con propiedades stem de la glándula mamaria. Nosotros proponemos que la alteración en el balance PR-A/PR-B afectaría la expansión y autorenovación de las células stem mamarias murinas. En este trabajo, encontramos que los ratones PR-B presentan un mayor porcentaje de células positivas para marcadores de células stem (CD24⁺/CD29⁺/Lin⁻) comparado con PR-A y sus hermanas no transgénicas (WT), (n=4; P=0,003). En concordancia con este resultado las células derivadas del cultivo primario de los ratones PR-B presentan una mayor capacidad de formación de mamoesferas que WT y PR-A (n=5, P=0,0016). Por último, al evaluar los niveles de expresión de las metaloproteasas MMP-9 y MMP-2, encontramos que las glándulas mamarias de los ratones PR B presentan mayor actividad de MMP-9 que WT y PR-A. Nuestros resultados sugieren que la isoforma B del receptor de PR tendría un rol preponderante sobre el mantenimiento y expansión de las células stem mamarias murinas.

115. (80) GALECTINA-8 MODULA LA INTERNALIZACIÓN DE CD166 EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS

Ferragut, Fátima¹; Bracalente, Candelaria¹; Espelt, María Victoria¹; Troncoso, María Fernanda¹; Wolfenstein-Todel, Carlota¹; Malchiodi, Emilio²; Rabinovich, Gabriel Adrián^{3,4}; Fernández, Marisa²; Elola, María Teresa¹
Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET³; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET⁴.

Galectina-8 (Gal-8) es una galectina con dos dominios de reconocimiento a carbohidratos en tándem, vinculada a procesos tumorales. Nuestro grupo describió la glicoproteína CD166 (ALCAM)

como un ligando de Gal-8. En el presente trabajo, nos propusimos analizar la internalización de CD166 en células tumorales mamarias humanas MDA-MB-231, en presencia y ausencia de Gal-8. Nuestros objetivos fueron: 1) Estandarizar un ensayo de internalización basado en anticuerpos; 2) Analizar la co-localización de CD166 con distintos marcadores de endosomas; 3) Evaluar el efecto de Gal-8 exógena en la internalización de CD166. Los ensayos se efectuaron mediante inmunofluorescencia en microscopía confocal. En todos los casos y sobre hielo, las células MDA-MB-231 se trataron con Gal-8 o PBS durante 30 min; luego, las células fueron incubadas con anti-CD166-ficoeritina (PE). La internalización se indujo a 37°C durante 0-60 min; los controles se incubaron en hielo. Finalmente, las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con diferentes anticuerpos para evaluar el tráfico intracelular. Encontramos que: 1- En ausencia de Gal-8, CD166 se internalizó en parte hacia endosomas tempranos (revelados con un anticuerpo anti-EEA1), detectándose co-localización parcial de CD166 y EEA1. 2- Al incubarse con Gal-8, se observó una pronunciada localización de CD166 en la superficie celular y escasa endocitosis al cabo de 40 min a 37°C, lo cual significó un retardo de la internalización de CD166. Las células tratadas con Gal-8 presentaron co-localización disminuida de CD166 con EEA1 en comparación con células no incubadas con la lectina, confirmando que la internalización de CD166 resultó restringida. Estos resultados nos permitirían concluir que: las interacciones glicano/Gal-8 funcionan reteniendo a las glicoproteínas como CD166 en la superficie de las células MDA-MB-231, evitando así su endocitosis, lo cual podría tener implicancias en la adhesión celular.

116. (90) EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA INDUCE LA EXPRESIÓN DE MUCINA 4 CONFIRIENDO RESISTENCIA AL TRASTUZUMAB EN CÁNCER DE MAMA ERBB2 POSITIVO

Mercogliano, María Florencia¹; De Martino, María¹; Venturutti, Leandro¹; Rivas, Martín Alfredo¹; Inurigarro, Gloria²; Frahm, Isabel²; Izzo, Franco¹; Proietti, Cecilia Jazmín¹; Elizalde, Patricia Virginia¹; Schillaci, Roxana¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Servicio de Patología, Sanatorio Mater De²

El ErbB2 está sobreexpresado en ~20% de los cánceres de mama (CM) y se asocia con mal pronóstico. Los pacientes se tratan con el anticuerpo (Ac) monoclonal anti ErbB2, trastuzumab (T), pero sólo el 26-50% de ellos responden. El factor de necrosis tumoral α (TNF) es una citoquina pleiotrópica en CM. Demostramos que el TNF transactiva al ErbB2 y genera resistencia *in vitro* al T en células de CM ErbB2 positivas. Aquí exploramos la participación del TNF en la resistencia *in vivo* al T en CM y el mecanismo por el cual ésta se produce. Usamos las líneas celulares JIMT-1 y KPL-4 (resistentes intrínsecas al T) y los multiclonales C2 (control) y T2 (que sobreexpresa TNF) generados en nuestro laboratorio a partir de la línea BT-474 sensible al T. La proliferación de C2 fue inhibida luego de 48h con T (p<0,05 vs. control) pero no se modificó en T2. Los xenoinjertos de T2 en ratones *nude* tratados con T (5mg/kg) continuaron su crecimiento, en cambio C2 regresó por completo luego de 3 inyecciones de T. En los tumores resistentes JIMT-1 y KPL-4 solo con la reducción del Ac bloqueante de TNF, etanercept (E) junto con T redujeron el crecimiento tumoral (54,1%, p<0,05 y 72,98%, p<0,01, respectivamente) comparados con los grupos IgG, T o E. Como los estudios histopatológicos del T2 mostraron focos de mucinosos, evaluamos la expresión de mucina 4 (MUC), que enmascara al ErbB2. Observamos un aumento de MUC en T2 respecto de C2 (p<0,05), dependiente de la activación de NF- κ B (Western Blot). El bloqueo del TNF produjo una baja de MUC en JIMT-1 *in vivo* e *in vitro*. Por citometría de flujo comprobamos una menor unión del T a T2, que se revirtió al bloquear MUC con ARN de interferencia. El bloqueo de TNF en líneas resistentes aumentó la unión del T. Estos resultados indican que TNF es un factor de resistencia al T a través de MUC, y podrían usarse como biomarcadores de resistencia a T. Más aun el bloqueo de TNF sumado a T podría ser una terapia prometedora para pacientes resistentes a T.

117. (92) ESTUDIOS GLOBALES DE EXPRESIÓN PROTEICA Y DE BIOINFORMÁTICA PARA EL CONOCIMIENTO DE LAS BASES MOLECULARES DEL CÁNCER DE MAMA (CM) Y LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ESTA ENFERMEDAD

Rosso, Marina¹; Lapyckyj, Lara¹; Abascal, María Florencia¹; Matos, María Laura¹; Reventos, Jaume²; Furlong, Laura Inés³; Besso, María José¹; Mencucci, María Victoria¹; Aparicio, Evangelina¹; Vázquez-Levin, Mónica¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Unidad de Investigación del Hospital de Vall d'Hebron, Barcelona, España² Hospital del Mar Medical Research Institute, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España³.

Introducción: El CM es el cáncer más común y la 1ra causa de muerte por cáncer en mujeres. Cadherina epitelial (CadE) es una molécula de adhesión clave en la glándula mamaria y alteraciones en su expresión/funciones se asocian a la progresión tumoral. Debido a la complejidad de esta enfermedad, las estrategias de análisis global de expresión proteica sobre modelos celulares *in vitro* y los estudios integrales de bioinformática son herramientas hoy elegidas para comprender las bases moleculares del CM e identificar biomarcadores de la enfermedad. Objetivos: Realizar estudios de 1) proteómica global y 2) bioinformática de minería de datos de genes/proteínas y redes funcionales, para identificar genes/proteínas asociados a CadE como posibles nuevos biomarcadores del CM. Métodos: Para 1) se empleó un modelo celular de transfectantes de MCF7 con expresión disminuida de CadE y fenotipo invasivo (MCF7-CadEMOD) y su control, y se realizó 2D-DIGE sobre extractos celulares totales, seguido de análisis de expresión proteica diferencial e identificación por espectrometría de masas. Para 2) se utilizaron las herramientas bioinformáticas DisGeNET, HIPPIE y VENNY para identificar genes/proteínas asociados a CadE y CM; e "Ingenuity Pathway Analysis" (IPA) y PANTHER para generar redes de conexión de proteínas y determinar procesos celulares afectados. Resultados: De 1) se identificó un conjunto de proteínas diferencialmente expresadas ($\geq \Delta 1, 5$) en MCF7-CadEMOD, involucradas en los procesos celulares de ubiquitinación, estrés oxidativo, muerte/proliferación celular y metabolismo energético (IPA/PANTHER); procesos asociados al cáncer. De 2) se determinó que el 80% de las proteínas identificadas no han sido asociadas a CM (DisGeNET/HIPPIE/VENNY). Conclusión: El estudio realizado permitió identificar un conjunto de proteínas aún no reportadas en CM como potenciales nuevos candidatos que podrán aportar a la comprensión de las bases moleculares del CM, así como a su diagnóstico y seguimiento.

118. (107) EFECTO DE LA TERAPIA METRONÓMICA EN CÁNCER DE MAMA. PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DE TUMOR

Salem, Agustina; Lombardi, Gabriela; Español, Alejandro; Sales, María Elena.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La resistencia a la quimioterapia es un problema crítico en el tratamiento oncológico y se cree que esto se debe a la presencia de células madre de tumor (CMT). El uso de combinaciones de drogas en dosis bajas, denominado terapia metronómica (TM) es una estrategia utilizada para incrementar el efecto terapéutico y disminuir los efectos adversos en el tratamiento del cáncer. Entre los tumores mamarios humanos se encuentran los luminales y los triple negativos, que son los más frecuente y los de peor pronóstico respectivamente. En este trabajo analizamos el efecto de una combinación del agonista colinérgico carbaol (Carb) con paclitaxel (PX) utilizada como TM en células MCF-7, derivadas de un tumor luminal y MDA-MB-231, provenientes de un tumor triple negativo. Por ensayos colorimétricos con el reactivo MTT en células MCF-7 observamos que el tratamiento con la combinación efectiva máxima (CEM) (PX 10^{-9} M+Carb 10^{-11} M) produjo un efecto citotóxico del $47 \pm 6\%$ ($p < 0,001$ vs. control) mientras que en las células MDA-MB-231 la CEM (PX 10^{-8} M+Carb 10^{-12} M) generó un

efecto menor ($24 \pm 3\%$; $p < 0,01$ vs. control). La CEM no modificó la viabilidad de las células mamarias MCF-10A no tumorigénicas. Por ensayos de citometría de flujo determinamos la presencia de una población de CMT (CD44⁺/CD24⁻) tanto en células MCF-7 ($0,99 \pm 0,13\%$) como en células MDA-MB-231 ($90,25 \pm 5,66\%$) que se correlacionaría directamente con el grado de malignidad celular. No se identificó esta población en células MCF-10A. El tratamiento con la CEM redujo la expresión de CD44 (asociado con la migración celular) en ambos tumores ($p < 0,01$ vs. control) y disminuyó significativamente la población CD44⁺/CD24⁻ en células MCF-7 ($p < 0,01$). Concluimos que la TM con PX+Carb produce un efecto citotóxico en las células tumorales con el efecto agregado de disminuir la población de CMT y la capacidad de migrar en estas células lo que le confiere un posible potencial terapéutico.

119. (138) EFECTO DE LOS PRODUCTOS DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA) POR EL CITOCROMO P450 (CYP) SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE FEOCROMOCITOMA MURINO

Colombero, Cecilia; Martín, Ayelén; Pennisi, Patricia; Nowicki, Susana.
Centro de Investigaciones Endocrinológicas "Dr. Cesar Bergadá" CONICET FEI División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

El AA es metabolizado por isoformas del CYP, 20-hidroxilasas y epoxigenasas, al ácido 20-hidroxiicosatetraenoico (20HETE) y a ácidos epoxiicosatrienoicos (11,12EET y 14,15EET) respectivamente. Se ha descrito que estos compuestos poseen actividad proliferativa y proangiogénica en algunos tejidos normales y en ciertos procesos tumorales. En un trabajo previo demostramos la presencia de estas isoformas y sus metabolitos en feocromocitomas (FEO) humanos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de estos compuestos de promover el crecimiento de células de FEO murino *in vitro*. Las células se cultivaron en medio completo ó de bajo suero y se realizaron estímulos diarios con el metabolito de interés. Se evaluó viabilidad celular mediante conteo con Trypan Blue y proliferación con bromodeoxiuridina (BrdU). En medio de bajo suero, 48h de estímulo con 11,12EET (2,5-100nM) o 14,15EET (10-1000nM) aumentó el número de células en forma dosis dependiente (% del control para 10nM: 11,12EET: $159,5 \pm 39,3$; 14,15EET: $188,7 \pm 50,6$; $n=2-6$; $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente). El efecto del 20HETE no fue significativo en un amplio rango de concentraciones ($n=2-6$). El curso temporal indicó que el efecto de ambos EETs 10nM fue sostenido hasta los 4 días en cultivo en medio de bajo suero ($n=3$; $p < 0,05$), y fue significativo a partir del día 6-7 en medio completo (en% del basal día 1, 11,12EET: $908,8 \pm 329,7$ vs control: $612,2 \pm 222$; y 14,15EET: $1078 \pm 394,6$ vs control: $749,0 \pm 283,3$; $n=3$; ambos $p < 0,05$). Este crecimiento está relacionado con la estimulación de la proliferación celular, observándose un aumento del 26 y 22% de células BrdU positivas sobre el control para 11,12EET y 14,15EET respectivamente (ambos 10nM, 48h de estímulo en medio bajo suero) ($p < 0,05$). La inhibición de la apoptosis por ambos EETs debe ser evaluada para determinar su contribución al fenómeno de crecimiento celular. Esta es la primera evidencia que los EETs tienen efectos proliferativos en células de FEO.

120. (150) EFECTO ANTITUMORAL DE DROGAS EN REPOSICIONAMIENTO SOBRE LÍNEAS DE TUMOR DE MAMA

Menacho Márquez, Mauricio Ariel; Rico, María J; Rozados, V; Scharovsky, O. Graciela
Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

El reposicionamiento de drogas consiste en la aplicación de fármacos y compuestos conocidos a nuevas indicaciones. Una interesante alternativa a la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales, es la utilización de drogas que inicialmente no han sido desarrolladas para tratar el cáncer, pero que han mostrado potencial antiangiogénico-antitumoral. Metformina es una biguanida utilizada en el tratamiento de diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. Propranolol es un beta-bloqueante indicado en enfer-

medades cardiovasculares. En este trabajo evaluamos el potencial antitumoral de Metformina (Met) y Propranolol (Prop) en las líneas derivadas de cáncer de mama M-234p, M-406, MDA-MB-231, 4T1 y MCF7. Para tal fin cultivamos las células por 24/48 hs a 37°C y 5% de CO₂ y determinamos el efecto de Met (1 a 15mM) y Prop (10 a 50mM) sobre la proliferación (método colorimétrico con sales de tetrazolio), la apoptosis (citometría de flujo de células teñidas con Anexina V y Ioduro de Propidio) y la migración celular (método de cicatrización de la herida). El tratamiento con estas drogas inhibió el crecimiento de las células tumorales de un modo dosis dependiente (Met P<0,05; Prop P<0,005 para todas las dosis evaluadas), aumentó el grado de apoptosis (P<0,05 para Met y Prop) y disminuyó la migración celular en ensayos de cierre de herida (P<0,001). Del mismo modo, la combinación de Met+Prop mostró un efecto inhibitorio del crecimiento superior al tratamiento con cualquiera de las drogas por separado en las células tumorales analizadas (P<0,001). En conjunto, nuestros resultados sugieren que: la terapia con drogas reposicionadas podría resultar de interés para el tratamiento del cáncer de mama; Met y Prop podrían tener una acción tanto antitumoral (disminución de la viabilidad y aumento de la apoptosis) como antimetastásica (descenso de la migración celular); el tratamiento combinado tendría un efecto aditivo.

121. (152) EFECTO APOPTÓTICO INDUCIDO LUEGO DE LA IRRADIACIÓN DE UNA FTALOCIANINA DE ZN (II) LIPOFÍLICA EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE COLON

Chiarante, Nicolás Agustín¹; Marino, Julieta¹; García Vior, María C.²; Awruch, Josefina²; Roguin, Leonor¹
Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Depto. de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²

Las ftalocianinas (Pc) son compuestos fotosensibilizadores de potencial utilidad como agentes antitumorales en terapia fotodinámica. En nuestro laboratorio evaluamos la potencia antiproliferativa de una Pc lipofílica (Pc9) incorporada en micelas de poloxamina sobre la línea celular CT26 (carcinoma de colon murino) (IC₅₀ 10 ± 1 nM). Con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de Pc9 estudiamos, en primer lugar, la internalización del compuesto en las células CT26. Demostramos, mediante ensayos de citometría de flujo, una captación máxima luego de 4h de incubación. Por microscopía confocal, observamos que el compuesto se localiza principalmente en lisosomas. Luego de incubar las células con Pc9, detectamos un incremento de aproximadamente 4 veces en la población de células hipodiploides a tiempo 0 post-irradiación (10,04 ± 0,01% células tratadas vs 2,255 ± 0,001% control). Asimismo, por ensayos de Western blot comprobamos una reducción del 66% y 78% en los niveles de expresión de las proteínas Bid y Bcl-X_L, respectivamente (p< 0,005). Por otro lado, la disminución observada en los niveles de procaspasa 3 (66%, p< 0,01) sugirió la activación de la caspasa efectora de la apoptosis. Para evaluar un posible daño de la membrana mitocondrial utilizamos la sonda fluorescente DiOC6. Por citometría de flujo evidenciamos un aumento en la proporción de células con la membrana mitocondrial despolarizada (58,4 ± 0,4% células tratadas vs 1,1 ± 0,4% control). En conclusión, demostramos que Pc9 se incorpora en vesículas lisosomales de células CT26 y luego de la irradiación desencadena una respuesta apoptótica caracterizada por el clivaje de Bid, la disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-X_L, la despolarización de la membrana mitocondrial, la activación de la caspasa 3 y daño a nivel nuclear. Sobre la base de estos resultados, nos proponemos evaluar en un futuro la potencia fotobiológica de Pc9 en ensayos *in vivo*.

122. (180) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA NHERF1 (SODIUM-HYDROGEN EXCHANGER REGULATORY FACTOR 1) EN TUMORES DE OVARIO HUMANO

Demacopulo, Brenda¹; Lema, Baltazar; Cabrini, Rómulo L^{1,2}; Kreimann, Érica L¹

Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)¹ Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²

NHERF1 es una proteína adaptadora regulada por estrógenos, expresada mayoritariamente en la membrana apical de los epitelios polarizados, que interactúa con la proteína β -Catenina y estabiliza su unión con E-Caderina en las uniones adherentes. Se ha descrito a NHERF1 como un gen supresor tumoral o un oncogen dependiendo del contexto celular. Durante la transformación de células epiteliales, NHERF1 se desplaza al citoplasma. La ausencia de la proteína a nivel de membrana impediría su función como gen supresor lo cual favorecería la transformación epitelio mesenquimática o EMT y la invasión característica de la metástasis. Al presente no se conoce la distribución de NHERF1 en los tumores de ovario pero si se ha documentado una alta frecuencia de pérdida de la heterocigocis en la región correspondiente a NHERF1 del cromosoma 17, principalmente en asociación con estadios pobremente indiferenciados, etapas avanzadas y tumores serosos de ovario. En este trabajo, se evaluó la expresión de NHERF1 mediante la técnica de inmunohistoquímica en tumores serosos de tipo borderline papilar, adenocarcinomas de intermedio y de alto grado, metástasis de colon y endometrio en tejido ovárico. Se ha observado un patrón diferencial muy característico en tumores serosos borderline con una fuerte tinción a nivel de membrana en zonas de estructura papilar. En los carcinomas de alto grado se observó una marcación en los polos apicales de las células en los bordes de las hendiduras que delimitan esbozos de espacios luminales. En contraposición, se observó tinción apical y citoplasmática en la metástasis de colon y un patrón muy difuso en metástasis de endometrio en ovario. La mantención apical de NHERF1 en los tumores borderline serosos ováricos constituye un desafío al rol de NHERF1 como un supresor tumoral a nivel de membrana. Futuros estudios deberán determinar los mecanismos involucrados y su importancia para la supervivencia de dichas células tumorales.

123. (188) EFECTO ANTITUMORAL DE MODULADORES DEL METABOLISMO EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO FELINO

Arbe, María Florencia¹; Agnetti, Lucrecia¹; Tellado, Matías²; Álvarez, Gabriel²; Glikin, Gerardo C¹; Finocchiaro, Liliana M¹; Villaverde, Marcela S¹
Unidad de Transferencia Genética, Área Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Química Biológica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Buenos Aires².

El carcinoma mamario felino (CMF) es una patología altamente frecuente y muy agresiva. Lamentablemente, a partir de los 3 cm de diámetro el CMF carece de tratamientos efectivos. Dado que la gran mayoría de las células tumorales derivan su metabolismo hacia una glicólisis aeróbica favoreciendo el crecimiento y la metástasis tumoral, nos propusimos investigar los potenciales efectos antitumorales de moduladores del metabolismo y cuáles son los mecanismos que estos desencadenan en células de carcinoma mamario felino. A tal fin, incubamos las células con concentraciones crecientes de metformina (MET, hipoglucemiante oral, activador indirecto de la AMPK y bloqueante de la cadena respiratoria), 2-deoxiglucosa (2DG, inhibidor de la hexoquinasa) o dicloroacetato (DCA, inhibidor de la piruvato deshidrogenasa quinasa). A los 5 días, evaluamos la viabilidad (actividad de la fosfatasa ácida, APH) encontrando una respuesta significativa para todos los tratamientos (p<0,05). La combinación MET-2DG potenció el efecto individual de las drogas (APH y recuento celular, p<0,01). Además, MET-2DG promovió un aumento en las especies oxidantes intracelulares (sonda DCF, citometría de flujo) y aumentó el porcentaje de células en G0/G1 (ioduro de propidio, citometría de flujo). Todos los tratamientos promovieron autofagia (evaluación de vesículas autofágicas, plásmido RFP-LC3). Sin embargo, los inhibidores de la autofagia (3MA y cloroquina) no revierten el efecto de los tratamientos e incluso potenciaron el efecto de 2DG. Por último, encontramos que MET promueve un aumento en el consumo de glucosa (glicemia, Weiner Lab) y disminuye el

pH extracelular. En su conjunto, los resultados obtenidos hasta aquí alientan a la profundización del estudio de la modulación del metabolismo como nueva estrategia terapéutica en CMF.

124. (202) DETECCIÓN DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN CÁNCER DE COLON MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON CURVAS DE MELTING DE ALTA RESOLUCIÓN (PCR-HRM)

Sánchez, Ariel G¹; Alvarellos, Teresita¹; Juaneda, Ignacio¹; Bollo, Mariana²; Basquiera, Ana¹; Diller, Ana¹; Palazzo, Emilio¹; Eynard, Héctor¹

Hospital Privado de Córdoba¹; Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba².

El estudio de inestabilidad de microsatélites (MSI) es un importante marcador en el screening de casos hereditarios de cáncer colonorectal (CCR) relacionados al Síndrome de Lynch (90% de los casos posee MSI), aunque también se puede encontrar dicha inestabilidad en casos esporádicos. Las técnicas utilizadas en la actualidad para detectar la MSI son la electroforesis capilar (en secuenciador de ADN) y la cromatografía líquida de alta eficacia desnaturante (DHPLC). Un nuevo método, la PCR-HRM, surge como una herramienta sencilla, rápida y de bajo costo para este análisis. Los objetivos del trabajo fueron: analizar 3 microsatélites mononucleótidos en CCR de nuestra población utilizando PCR-HRM y correlacionar los resultados con datos clínicos de los pacientes afectados. Se estudiaron 110 pacientes de nacionalidad Argentina con diagnóstico de CCR (en cualquier estadio); 43 mujeres y 67 hombres con una edad promedio de 66 años (rango: 30-89), de los cuales se obtuvo pieza quirúrgica de tumor y sangre periférica. El análisis de MSI fue realizado en ADN de tumor y tejido sano mediante PCR-HRM en los microsatélites BAT25, BAT26 y CAT25, comparando los resultados con electroforesis capilar. A las muestras consideradas con MSI positiva (+) se las correlacionó con los criterios de Bethesda modificados (CBM). De los 110 CCR, 8 presentaban MSI (+), 7 de ellos tuvieron ubicación en colon derecho y 1 en izquierdo, sólo 2 cumplían los CBM (promedio de edad 53 años vs. 72 años en quienes no los cumplían $p: 0,002$). Hubo 100% de correlación entre los resultados obtenidos por ambas metodologías al estudiar los 3 microsatélites. La PCR-HRM demuestra ser una técnica simple y confiable para realizar el análisis de MSI con estos marcadores en muestras de nuestra mezcla étnica. Los 2 pacientes con CCR que cumplían los CBM y además poseían MSI (+) sugieren casos de cáncer hereditario y los 6 restantes con MSI (+) podrían considerarse esporádicos

125. (226) EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE HO-1 SOBRE EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Leonardi, Daiana B; Páez, Alejandra V; Schuster, Federico; Gueron, Geraldine; Cotignola, Javier H; Vázquez, Elba S *Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.*

Los glucocorticoides se administran en combinación con otras drogas para el tratamiento del cáncer de próstata refractario a hormonas, aunque su uso es discutido porque actualmente se acepta que el receptor de glucocorticoides (GR) puede sustituir al receptor de andrógenos y activar un set similar pero distinguible de genes. Nuestro objetivo es estudiar la señalización del GR y el efecto de hemo oxigenasa 1 (HO-1) en esta vía. Para estudiar la actividad transcripcional de GR utilizamos un ensayo de genes reporteros en células de la línea PC3 (insensible a hormonas) transfectadas con el plásmido MMTV-luc, que posee 3 sitios de unión para GR río arriba del gen de la luciferasa. Se realizaron tratamientos con dexametasona (Dex 10^{-8} M, 6h), con un inductor de HO-1 (hemina 80μ M, 24h), o con ambas drogas. Las células fueron cultivadas en medio con suero sin hormonas. El tratamiento con hemina redujo significativamente la actividad basal del GR ($p=0,03$) como la inducida por Dex ($p= 0,01$). Estos resultados se confirmaron por RT-qPCR de un gen blanco directo de GR (IkB) y mediante

el uso de un plásmido reportero con sitios para NFkB. Utilizando microscopía confocal, se corroboró la translocación nuclear de GR por efecto de Dex, y se demostró una menor translocación cuando las células se expusieron al tratamiento combinado con hemina y Dex. Este fenómeno se condice con la disminución de la actividad del reportero detectada usando el MMTV-luc en presencia de hemina+Dex vs Dex. También demostramos interacción física entre GR y HO-1 en núcleo y citoplasma por co-precipitación. En conclusión, estos resultados sugieren que la inducción de HO-1 modula la actividad del GR y su localización celular en las células PC3.

126. (233) ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE DROGAS QUIMIOTERAPÉUTICAS

Díaz Flaqué, María Celeste¹; Aschero, María Del Rosario¹; Cayrol, María Florencia¹; Sterle, Helena¹; Paulazzo, Alejandra¹; Valli, Eduardo¹; Klecha, Alicia¹; Barreiro Arcos, María Laura¹; Cremaschi, Graciela^{1,2}

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) -CONICET-UCA¹; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²

Las hormonas tiroideas (HT) son las principales responsables de la regulación metabólica de la mayoría de los tejidos normales. Previamente demostramos que las HT regulan la expresión de las enzimas citocromo P450 (CYP) en células de linfoma T (LT). CYP es una familia de enzimas mayoritariamente hepáticas que metabolizan compuestos exógenos y endógenos. Por su parte, la subfamilia CYP3A, está involucrada en el metabolismo de más del 50% de todos los medicamentos terapéuticos utilizados en la clínica. Trabajos previos de nuestro laboratorio, demostraron que las HT, inducen la expresión de CYP 3A4 en LT a través de mecanismos no genómicos activados por un receptor de membrana (mTR), la integrina α V β 3. En este trabajo evaluamos la capacidad de las HT de inducir la activación de vías de señalización involucradas en la expresión de CYP y la activación metabólica de la enzima CYP 3A4 en células de LT de la línea celular Jurkat. Para evaluar los efectos inducidos por el mTR, se usaron HT acopladas a agarosa (HT-ag, impermeables a la membrana celular). El tratamiento de las células Jurkat con HT y HT-ag a distintos tiempos, indujo la activación de la vía de activación Erk 1/2 y Stat1, efecto boqueado por la regulación negativa del mTR mediante siRNA. Por otro lado, el tratamiento de las células Jurkat con HT durante 18 hs indujo un incremento del 60% en la activación de la enzima CYP 3A4. Estos resultados indican que las HT modulan la expresión y activación de enzimas CYP 450 a través de la activación de vías de señalización en células tumorales, demostrando la importancia de evaluar el estado tiroideo y el patrón de expresión de estas enzimas en cada paciente al momento de iniciar el tratamiento quimioterapéutico. El conocimiento de los factores que regulan la transcripción de los genes que codifican a los CYP, así como los eventos moleculares participantes, contribuirán al mejoramiento de los modelos para el screening y predicción de las respuestas a las terapias.

127. (243) ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO COMO MARCADOR ADICIONAL PARA MEJORAR EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Abbate, M.Mercedes¹; Leonardi, Daiana B.¹; Vallecorsa, Pablo²; Morales Bayo, Sergio³; Meiss, Roberto²; Gueron, Geraldine¹; Vázquez, Elba¹; Cotignola, Javier¹

Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; División Patología Experimental de la Academia Nacional de Medicina²; Servicio de Urología, Hospital Municipal de Vicente López "Dr. Prof. Bernardo Houssay"³.

El diagnóstico presuntivo del cáncer de próstata (CaP) se realiza mediante la cuantificación del Antígeno Prostático Específico (PSA), aunque tiene baja especificidad, ya que también aumenta

en otras enfermedades prostáticas (hiperplasia prostática benigna -HPB- y prostatitis). El objetivo del trabajo es buscar un marcador complementario al PSA que mejore el diagnóstico del CaP. Estudiamos la 8-oxo-deoxiguanina (8-oxo-dG) plasmática como marcador de estrés oxidativo y dos polimorfismos en enzimas del sistema de reparación del daño oxidativo (OGG1 p.S326C y APE1 p.D148E). Se reclutaron pacientes diagnosticados con CaP (n=9), HPB (n=9) o prostatitis (n=3) bajo un protocolo aprobado por el Comité de Ética del Hospital Municipal de Vicente López. Se obtuvo sangre periférica y se cuantificó la 8-oxo-dG plasmática mediante un ELISA. Se extrajo ADN de linfocitos y se genotipificaron los polimorfismos en OGG1 y APE1 mediante TaqMan y PCR-alelo específica, respectivamente. Encontramos menores niveles de 8-oxo-dG plasmática en los pacientes con carcinoma (mediana: 10335 vs 11847 pg/ml para carcinomas y HPB/prostatitis, respectivamente). También encontramos los polimorfismos están asociados con diferentes niveles de 8-oxo-dG plasmática. Determinamos que los individuos homocigotas OGG1 p.S326S y APE1 p.148E tienen mayores niveles de 8-oxo-dG comparados a los otros genotipos (OGG1: 12173 vs 9459 pg/ml, y APE1: 12910 vs 9995 pg/ml). También se realizó tinción inmunohistoquímica para 8-oxo-dG en biopsias prostáticas de los mismos pacientes, observándose mayor número de glándulas marcadas en los carcinomas. Estos resultados indicarían que las células tumorales están bajo estrés oxidativo y que reparan el daño menos eficientemente. Las diferencias encontradas no resultaron estadísticamente significativas probablemente al número limitado de pacientes estudiados hasta el momento. Estos resultados garantizan el estudio de más muestras para corroborar los hallazgos.

128. (262) ROL DE CTBP1 EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN TUMORAL MAMARIA EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME METABÓLICO

De Luca, Paola¹; Dalton, Nicolás¹; Moiola, Cristian Pablo¹; Flumian, Carolina²; Porretti, Juliana¹; Massillo, Cintia¹; Kordon, Edith³; Todaro, Laura²; Vázquez, Elba³; Meiss, Roberto⁴; De Siervi, Adriana¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFYBINE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³; Academia Nacional de Medicina⁴

La obesidad y el síndrome metabólico (SM) aumentan la incidencia y la agresividad del cáncer de mama. C-terminal Binding Protein (CtBP1) es un correpresor de supresores tumorales y es activado por una dieta rica en grasa (alto NADH). En este trabajo estudiamos los efectos de la activación de la vía de CtBP1 por este tipo de dieta sobre el desarrollo y progresión tumoral mamaria. Para ello generamos un modelo murino de SM suministrando dieta grasa (DG) en forma crónica. Utilizando cortes histológicos y la técnica de montaje de mamas completas, encontramos que el tejido mamario de los animales que recibieron DG presentó mayores niveles de tejido adiposo inmaduro y de ramificaciones laterales y bulbos terminales de los conductos mamarios. El tejido mamario de los animales DG presentó mayor expresión del marcador de proliferación ciclina D1 y epitelial e-cadherina. Interesantemente, la DG indujo la expresión de CtBP1 en los conductos mamarios. Asimismo, el número y el tamaño de mamíferos generados a partir de células LM8-LP aumentaron significativamente cuando fueron incubadas con suero de animales alimentados con DG con respecto al suero de animales bajo DC. Además, generamos xenotransplantes en ratones atímicos alimentados con DG o DC a partir de células tumorales de mama MDA MB 231 con expresión disminuida de CtBP1 (shRNA CtBP1) o control (shRNA Scramble). Los tumores shRNA CtBP1 presentaron menor crecimiento tumoral y menor expresión de Ki67 con respecto a los controles. Más aún, los xenotransplantes desarrollaron menor grado de diferenciación en condiciones de DG con respecto a la DC. Mediante RT-qPCR encontramos que los tumores shRNA CtBP1 presentaban menor

expresión de marcadores mesenquimales (vimentina), marcadores de células progenitoras (Gli1) y marcadores involucrados en el desarrollo mamario (RIP140). Estos resultados muestran por primera vez al gen CtBP1 como un vínculo molecular que asocian al cáncer de mama con el síndrome metabólico.

129. (263) EL TRATAMIENTO CON EL ÁCIDO RETINOICO (ATRA) ASOCIADO A LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA PROTEÍNA QUINASA C ALFA (PKC α), DISMINUYE EN FORMA SINÉRGICA LA PROGRESIÓN TUMORAL DE LÍNEAS HORMONO-INDEPENDIENTES DE CÁNCER DE MAMA

Berardi, Damián Emilio; Díaz Bessone, María Inés; Flumian, Carolina; Cirigliano, Stefano; Bal De Kier Joffé, Elisa Dora; Urtreger, Alejandro Jorge; Todaro, Laura Beatriz
Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El ATRA ejerce algunos de sus efectos sobre diferenciación celular y la reversión del fenotipo maligno a través de interacciones con isoformas de PKC. Previamente demostramos que el ATRA en combinación con el inhibidor de PKC α (Gö6976) disminuye los niveles del receptor retinoico RAR γ 2, involucrado en proliferación. En este trabajo nos propusimos estudiar el efecto del tratamiento combinado ATRA/Gö6976 sobre: A) el crecimiento *in vitro* e *in vivo* en células tumorales mamarias hormono-independientes, B) la proliferación y auto-renovación del componente stem/progenitor, C) efectos *in vitro* asociados a la motilidad celular. El tratamiento con ATRA/Gö6976 por 96 hs disminuyó el número de células LM38LP y SKBR3 en forma sinérgica respecto de cada tratamiento por separado (test Chou-Talalay IC <0,7). Similares resultados se obtuvieron al analizar la inducción de apoptosis (ensayo de Anexina V). Además, el tratamiento combinado provocó una disminución significativa del crecimiento tumoral *in vivo* de la línea LM38-LP (Volumen tumoral: Control: 710,68 \pm 35mm³; Gö6976: 438,25 \pm 43mm³; ATRA: 454,35 \pm 71mm³; ATRA/Gö6976: 219 \pm 22mm³; p \leq 0,05). El tratamiento combinado redujo el crecimiento de mamoferas LM38-LP (Diámetro a 96hs: Control: 176 \pm 8 μ m; Gö6976: 130 \pm 11 μ m; ATRA: 129 \pm 10 μ m; ATRA/Gö6976: 103 \pm 5 μ m; p \leq 0,05). Sorprendentemente observamos que si bien el tratamiento con ATRA aumentó la auto-renovación como la capacidad clonogénica de las células stem/progenitoras de la línea LM38-LP a través del aumento de RAR γ 2, estos efectos son revertidos en el tratamiento combinado. El efecto sinérgico del tratamiento combinado también fue observado sobre la inhibición de la migración (% de cubrimiento de herida: Control: 80,12 \pm 6,98; ATRA/Gö6976: 20,07 \pm 1,70; p \leq 0,001) y la secreción de MMP2 activa (zimografía). Concluimos que el tratamiento combinado de ATRA con el inhibidor de PKC α , tiene un efecto sinérgico sobre la inhibición de numerosos aspectos vinculados a la progresión tumoral.

130. (283) CTBP1 REPRIME LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN SUPRESOR TUMORAL CLCA2 EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Porretti, Juliana; Massillo, Cintia; Dalton, Nicolás; De Luca, Paola; Moiola, Cristian; De Siervi, Adriana
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Estudios epidemiológicos han determinado que el síndrome metabólico (SM) aumenta la incidencia y la agresividad del cáncer. Previamente, nuestro laboratorio desarrolló un modelo de SM murino administrando una dieta rica en grasa (DG) en forma crónica. En estos animales inyectamos líneas tumorales de próstata controles o que poseen silenciada en forma estable la expresión del coregulador transcripcional CtBP1. Encontramos que la inhibición de la expresión de CtBP1 disminuyó el crecimiento tumoral. Un análisis molecular de los xenotransplantes utilizando microarreglos de expresión identificó un grupo de genes de la vía de señalización olfatoria que aumentan su expresión en ausencia de CtBP1, entre ellos el regulador de los Canales de Cloro Activado por Calcio (CLCA2). CLCA2 es un supresor tumoral que actúa inhibiendo la

transición epitelio-mesenquimal y la invasión. En este trabajo nos propusimos investigar la regulación transcripcional de CLCA2 en el cáncer de próstata. En primer lugar determinamos la expresión de CLCA2 en un panel de líneas tumorales de próstata observando expresión en DU145, PC3 y LNCaP. Utilizando células PC3 que tienen disminuida en forma estable la expresión de CtBP1, validamos los hallazgos del microarreglo demostrando que CtBP1 regula la transcripción de CLCA2. Asimismo, al evaluar la actividad del promotor de CLCA2 mediante construcciones reporteras que presentan largo variable de la región proximal del promotor de CLCA2, determinamos que CtBP1 reprime dicha actividad en líneas tumorales de próstata. En conclusión nuestros resultados sugieren que CLCA2 podría estar involucrado en la regulación del crecimiento y desarrollo tumoral a través de su regulación transcripcional por CtBP1. De esta manera, CLCA2 emerge como un posible biomarcador para el seguimiento y el desarrollo tumoral de próstata en la población de pacientes con SM.

131. (285) IDENTIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE HEMOXIGENASA 1 CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ZNF589

Schuster, Federico¹; Páez, Alejandra V.¹; Anselmino, Nicolás¹; Valacco, Pia²; Nemirovsky, Sergio I.³; Martí, Marcelo³; Cotignola, Javier¹; Vázquez, Elba S.¹; Gueron, Geraldine¹ *Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI TOF (CEQUIBIEM)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³*

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres a nivel mundial y su etiología es desconocida, dificultando la prevención temprana de esta enfermedad. Es ampliamente aceptado que la inflamación aumenta la tumorigénesis del PCa y que un microambiente inflamatorio crónico es un factor decisivo en su progresión. La hemo-oxigenasa 1 (HO-1) ejerce funciones anti-oxidantes y anti-inflamatorias. Previamente documentamos su expresión nuclear en carcinomas prostáticos humanos primarios. En líneas celulares de PCa, la sobre-expresión de esta proteína, indujo su localización nuclear e inhibió la proliferación, migración e invasión y el crecimiento tumoral in vivo. Ensayos de ChIP demostraron que HO-1 se asocia a promotores de genes relevantes en PCa como PSA. Nuestra hipótesis se basa en que HO-1 en el núcleo podría actuar como un co-regulador de la transcripción favoreciendo un fenotipo menos agresivo. Por lo tanto, es clave encontrar los interactores moleculares de HO-1 que sean capaces de cumplir una función reguladora a nivel génico, ya que no posee dominios de unión al ADN. Para abordar este objetivo llevamos a cabo un ensayo de pull-down seguido por análisis por MALDI-TOF/TOF (Ultraflex II), mediante el cual se encontraron, entre otras proteínas candidatas a interactuar, un factor de transcripción de tipo zinc finger (ZNF589), conocidos por su función como represores de la transcripción. Se aislaron extractos proteicos totales y fracciones nucleares y citoplasmáticas de células PC3 tratadas con hemina, inductor farmacológico específico de HO-1 o con vehículo, y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación. Se corroboró la interacción física entre HO-1 y ZNF589 tanto en núcleo como en citoplasma. Estos resultados proveen la primera evidencia de la interacción de HO-1 con un factor de transcripción tipo zinc finger.

132. (292) PARTICIPACIÓN DE PYGO2 EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL, PROGRESIÓN TUMORAL Y METÁSTASIS EN CÁNCER DE MAMA

Rubinstein, Natalia^{1,2}; Saxena, Meera²; Cantu, Claudio³; Konrad, Basler³; Christofori, Gerhard² *Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina¹; Depto.*

de Biomedicina, Universidad de Basilea, Suiza² Instituto Molecular, Universidad de Zurich, Suiza³

El proceso de metástasis contribuye a la mayor tasa de mortalidad relacionada con cáncer de mama en el mundo. La transición epitelio-mesenquimal (EMT) ha sido descrita como un importante facilitador de la metástasis dado que permite que las células epiteliales adquieran características migratorias e invasivas. Pygo2 (Pygo2) fue inicialmente definida como activador transcripcional de la cascada de señalización Wnt/ β cat. Más tarde, Pygo2 fue descrita por su capacidad de unirse a la lisina4 trimetilada de la histona3. Recientemente, esta función ha sido asociada a la acumulación de células madre de mama y a la regulación de la iniciación del tumor de mama inducido por Wnt1. Sin embargo, la participación de Pygo2 en EMT y metástasis aún no ha sido descrita. Para investigar el rol de Pygo2 en EMT, tratamos células NMuMG (E9) con TGF β por 10 días. La expresión de Pygo2 se incrementó en forma moderada y mostro una clara translocación al núcleo durante el estímulo. Además la disminución significativa de la expresión de Pygo2 (siRNA específico) redujo la capacidad de las células E9 en realizar EMT completa post estímulo con TGF β (disminución de Ecaderina y aumento de Fibronectina y Ncaderina). Por otro lado, la disminución significativa de Pygo2 en células tumorales de mama Py2T redujo significativamente su capacidad invasiva y migratoria luego de ser tratadas con TGF β . Mediante la utilización de un modelo tumoral de mama in vivo, en donde se introdujo una mutación en Pygo2 que previene su unión a la histona3 (A342E) en ratones PyMT/FBV, se observó una disminución significativa en la masa tumoral y metástasis pulmonar, comparado con el ratón control expresando Pygo2 salvaje. Finalmente, estos resultados indican que Pygo2 tiene una participación relevante en la tumorigénesis mamaria y su metástasis pulmonar, probablemente a través de la reducción de EMT. Más aun, un estudio más detallado podría revelar a Pygo2 como un atractivo blanco terapéutico en cáncer de mama.

133. (295) IMPLICANCIAS BIOLÓGICAS DE LA INTERACCIÓN ENTRE HO-1 Y EL CO-ACTIVADOR DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS RANBPM, EN LÍNEAS CELULARES DE PCA

Páez, Alejandra¹; Schuster, Federico¹; Giudice, Jimena²; Cotignola, Javier¹; Vázquez, Elba¹; Gueron, Geraldine¹ *Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Baylor College of Medicine, Houston, Texas- USA².*

Hemo-oxigenasa 1 (HO-1), la enzima limitante en la degradación del hemo, cumple una función más allá de su actividad enzimática. Si bien HO-1 se transloca al núcleo en células de cáncer de próstata (PCa), carece de dominios de unión al DNA. Considerando su asociación a genes relevantes en PCa, proponemos que HO-1 es un co-regulador transcripcional que favorece un fenotipo menos agresivo. Mediante un abordaje proteómico, demostramos por primera vez la interacción de HO-1 y Muskelina, una proteína involucrada en la regulación de la morfología y adhesión celular, que además se asocia a RANBPM, un co-activador del receptor de andrógenos (AR). Dado que la inducción de HO-1 en células de PCa no altera los niveles proteicos del AR pero modula la expresión de sus genes blanco, estudiamos la relación entre los niveles de RANBPM y HO-1. Se obtuvieron extractos proteicos de células PC3 tratadas o no con hemina (80 μ M, 24 hs), el inductor farmacológico de HO-1. Mediante Western Blot utilizando un anticuerpo específico, comprobamos que la inducción de HO-1 disminuye los niveles de RANBPM. Además células PC3 tratadas o no con hemina, se fijaron con MeOH 100% y se incubaron con el anticuerpo primario anti-RANBPM y anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 y por microscopía confocal se determinó la fluorescencia total y el porcentaje de células con localización de RANBPM citoplasmática o nuclear. Si bien los resultados avalan la disminución de RANBPM total, es interesante notar que sus niveles nucleares aumentan con hemina. Estos resultados fueron confirmados por inmunoprecipitación con extractos proteicos producto del frac-

cionamiento núcleo-citoplasma. Concluimos que HO-1 podría formar un complejo con RANBPM impidiendo su unión al AR y disminuyendo así la expresión de genes río abajo del receptor.

134. (305) PARTICIPACIÓN DE RSP03 EN EL MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO BASAL DEL EPITELIO MAMARIO MURINO

Tocci, Johanna Melisa; Felcher, Carla María; Goddio, María Victoria; Kordon, Edith Claudia
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Los genes R-spondins (Rspo₃) codifican para proteínas de secreción que modulan las vías de señalización WNT. Están involucrados en el desarrollo embrionario, diferenciación de tejidos, diversas patologías y se los postula como factores de crecimiento de células *stem*. Se determinó que los Rspo₃, en particular Rspo3, aparecen frecuentemente mutados y sobre-expresados en tumores inducidos por el virus del tumor mamario murino (MMTV), lo cual promueve la transformación de células mamarias. Previamente demostramos que Rspo3 puede ser expresado por células mamarias, no infectadas por MMTV, que presentan marcadores basales/mesenquimales. Con estos antecedentes, nos propusimos probar que la población basal del epitelio mamario murino normal, enriquecido en células *stem*, expresa Rspo3. Para ello, se obtuvieron glándulas mamarias de hembras C57/Bl6 vírgenes y se separaron las diferentes poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos por qRT-PCR indican que la subpoblación mesenquimal (Lin⁻/CD24⁻/CD29⁺) y basal enriquecida en *stem* (Lin⁻/CD24⁺/CD29^{hi}) expresan Rspo3, pero no así la población luminal. En líneas celulares tumorales que expresan este factor detectamos su presencia por Western-blot en el medio condicionado (MC). Además, corroboramos que Rspo3 se asocia a la matriz extracelular y/o a la membrana celular, ya que el MC puede ser enriquecido por el tratamiento del cultivo con heparina. Por otro lado, al transfectar células SCg6 de manera estable con un *shRNA* específico, se incrementa la expresión de marcadores epiteliales (como E-cadherina) y disminuyen los mesenquimales (como Vimentina), por análisis de qRT-PCR, y se inhibe la capacidad migratoria de estas células (por "cierre de herida"). Estos resultados sugieren que Rspo3 participaría del mantenimiento de la población mamaria basal y, posiblemente, también de las células *stem* en la mama normal, y su sobre-expresión en la población luminal facilitaría el desarrollo tumoral.

135. (308) PARTICIPACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO EN LA REGULACIÓN DE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA HUMANO

Fletcher, Sabrina¹; Serra, María Florencia²; Coló, Federico³; Dreszman, Rubén⁴; Carón, Rubén²; Calvo, Juan Carlos^{1,5}; Pistone Creydt, Virginia².
Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza²; Instituto de Oncología "Alexander Fleming"³ Clínica de Microcirugía⁴; Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁵

Además de los cambios epigenéticos y genéticos que ocurren en las células epiteliales, la progresión tumoral depende del diálogo bidireccional entre células epiteliales tumorales y células estromales circundantes. En este trabajo continuamos con la identificación de posibles factores solubles y no solubles involucrados en los efectos observados y ya descritos (proliferación, migración y adhesión). Evaluamos: 1) expresión de la metaloproteinasas ADAMTS1, del receptor de adiponectina Adipo-R1, del factor de transcripción NF-κB y de la proteína PARP (reparación de ADN), en células MCF-10A y HBL100 (no tumorales) y MCF-7 e IBH-7 (tumorales) incubadas con medios condicionados (MCs) de explantes de tejido adiposo humano de mamas tumorales (EATH)

y normales (EANh); 2) realizamos inmunohistoquímica (proteoglicano vérsican, proteína de membrana HCAM y Adipo-R1) de los diferentes tejidos adiposos: a) de mamas normales, b) pegado al frente invasivo del tumor, y c) de mamas tumorales pero que se encuentra a unos 2cm del tumor. Utilizamos los MCs luego de 24h de incubación de los EATH (n=9) y EANh (n=6). Incubamos las células con los MCs por 24hs, las lisamos y evaluamos expresión de ADAMTS1, Adipo-R1, NF-κB y PARP por WB. Realizamos cortes de los EATH y EANh incluidos en parafina, y evaluamos la expresión de vérsican, HCAM y Adipo-R1 por inmunohistoquímica. Observamos un aumento de ADAMTS1, NF-κB, PARP (p<0,05) y Adipo-R1 (p<0,01) en las células tumorales MCF-7 e IBH-7 incubadas con MCs-EATH comparado con los MCs-EANh y MC-control. Observamos mayor expresión de vérsican, HCAM y AdipoR1 en los cortes de EATH respecto a los EANh (p<0,05). Para Adipo-R1 observamos un aumento significativo de la expresión en EATH pegado al tumor respecto a EATH alejado 2cm del tumor (p<0,05). Poder caracterizar los factores involucrados en esta interacción nos permitirá, en una etapa posterior, regular la expresión de uno o más de esos factores buscando revertir el comportamiento tumoral.

136. (314) IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL DOMINIO AMINO TERMINAL DE ZEB1 QUE INDUCE LA TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMATOSA (EMT)

Llorens, María Candelaria; Cavallo, Natalia; Cabanillas, Ana María
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET, Depto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox) factor de transcripción involucrado en la diferenciación celular, EMT y metástasis; EMT evento crucial en la progresión del cáncer y el desarrollo embrionario se induce experimentalmente por TGFβ en células epiteliales mamarias de ratón NMuMG. Previamente habíamos informado el efecto inducido por fosforilación por PKC sobre la localización de un fragmento amino terminal de ZEB1 (N-ZEB1). Nuestro objetivo fue caracterizar el rol funcional de dicho fragmento en el proceso de EMT por expresión estable de N-ZEB1 en NMuMG. Las mismas fueron transfectadas con eGFPN-ZEB1 o con el vector de expresión vacío eGFP (control). El análisis por inmunofluorescencia de la expresión de los filamentos de actina y E-cadherina, mostró una marcada disminución de la expresión de E-cadherina así como un marcado cambio de su localización en células N-ZEB1 con respecto a las células control; de la misma manera la distribución cortical de actina fue alterada por la presencia de fibras de estrés. Coincidentemente el ensayo de Western Blot mostró una marcada disminución de la expresión de E-cadherina en las células N-ZEB1 con respecto a las células control; según lo esperado para ZEB1, la expresión de Vimentina no se modificó. La curva de crecimiento mostró una mayor tasa de proliferación en N-ZEB1 con respecto a las células control (P<0,001) y los ensayos de migración revelaron una mayor capacidad migratoria en células N-ZEB1 con respecto al control (P<0,05). Todos estos cambios observados son característicos de células que están atravesando un proceso de EMT, lo cual sugiere que hemos aislado e identificado un fragmento acotado de la región N-terminal de ZEB1 cuya expresión es suficiente para inducir estadios tempranos de EMT en células NMuMG, sin la necesidad de la intervención de TGFβ. Es probable que ZEB1 completo induzca por se el mismo efecto sobre EMT por lo que el estudio de su regulación está íntimamente asociado a la metástasis tumoral.

INMUNOLOGÍA SAI 1

137. (276) SPRAGUE DAWLEY TO WISTAR, A NOVEL COMBINATION TO PERFORM HETEROTOPIC SMALL BOWEL TRANSPLANTATION MODEL IN RATS AND TO STUDY THE ACUTE CELLULAR REJECTION PROCESS.

Stringa, Pablo^{1,2,3}; Lausada, Natalia³; Gambaro, Sabrina²; Cabanne, Ana²; Gondolesi, Gabriel²; Rumbo, Martín¹
*Instituto de Estudios en Inmunología y Fisiopatología (IIFP)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata Argentina*¹ *Instituto de Trasplante Multiorgánico Hospital Universitario Fundación Favaloro Argentina*² *Laboratorio de Trasplantes Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata Argentina*³

Graft rejection (GR) is a major clinical complication in intestinal transplant. Experimental models are essential to better understand GR and establish preventive strategies. Our aim was to optimize a model of heterotopic intestinal transplantation (HIT) in rats to evaluate GR. Four syngeneic HIT (Wistar as donor and recipient) and 4 allogeneic HIT (Sprague Dawley as donor, Wistar as recipient) were performed. Clinical parameters (signs of pain, distress and weight loss) and intestinal graft (ostomy appearance and tightening compatible with GR) were evaluated daily. Animals showing signs of discomfort or tightening of the graft were sacrificed. Graft was sampled at 30 min, 3, 5, 7 days after HIT and at sacrificed for histological analysis. Rejection was diagnosed by the presence of inflammatory cell infiltrate and increased apoptosis/10 intestinal crypts. Syngeneic grafts showed no histologic changes compatible with GR. Ischemia-reperfusion damage (Parks index > 3) was evident at 30 min post HIT. Recipients survived healthy up to 6 months after HIT without grafts abnormalities. Allogeneic recipients showed alterations compared with the syngeneic group. Weight loss and graft tightening at 5 (1/4), 7 (2/3) and 9 (1/1) post-HIT days were diagnosed. Significant differences in graft survival between groups were observed ($p < 0,001$, Log-rank test). Increase in apoptotic cells was observed from post-HIT day 3. Focal lesions compatible with acute cellular GR were present since day 5. However, inflammatory cell infiltrate was not as evident compared to the degree of mucosal changes. Perivascular infiltrate in mesenteric vessels and mucosal epithelial lesions compatible with ischemic damage were observed in the final stages precedent to endpoint. Although Sprague Dawley-Wistar combination has not been used so far in HIT models, results showed here are coincident with other combinations reported in the literature. The optimized model is useful to study immunobiology of intestinal GR.

138. (299) ANTI-D ALLOIMMUNIZATION PRODUCED BY APPARENTLY D NEGATIVE RED BLOOD CELLS

Trucco Boggione, Carolina^{1,2}; Luján Brajovich, Melina^{1,2}; Mattaloni, Stella Maris^{1,2}; Rucci, Angel¹; García Borrás, Silvia¹; Biondi, Claudia¹; Cotorruelo, Carlos^{1,2}
*Area Inmunología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario*¹ *Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER)-Universidad Nacional de Rosario- CONICET*²

The Rh system is highly polymorphic and one of the most clinically significant blood group in transfusion medicine. Reliable routine D typing approaches should be performed to identify some D variants that can cause anti-D alloimmunization upon transfusion. However, extremely weak D expression, termed DEL, may be confound from truly D negative units and used for D negative recipients. The aim of this study was to investigate the molecular basis of the RH locus in a serologically D negative donor whose red blood cells were responsible for anti-D immunization in a D negative patient. The donor's Rh phenotype was performed using monoclonal antibodies and showed the expression of the c, E and e antigens. DNA was initially screened using a multiplex PCR strategy that amplifies intron 4 and the 3' untranslated region of the RHD gene and revealed the presence of a RHD allele. Molecular analyses based on exon scanning, microarray and sequencing allowed the detection of a 46T>C mutation in exon 1 of RHD gene, which produces the W16R change. Further serological characterization confirmed an extremely weak expression of the D antigen. *In silico* 3D structure analysis of the RhD protein showed that the aminoacid change was located in the predictive first transmembrane helix. The introduction of a charged residue in this position is likely to be disruptive giving rise to steric hindrance affecting the

global fold of the RhD polypeptide and altering D expression. To estimate the frequency of this new allele, a screening of 114 D-, C/E+ samples was performed. This mutation was found in 13.2% of the D-, E+ samples only, suggesting that this clinically important variant is associated with E antigen. The high incidence of this DEL allele in our population highlights the importance of genotyping D-, E+ donors to properly detect samples with a diminished D antigen expression to avoid alloimmunization.

139. (68) IDENTIFICATION AND CLINICAL RELEVANCE OF NATURALLY OCCURRING HUMAN CD8+HLA-DR+ REGULATORY T CELLS

Arruivito, Lourdes¹; Payaslian, Florencia¹; Baz, Plácida¹; Podhorzer, Ariel¹; Machicote, Andrés¹; Billordo, Ariel¹; Pandolfi, Julieta¹; Semeniuk, Guillermo²; Arribalzaga, Eduardo²; Fainboim, Leonardo¹
*Laboratorio Inmunogenética, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA*¹ *Servicio de Neumonología, Htal. Lanari, UBA*². *Div. Cirugía Torácica, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA*³

The lack of responsiveness to self and non-self antigens is normally maintained by multiple mechanisms, including the suppressive activities of several T cell subsets. Here, we show that CD8+ T cells from both adult peripheral blood and umbilical cord blood mononuclear cells constitutively expressing HLA-DR represent a natural human CD8+ regulatory T cell subset (Tregs). Their suppressive effect appears to be cell-to-cell contact-dependent and may involve CTLA-4 signaling between neighboring T cells. These Tregs can be expanded *in vitro* and exhibit a suppressive capacity similar to that observed in *ex vivo* CD8+HLA-DR+ T cells. The high frequency of CD8+HLA-DR+ T cells we detected in patients with non-small-cell-lung cancer deserve further work to confirm their putative suppressor effect within the tumor.

140. (161) GABAA RECEPTOR COMPOSITION AND FUNCTION ON CD4+ T CELLS DURING THE DEVELOPMENT OF EAE

Fernández Hurst, Nicolas¹; Samanta Zanetti²; Cecilia Bouzat²; German Roth¹.
*Depto. de Química Biológica, Centro de Investigaciones en Qca. Biológica (CIQUIBIC)-CONICET*¹ *Laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET*²

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model that mimics many of the clinical and pathological features of the human disease, Multiple sclerosis. CD4+ T cells exert a critical role during the induction and development of the disease. In previous studies it was shown that T cells express GABAA receptors and in parallel in our laboratory was demonstrated that the treatment with Diazepam, an allosteric agonist of GABAA receptor, reduced the incidence and clinical signs of EAE. First of all, we evaluated the presence, composition and functionality of GABAA receptors on CD4+ T cells isolated from popliteal lymph nodes of controls and EAE animals. Also the possible non-neuronal cell plasticity phenomenon was investigated in immune cells comparing with brain tissue. The animals were sensitized with myelin in complete Freund's adjuvant (CFA) to induce EAE or CFA alone as control group, and sacrificed during the acute state of the disease (13-14 days post-induction). The mononuclear cells (MNC) were isolated from the draining popliteal lymph nodes and the *in vitro* proliferation induced by anti-CD3 and in presence of GABAA agonists (GABA, Muscimol, Diazepam) was evaluated. GABAA agonists reduced the proliferation of CD4+ T cells ($p < 0,05$). CD4+ T cells were also sorted and lysed in trizol to evaluate the subunit composition of GABAA receptor and a fraction of frontal cortex tissue was obtained for comparison. We observed that CD4+ T cells obtained from EAE animals does not have mRNA for Gamma2 subunit in contrast with CFA animals ($p < 0.05$). We did not find the same difference in frontal cortex. These results indicate that GABAA agonists can modulate the proliferation of CD4+ T cell, and we can also say that during the development of EAE occurs a non-neuronal cell plasticity phenomenon.

141. (238) DELETION OF THREE VIRAL GENES FROM MVA GENOME RELATED WITH HOST IMMUNE RESPONSE EVASION IMPROVED ITS IMMUNOGENICITY BY MODIFYING THE INNATE IMMUNE RESPONSE AND IMPROVING THE SPECIFIC ADAPTIVE RESPONSE AGAINST VV EPITOPES

Holgado, María Pía¹; Maeto, Cynthia¹; Falivene, Juliana¹; Del Medico Zajac, María Paula²; Calamante, Gabriela²; Gherardi, María Magdalena¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas em Retrovirus y SIDA (INBIRS)- Universidad de Buenos Aires¹ Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA)-INTA Castelar²

Modified Vaccinia Ankara (MVA) still keeps genes involved in host immune response evasion. Previously we reported the optimization of MVA vaccine potential after deleting the C12L gene coding an IL18 binding protein. Here we study the immunogenicity of MVA vectors harboring a simultaneous deletion of two viral genes: A44L, involved in synthesis of steroid hormones and A46R, which inhibit transduction signals from TLR receptors (MVA Δ A44L-A46R:MVA Δ); or with an additional deletion: C12L (MVA Δ C12L/ Δ A44L-A46R:MVA Δ). C57Bl/6 mice were intramuscularly immunized with MVAwt or deleted MVAs (Δ MVAs). We evaluated the adaptive T cell response to VV (Vaccinia Virus) epitopes at acute (7dpi) and memory phases (45dpi) in spleen and draining lymph nodes. The amount of IFN γ and IL2 producing cells was measured by ELISPOT. Percentage of cytotoxic CD8-T cells was analyzed by flow cytometry as well as memory T cell responses among proliferating T cells. To study the innate response, inflammatory cytokines were quantified by ELISA after 4, 20 and 30 hours post-immunization (hpi). Compared with MVAwt at 7dpi both Δ MVAs induced significant increases in the IFN γ anti-VV CD8 and CD4-T cells, and IL2 anti-VV CD8-T cells. Importantly, these increments were maintained at 45dpi, thus proliferating anti-VV T-cells were augmented from 3% (MVAwt) to 6% (MVA Δ) for CD8-T cells, and 1% to 7% for CD4-T cells. Moreover, this vector elicited a higher proportion of specific CD8-T_{CM} (37%) and T_{EM} (25%) compared to MVAwt (T_{CM}:20%, T_{EM}:11%) as well as for CD4-T cells (T_{CM}:37%, T_{EM}:16% and T_{CM}:8%, T_{EM}:2% respectively). Also, Δ MVAs induced a higher percentage of specific cytotoxic/IFN γ CD8-T cells than MVAwt. The innate response analysis showed that MVA Δ yield higher levels of IFN γ and IL12 at 20 and 30 hpi compared to MVAwt. Simultaneous deletion of specific viral genes from the MVA genome with related functions as A46R and C12L, is an adequate strategy to improve the vaccine potential of this vector.

142. (266) EFFECTS OF SKIN ULTRAVIOLET LIGHT EXPOSURE ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS CUTANEOUS INFECTION

Cela, Eliana¹; González, Cintia²; Friedrich, Adrián¹; Ledo, Camila²; Leoni, Juliana¹; Gómez, Marisa²; González Maglio, Daniel¹

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)- CONICET-UBA¹ Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM), UBA-CONICET.²

It is well known that ultraviolet radiation (UVR) leads to immunosuppression, inhibiting contact hypersensitivity (CHS) reactions. However, the way UVR modulates immune responses against microorganisms has been poorly explored. Considering that *Staphylococcus aureus* (SA) causes skin infections and this organ is the main target of UVR, our aim was to evaluate if UVR can modulate the host response to SA infection. We compared 2 types of exposures: a single high UV dose (shUVd - 400 mJ/cm²), simulating a harmful exposure vs. repetitive low UV doses (rUVd - 4 consecutive days, 20 mJ/cm²), simulating daily exposures. Previously, we have found that shUVd promotes skin inflammation while it diminishes CHS reaction, in contrast to rUVd that does not induce inflammation and increases CHS response. SKH:1 hairless mice (n=6) were irradiated and 24h later were inoculated with SA strain LAC (1x10⁷ CFU). Non-irradiated mice were used as control (C). The infection was monitored by measuring the

abscess size and mice weight daily. Six days p.i., mice were bled and sacrificed. Skin abscess and spleen were removed and homogenized to perform bacterial counts. Specific cell responses were determined *in vitro* stimulating spleen cells with 1x10⁷ CFU/well of heat killed bacteria. Finally, the titer of specific IgG was determined in sera samples. No differences in weight, abscess size and bacterial counts were found. shUVd mice did not show differences in the dissemination of bacteria or in spleen cells proliferative response, whereas they produced higher titers of specific IgG (p<0,05 vs C). Contrariwise, rUVd mice showed a marked increase in the dissemination of bacteria (p<0,05 vs C) and specific proliferative responses (p<0,05 vs C), but did not present differences in specific IgG titers. These results show that UVR may modulate SA skin infection, depending on the type of exposure. To our knowledge, this is the first report evaluating the relationship among UVR, infection and immunity.

143. (117) THE POTENTIAL INVOLVEMENT OF LPS IN THE MAINTENANCE OF A TH1/CITOTOXIC BIASED RESPONSE IN NAFLD

Inzaugarat, María Eugenia¹; Alegre, Nadia Soledad¹; García, Cecilia C¹; Ferro, Florencia¹; Billordo, Luis Ariel¹; Romeo, Juan Manuel²; Sarotto, Luis²; Romero, Gustavo²; Cherñavsky, Alejandra Claudia¹

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ Unidad de Gastroenterología, Hospital General de Agudos "JM Ramos Mejía"² Servicio de Urgencias, Hospital de Clínicas "José de San Martín"² Hepatología, Hospital de Gastroenterología "Dr. CB Udaondo", Buenos Aires, Argentina⁴

Toll-like receptor (TLR)-4 which recognizes lipopolysaccharide (LPS) has recently been identified on certain T cell subsets including activated and memory T cells. We have previously demonstrated a characteristic Th1/T cytotoxic profile of peripheral T cells in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Based on the hypothesis that LPS might modulate T cell response, we aimed to evaluate TLR4 expression in peripheral central and effector memory T cell and in hepatic lymphocytes in NAFLD patients. Also, to analyze the activating role of LPS on CD4 and CD8 peripheral T cells. Patients and Methods: Blood and liver biopsies were obtained from adult patients with NAFLD (NAFLD, n=15) and metabolically healthy individuals (Co, n=15). PBMC were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient. CD3+ or CD45RO cells were further obtained from PBMC by negative selection utilizing immunobeads. The CD3+ fraction was stimulated with soluble anti-CD3 [500ng/ml]± LPS[1µg/ml] for 72 hours. CD3+, CD45RO cells or liver cell suspensions were stained with anti-CD4 or -CD8/anti-CCR7/anti -TLR4 mAbs and analyzed by Flow Cytometry. ELISA test was performed according to manufacturer protocol. Mann-Whitney test was used. Results: NAFLD patients showed increased%TLR4 CCR7- CD4+ and CD8+ cells (p=0.02 y p=0.02, respectively) while%TLR4 CCR7+ CD4+ and CD8+ cells were similar to Co. No differences were found in Median Fluorescence Intensity for TLR4 expression in CD4+ and CD8+ between NAFLD and Co. NAFLD patients showed increased hepatic% CD4+ TLR4+ and CD8+TLR4+ cells (p=0.02 y p=0.02, vs. control liver). LPS stimulation of CD3+ cells showed a trend to upregulate%CD4+TLR4+ and CD8+ TLR4+ cells and IFN-g production in NAFLD patients. Conclusions: The increased plasma levels of LPS usually present in NAFLD patients together with the overall higher expression of TLR4 observed in periphery and liver suggest that LPS can contribute to peripheral Th1/Cytotoxic T cell pool maintenance.

144. (796) DUAL ROLES OF GALECTIN-1 IN B CELL SURVIVAL AND PROLIFERATION

Martínez Allo, Verónica; Cutine, Anabela; Rabinovich, Gabriel A.; Toscano, Marta A.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)- CONICET

During the past years, galectins, a family of glycan-binding proteins, have been implicated in several biological processes as

regulators of the immune system. Particularly, galectin-1 (Gal1) has been implicated in the regulation of B cell physiology. In chronic lymphocytic leukemia B cells, Croci and colleagues found that, in the presence of Gal1, suboptimal concentrations of anti-IgM can fully activate the BCR signaling affecting survival, proliferation and trafficking of these cells. Based on these findings, we studied the role of Gal1 and its specific glycans in the survival and proliferation of normal B cells in the spleen. We found that recombinant Gal1 diminished B cell survival *in vitro* not only in purified B cells but also in splenocytes cultures. In addition, we observed a higher percentage of surviving B cells in cultures from mice deficient in Gal1 (*Lgals1*^{-/-}) compared to WT mice (P<0,05). We also found that *Lgals1*^{-/-} mice have higher number and frequency of B220⁺ cells in the spleen than WT mice (P<0,05). However, we could find no significant differences in the transitional 1, transitional 2, marginal zone B cells, follicular B cells and B10 subpopulations. When we studied B cell responses *in vitro* we found that, although *Lgals1*^{-/-} and WT B cells have similar activation markers, *Lgals1*^{-/-} B cells showed reduced proliferation in response to different stimuli, indicating a contribution of Gal1 to B cell proliferation (P<0,05). These results suggest that Gal1 has a dual role during B cell life cycle decreasing B cell survival shortly after exposure and promoting B cell proliferation in later periods. This effect could be caused by differential ligand binding and reduction in the activation threshold of the BCR as previously suggested for the pre-BCR synapse formation and other receptor-ligand systems.

145. (1) OUTBREAK MDR STRAINS OF *M. TUBERCULOSIS* (MTB) INDUCE DIFFERENTIAL TNF-ALPHA SECRETION BY MACROPHAGES ALTERING CD54 EXPRESSION ON BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS

Kviatcovsky, Denise¹; Balboa, Luciana¹; Schierloh, Pablo¹; López, Beatriz²; Sasiain, María Del Carmen¹; De La Barrera, Silvia¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET¹ ANLIS-Malbrán²

Mtb infects mainly the lung by interacting with airway epithelium and resident macrophages (Mac). The bronchial epithelium secretes cytokines (CKs) upon interaction with *Mtb* or infected Mac. We have previously demonstrated that certain soluble factors released by Mac stimulated with MDR strains, M and Ra differentially modulate CD54 expression in the human bronchial epithelial cell line Calu-6. Thus, the aim of this work was to identify those soluble factors involved in CD54 regulation in airway epithelial cells. To do so, monocytes-derived Mac from healthy donors were stimulated with M, Ra or H37Rv strains for 6h at *Mtb*:Mac 1:2 or 1:5 ratios and TNF-alpha levels were determined by FACS and ELISA. In addition, Calu-6 cells were co-cultured with Mac or stimulated Mac-derived supernatants (Mac-SN) and CD54 expression was evaluated. To confirm the role of CKs on CD54 modulation, Calu-6 cells were treated with Mac-SN in the presence of a synthetic soluble TNF-alpha receptor (Etanercept) and/or anti-IL-1beta monoclonal antibody. Results: 1) M-stimulated Mac produced lower levels of released (n=7) or intracellular (n=9) TNF-alpha than H37Rv-stimulated Mac (p<0,05); 2) CD54 expression on Calu-6 cells was enhanced either by co-culturing with H37Rv- or Ra-stimulated Mac (p<0,05, n=6) or with its Mac-SN (p<0,05, n=7) unlike M strain. 3) This increase of CD54 expression on Calu-6 triggered by H37Rv- or Ra-stimulated Mac-SN could be inhibited by TNF-alpha neutralization but not by IL-1beta neutralization. Conclusion: CD54 modulation on bronchial epithelial cells could be mediated by early TNF-alpha release in *Mtb* stimulated Mac. Lack of CD54 up-regulation by M strain could be due to a deficient TNF-alpha production by Mac, being probably a new evasion mechanism employed by this strain to avoid adhesion/infiltration of immune-competent cells to pulmonary epithelium and their further activation, a necessary fact to control *Mtb* infection.

146. (17) IMMUNE PROTECTION AGAINST *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION: EFFICACY OF TWO NEW GENERATION ADJUVANTS TO FORMULATE A SUBUNIT VACCINE WITH TRANS-SIALIDASE ANTIGEN

Bontempi, Iván¹; Cabrera, Gabriel¹; Vicco, Miguel¹; Bertona, Daiana³; Villar, Silvina²; Gonzalez, Florencia²; Pujato, Nazarena¹; Nicastro, Alcides³; Pérez, Ana²; Marcipar, Iván¹
Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad del Litoral¹ Instituto de Inmunología Clínica y Experimental (IDICER)-CONICET-UNR² LIPOMIZE, Parque Tecnológico, Santa Fe³

New generations adjuvants are able to enhance the efficacy of recombinant protein vaccines which are considered to be the safer ones but which typically promotes weak immune responses. ISCOMATRIX (IMX) is a particularly special adjuvant as it has shown to be effective and safe in human clinical trials of vaccines designed to control intracellular infections by promoting a CTL response. Therefore, as a first step we assessed the immune protection achieved using this adjuvant to formulate mutant inactive transsialidase (mTS), previously proven to be highly protective against *T. cruzi* infection. Mice were immunized with mTS-IMX, mTS-IFA (IFA, incomplete Freund adjuvant), mTS (without adjuvant), IMX (without antigen) and PBS. mTS-IMX showed a TS-specific IgG response with titers >10⁶ and high avidity, an increased IgG2a/IgG1 ratio, significant delayed-type hypersensitivity (DTH) reactivity and a balanced IFN-g and IL-10 production, compared to mice immunized with mTS or IMX in PBS or vehicle (PBS) (p<0.01, mTS vs PBS and others groups; Mann Withney test). When these mice were challenged with 1000 *T. cruzi*, all mTS-IMX immunized mice survived, while mice immunized with mTS alone, IMX or PBS displayed high mortality (p<0,05; mTS vs PBS; Mantel Cox test). Remarkably, compared to the non-immunized mice, mTS-IMX immunized mice had ~50 times less parasitemia during acute infection and presented ~4.5 times lower parasite load in heart-tissue (p<0.01, mTS-IMX vs PBS; Mann Withney test), associated with decreased inflammatory infiltrate and lesions, both in the acute and the chronic phase. As a second step, a new assessment was proven with mTS and an adjuvant made in our lab based on IMX composition (ISPA). This new formulation gave comparable high values of antibodies titers, DTH, survivor and low levels of parasitemia with mTS-IMX (p>0.01, mTS-IMX vs mTS-ISPA; Mann Withney test). These results indicate that subunit vaccines may achieve immune protection against *T. cruzi*.

147. (18) CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL GENERADA POR LA INMUNIZACIÓN CON UNA VACUNA MULTICOMPONENTE PARA EL CONTROL DE MASTITIS BOVINA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Renna, María Sol^{1,2}; Sacco, Sofía Clara^{1,2}; Pereyra, Elizabeth Amanda Lorena^{1,2}; Baravalle, Celina^{1,2}; Camussone, María Cecilia^{3,4}; Pujato, Nazarena^{3,5}; Dallard, Bibiana Elisabet^{1,2}; Calvino, Luis Fernando^{4,6}
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-LITORAL)-CONICET¹ Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL² CONICET³ Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA⁴ Laboratorio de Tecnología Inmunológica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL⁵ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina⁶

Los programas de control de la mastitis bovina que se aplican actualmente, no siempre resultan efectivos para prevenir las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, por lo cual es necesario recurrir a la aplicación de inmunógenos como medida de control complementaria. En el presente trabajo se propuso caracterizar la respuesta inmune humoral generada durante la inmunización con una vacuna multicomponente contra mastitis bovina causada por *S. aureus*. Se inmunizaron 2 grupos de 4 vaquillonas Holstein preñadas con un lisado de la cepa *Reynolds* de *S. aureus* más el agregado de las proteínas recombinantes *clumping factor*(Clf) A, proteína de unión a fibronectina (FnBP) A y toxina beta(I-tox) de *S. aureus*(grupo L+R), o con solución salina(grupo control). Ambos inóculos fueron formulados con ISCOM Matrix como adyuvante. Se administraron dos dosis, 45 y 15 días antes del parto. Los niveles

de IgG total, IgG₁ e IgG₂ en sangre y leche se evaluaron mediante ELISA indirecto. En los animales del grupo L+R se detectaron mayores niveles de IgG total, IgG₁ e IgG₂ en suero de sangre y leche respecto del grupo control ($p < 0,05$) al día 7, 14 y 21 post parto (pp). Los niveles de IgG total e IgG₁ (esta última solamente en leche) se vieron influenciados por el tiempo de muestreo, siendo al día 7 pp donde se obtuvieron los mayores niveles ($p < 0,05$). Por otro lado, los sueros de sangre y leche del grupo L+R disminuyeron *in vitro* la internalización de *S. aureus* en una línea celular epitelial mamaria comparado con sueros de animales controles de manera dependiente de la concentración de los mismos. Estos resultados demuestran que la inmunización con una vacuna multicomponente fue capaz de inducir una fuerte respuesta inmune humoral, lo cual podría contribuir al control de la infección por *S. aureus*. Asimismo, la disminución en el proceso de adherencia-invasión a la célula epitelial mamaria podría evitar en etapas tempranas del proceso infeccioso la colonización por parte de la bacteria.

148. (84) TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION IS A POTENT RISK FACTOR FOR NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS ENHANCING LOCAL AND SYSTEMIC INFLAMMATION ASSOCIATED WITH STRONG OXIDATIVE STRESS AND METABOLIC DISORDERS

Onofrio, Luisina I¹; Arocena, Alfredo R¹; Paroli, Augusto F¹; Cabalen, María E²; Andrada, Marta C²; Cano, Roxana C^{1,2}; Gea, Susana¹

Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas-UNC¹ Facultad de Ciencias Químicas UA Area CS.AGR.ING.BIO Y S CONICET. Universidad Católica de Córdoba²

Chagas disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is an important cause of heart disease in endemic areas of Latin America but the person migrations have favored its spreading in non-endemic countries. Parasite persistence eventually results in severe complications in the cardiac and gastrointestinal tissues although this protozoan also infects the liver and the spleen. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) constitutes a prominent health concern with increasing incidence of obesity and diabetes in the world and is characterized by the presence of steatosis, inflammation and hepatocyte injury. The immune mechanisms underlying in experimental steatohepatitis and more interestingly the effect of *T. cruzi* chronic infection on the pathogenesis of this metabolic disorder are not completely understood. In our laboratory we developed a physiological model of NASH. ♂ mice C57BL/6 WT and TLR4^{-/-} (n=6/group) were fed for 24 weeks with: LFD, low fat diet (3% fat) as control group; MFD, medium fat diet (14% fat); I+LFD and I+MFD. The infected groups (I) received i.p. 100 trypomastigotes (Tulahuén). We demonstrated that MFD by itself is able to induce NASH in WT mice and parasitic infection induced marked metabolic changes with body weight ($p < 0,001$ MFD vs. I+MFD) and steatosis reduction. It also improved insulin resistance evaluated by HOMA-IR but parasite infection increased the plasma triglycerides and cholesterol levels. Liver M1 inflammatory macrophages and cytotoxic T cells purified from intrahepatic leukocytes (IHLs) were significantly elevated in all experimental groups and showed intracellular inflammatory cytokines which were associated with high levels of plasma IL6, IFN γ and IL17 inflammatory cytokines and CCL2 chemokine ($p < 0,01$). The recruitment of hepatic B lymphocytes, NK and dendritic cells was enhanced by MFD and it was intensified by parasitic infection. These results were TLR4 signaling dependent. The reactive oxygen species and peroxinitrites produced by IHLs and FASL expression in MFD group were also exacerbated by parasite infection. Our results suggest a synergic effect between damage associated with molecular patterns generated during NASH and parasitic infection revealing an intense cross-talk between metabolically active tissues such as liver and the immune system. Thus, *T. cruzi* infection must be considered as an additional risk factor since exacerbate the inflammation and accelerate the development of hepatic injury.

149. (165) SUBCUTANEOUS DELIVERY OF A BACTERIAL PROTEASE INHIBITOR IN A VACCINE FORMULATION

INCREASES THE HALF LIFE OF ANTIGEN INSIDE DCS AND ENHANCES IMMUNE RESPONSES

Coria, Lorena¹; Ibañez, Andrés¹; Pasquevich, Karina¹; Bruno, Laura¹; Carabajal, Marianela¹; Risso, Gabriela¹; González Cobiello, Paula²; Frank, María Fernanda²; Casataro, Juliana¹

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB). Universidad de San Martín. CONICET¹ Instituto de Investigación en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET-UBA²

Previous results demonstrated that a *Brucella* spp. protein (Bp) is a broad spectrum protease inhibitor as it can inhibit proteases present in the stomach and gut (mostly serine proteases) and also lysosomal proteases (cysteine proteases). Moreover, subcutaneous co-administration of Bp as adjuvant and ovalbumin (OVA) as model antigen (Ag) induces OVA specific IFN- γ producing CD8⁺ T cells and cytotoxic T cells in mice. In this work we characterized the mechanism of inhibition of Bp on cysteine proteases using a specific fluorogenic substrate for cathepsin L. We have found that Bp has a competitive mechanism of inhibition of cathepsin L with an inhibition constant in the μ M range. We also found that Bp increases the amount of the co-administered Ag inside Lamp2⁺ compartments in dendritic cells (DCs) by confocal microscopy ($P < 0,05$). This result indicates that Bp is able to increase the Ag half life inside lysosomes promoting Ag storage inside DCs that enhance its presentation to T cells. We also studied Bp's inflammatory properties when used as an adjuvant. Bp increased the recruitment of antigen presenting cells to draining lymph nodes after its subcutaneous administration ($P < 0,01$). Furthermore, Bp induced the up-regulation of co-stimulatory molecules and secretion of pro-inflammatory cytokines from BMDCs ($P < 0,001$) indicating it can activate DCs. Finally, the adjuvant capacity of Bp in vaccine formulations using real microbial derived Ags was studied using a whole homogenate of *Trypanozoma cruzi* parasites (WH). Subcutaneous co-administration of Bp with WH reduced parasite loads and increased survival after *T. cruzi* infection in mice ($P < 0,05$). Altogether, these results indicate that Bp behaves as an ideal component in vaccine formulations against infectious diseases.

150. (172) STAPHYLOCOCCUS AUREUS SBI AND SPA PROTEINS ARE IMPORTANT FOR HOST-CONTROL OF EARLY SKIN INFECTIONS

González, Cintia Daniela; Ledo, Camila; Gómez, Marisa I. *Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET-UBA*

Staphylococcus aureus is an important human pathogen that causes infections with high morbidity and mortality. The protein A (SpA) and the Staphylococcal binding immunoglobulin protein (Sbi) are strong evasion factors. In addition, we have demonstrated their ability to induce the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines *in vitro* and *in vivo*. This study was aimed at elucidating the contribution of SpA and Sbi to the development of abscess in a model of skin infection, in which an appropriate inflammatory response is known to be required to contain the bacteria. Mice were inoculated by subcutaneous route with 1×10^8 CFU of *S. aureus* strain Newman or the isogenic mutants that do not express Sbi (Sbi⁻), SpA (SpA⁻) or both (SpA-Sbi⁻). *S. aureus* caused abscesses with a median area of 0.70 cm^2 (min 0.35 ; max 1.09), and a bacterial burden of 3.5×10^7 CFU (min 8×10^6 ; max 2.4×10^8) at day three after inoculation. Bacterial dissemination to the lung, spleen, liver and kidney was observed in more than 64% percent of the animals. The bacterial burden in the abscesses induced by the Sbi⁻ mutant was significantly higher than that observed in *S. aureus* inoculated mice ($p < 0,05$). The areas of the abscesses induced by SpA⁻ and the SpA-Sbi⁻ mutant were significantly bigger than those evoked by *S. aureus* and the Sbi⁻ mutant ($p < 0,01$). The bacterial burden was significantly higher than that observed after *S. aureus* challenge ($p < 0,05$) and similar to that observed in mice inoculated with the Sbi⁻ mutant. No differences were found in distal organ colonization among the strains evaluated. These results suggest that in the skin infection model evaluated, SpA and Sbi may play

an important role not only in limiting the size of the lesion but also contributing to early bacterial eradication in the local foci. Future work evaluating the evolution and potential resolution of the abscesses will allow a better understanding of the role of these proteins in staphylococcal skin infections.

151. (239) FUNCTIONAL EVALUATION OF THE HUMORAL RESPONSE OBTAINED WITH A MULTICOMPONENT VACCINE AGAINST BOVINE MASTITIS CAUSED BY STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Pujato, Nazarena¹; Camussone, Cecilia²; Renna, Mara Sol³; Calvino, Luis²; Marcipar, Iván¹
*Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*¹ *Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA*² *Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL*³

Bovine mastitis is the major cause of economical losses for dairy producers and industry, being *Staphylococcus aureus* the most prevalent pathogen causing mastitis in Argentina. A tempting strategy to fight against staphylococcal mastitis is cattle vaccination, but any of the numerous vaccines attempts could afford protection against new infections. Researchers have agreed that an effective staphylococcal vaccine would be a multicomponent one inducing IgG2 response in blood and milk. The aim of this study is to develop a vaccine against staphylococcal mastitis, based on different promising candidates involved in different phases of *S. aureus* infection, obtained by DNA recombinant technology: adhesin clumping factor A (ClfA) and fibronectin binding protein A (FnBPA) and the hemolysin β -toxin. The formulation of these antigens with ISCOMmatrix™ adjuvant was named VacR1. Dairy cattle were inoculated with two supra-mammary doses of VacR1 or PBS at days -45 and -15 before calving. ELISAs assays were performed to determine total IgG and IgG2 responses in serum and milk samples. Antibodies functionality was evaluated by β -toxin hemolysis assays, fibronectin and fibrinogen binding assays, phagocytosis and mammary epithelial cells (MAC-T) adherence. VacR1 induced a strong humoral response both in blood and milk ($p < 0.05$, compared with the control). IgG2 titers were also increased in blood in relation to control group ($p < 0.05$). Serum samples inhibited 60% of β -toxin hemolysis ($p < 0.05$), 86% of Fn binding ($p < 0.05$), 80% Fg binding ($p < 0.05$) and contributed to bacteria phagocytosis by bovine PMN ($p < 0.05$). Finally, blood and milk antibodies decreased bacteria adherence to MAC-T in magnitudes of 20% and 80% respectively ($p < 0.05$). In conclusion, VacR1 provided a robust humoral response in dairy cattle being a promising vaccine candidate against *S. aureus* bovine mastitis. In vivo efficacy studies remain to be done to determine if VacR1 provide protection against bacteria.

152. (240) LA DERMATOFITOSIS EXPERIMENTAL CON MICROSPORIUM CANIS INDUCE UNA RESPUESTA TH17

Burstein, Verónica
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Microsporium canis es un hongo dermatofito que infecta la epidermis de individuos sanos. No se han reportado modelos experimentales murinos de infección cutánea por *M. canis* y se desconocen los mecanismos de inmunidad protectora. Particularmente, no hay estudios sobre la función de las células de Langerhans (LC) en la generación de la respuesta inmune antidermatofítica. Los objetivos de este trabajo fueron: (A) Analizar las poblaciones de células T que predominan en los nódulos linfáticos durante la dermatofitosis experimental en ratones C57BL/6. (B) Determinar, *in vitro*, la capacidad de LC estimuladas con *M. canis* para inducir la activación de linfocitos T. (A) Se estandarizó la infección epicutánea de ratones C57BL/6 con la cepa UNCMc01. A partir del día 4 post-infección se observaron lesiones compatibles con dermatofitosis. Al día 9 p.i., los animales fueron sacrificados y la histopatología reveló hifas en epidermis con un infiltrado inflamatorio de neutrófilos en la dermis. La respuesta de DTH frente a *M. canis* muerto por calor (HKMc) fue positiva en los ratones infectados, respecto a controles ($p < 0.008$). *Ex vivo*, la estimulación

específica con HKMc, reveló un incremento significativo en la producción de IL-17 ($P < 0,05$) por linfocitos de nódulos linfáticos drenantes de los animales infectados, respecto a los controles (por ELISA). Por otra parte, se realizó un cultivo de las hojas de epidermis enteras, en ausencia o presencia de *M. canis* y a las 72 hs. se purificaron las LC a partir de células migrantes. Las LC preincubadas con el hongo mostraron un incremento significativo en la expresión de MHC-II ($p < 0,05$) y de CD40 ($p < 0,05$) (por citometría de flujo); e indujeron la producción de IL-17 ($p < 0,05$) por células mononucleares de bazo alogénicas, respecto a los controles. Estos datos sugieren que en la infección cutánea de ratones C57BL/6 con *M. canis* predomina un perfil Th17 y que las LC participarían en la generación de esta respuesta.

153. (245) CATHEPSIN L3 FROM FASCIOLA HEPATICA INDUCES IL-6 AND IL-10 PRODUCTION IN MURINE DENDRITIC CELLS THROUGH THE TOLL-LIKE RECEPTOR 4 SIGNALING

Celias, Daiana Pamela¹; Corvo, Ileana²; Tort, José²; Silvanne, Leonardo¹; Motrán, Cristina¹; Cervi, Laura¹
*Facultad de Ciencias Químicas. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI) CONICET-UNC*¹. *Depto. de Genética, Facultad de Medicina. Universidad de la República, Uruguay*²

During its migration through host tissue, the helminth parasite *F. hepatica*, excrete-secrete a number of products among which are cathepsins. These enzymes belong to the family of cysteine-proteases that are essential for survival and colonization of the parasite. While Cathepsin L1 is mainly secreted by adult parasites, Cathepsin L3 (CL3) is released by juvenile worms. Recently, it has been described a collagenolytic activity of this enzyme, which may be relevant in the parasite's ability to cross the intestinal wall, thus continuing with its life cycle in the host. However, there is no information about the interaction of this protein with immune cells system. Playing dendritic cells (DC) a key role for sensing antigens and inducing different adaptive responses, the aim of this work was to investigate the ability of CL3 to modulate the murine DC maturation and its interaction with TLR receptors. Bone marrow-derived DC from mice C57BL/6 mice were differentiated with GM-CSF factor and cultured for 18 h with recombinant CL3, produced in *Hansenula polymorpha*. After this time, CL3 didn't show cytotoxic activity on DC compared to untreated DC (Student's test $p = NS$), by cell viability assay with MTT 3 (4,5-di-methyl-thiazol-2-yl)-2,5-di-phenyl tetrazoliumbromide. We also demonstrated that CL3 increases the levels of IL-6 and IL-10 (Student test, $p < 0,05$) and in lower levels of IL-12p70 production, compared to untreated DC determined by ELISA test. Using DC from TLR4 deficient mice, we observed that IL-6 and IL-10 production induced by CL3 was completely abrogated, while IL12p70 production didn't change compared to DC from wild type mice. This effect was not found with DC from TLR2 deficient mice. These results are the first report showing the ability of CL3, a highly expressed protein in excretory-secretory products of juvenile *F. hepatica* larva, to interact with TLR4 in DC, increasing IL-6 and IL-10 production, which could influence the development of the adaptive immune response.

154. (247) STAPHYLOCOCCUS AUREUS INDUCES EXPANSION OF MYELOID SUPPRESSOR CELLS (MDSC)

Ledo, Camila; Mendoza Bertelli, Andrea; Gómez, Marisa Inés
Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM) UBA-CONICET

Systemic infections caused by *Staphylococcus aureus* are a public health concern due to their high morbidity and mortality. Among them, bacterial sepsis is characterized by an initial period of a large inflammatory response which is followed by a period of immunosuppression in which the highest mortality is observed. Among the biological processes that may be involved in the switch to the immunosuppression phase, recent studies suggest that the accumulation of myeloid suppressor cells (MDSC) in lymphoid organs as well as their presence in circulation may play an important

role due to their capacity to suppress T cell responses. Since *S. aureus* is a potent inducer of TNF- α and IL-6 and considering the relevance of these cytokines in the expansion and activation of MDSC, it is possible to hypothesize that *S. aureus* could induce the expansion of this myeloid population. To demonstrate this hypothesis, groups of mice were inoculated by intraperitoneal route with a sub-lethal dose (4×10^7 CFU) of *S. aureus*. The presence of bacteria in blood as well as spleen, lung, liver and kidney colonization were observed until day 8 post-inoculation. A significant increase in the levels of circulating IL-6 was observed at 4 and 6 hours post-inoculation ($p < 0,001$, Student *t* Test). A significant increase in the accumulation of MDSC, defined as CD11b⁺Gr1⁺, cells was observed in spleen and bone marrow at day 4 post-inoculation ($p < 0,01$, $p < 0,05$) and in the spleen at day 8 post-inoculation ($p < 0,05$) compared to the percentages found in control animals. CD11b⁺Gr1⁺ cells were not found in the inguinal lymph nodes at any of the times evaluated. MDSC found in the spleen at day 8 post-inoculation were purified and a heterogeneous population of immature cells with a prevalence of granulocytic morphology was observed by Giemsa staining. The present results demonstrate the ability of *S. aureus* to promote MDSC expansion during the course of systemic infection.

155. (269) PROTECTIVE IMMUNE RESPONSE INDUCED BY YERSINIA ENTEROCOLITICA DEFICIENT IN YOPH

Dave, Mabel Noemí; Silva, Juan E; Goriño, Carolina V; Di Genaro, María S

Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas-San Luis (IMBIO-SL). CONICET-UNS

Yersinia outer protein H (YopH) is a powerful protein-tyrosin phosphatase that contributes to *Yersinia enterocolitica* (*Ye*) evasion. Previously, it has been demonstrated that *Ye* deficient in YopH (*Ye DyopH*) is attenuated in mice. However, the immune response induced by this mutant is unknown. The objective was to demonstrate whether previous *Ye DyopH* infection trigger a protective immune response against a consequent *Ye* wild-type or *Salmonella enterica* (*Se*) infection. For this purpose, C57BL/6 wild-type mice were orally infected with $1-5 \times 10^8$ *Ye DyopH* or they received saline (control). At day 14, the mice were challenged with *Ye* WA-314 (*Ye* wild-type) or *Se*. Survival, weight loss, clinical score and the colony forming units (CFU) number in Peyer's patches (PP), mesenteric lymph nodes (MLN) and spleen at day 7 after challenge were determined. Cellular recruitment in PP at day 3 after *Ye DyopH* or *Ye* WA-314 infection were analyzed by flow cytometry. We observed that *Ye DyopH* infection induced significant increase in the survival (100% vs 60%, $p < 0,05$ compared with control group) and weight ($p < 0,001$) after *Ye* challenge. A significant bacterial clearance in PP, MLN and spleen were observed after both *Ye* or *Se* challenge ($p < 0,001$ and $p < 0,01$, respectively). Increased neutrophil recruitment was observed after *Ye DyopH* infection ($p < 0,001$, compared with *Ye* WA-314 infection). This recruitment was independent of IL-17 as we did not observe differences in *Ye DyopH* infected *IL-17R^{-/-}* mice. We conclude that *Ye DyopH* induce a protective immune response and an improved neutrophil recruitment might be involved in this response.

156. (359) LEUKOTRIENE C4 INCREASES THE SUSCEPTIBILITY OF ADULT MICE TO ENTEROHEMORRAGIC ESCHERICHIA COLI INFECTION

Cabrera, Gabriel¹; Fernández-Brando, Romina Jimena¹; Mejías, María Pilar¹; Ramos, María Victoria¹; Abrey-Recalde, Jimena¹; Vanzulli, Silvia²; Vermeulen, Mónica¹; Palermo, Marina Sandra¹

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET¹ Academia Nacional de Medicina²

Shiga-toxin (Stx) producing *Escherichia coli* (EHEC) strains can cause a broad spectrum of human diseases, including the life-threatening hemolytic uremic syndrome (HUS). Despite EHEC infection is characterized by acute inflammation of the colonic mucosa, little is known regarding the role of proinflammatory mediators like cysteine leukotrienes (LTC4) in this pathology. Thus,

the aim of this work was to analyze whether LTC4 influence EHEC pathogenesis in mice. BALB/c mice were pretreated with exogenous LTC4 (0.01 μ M) before EHEC intragastric infection ($5-7 \times 10^{11}$ CFU of EHEC/Kg of body weight). LTC4-treated (LTC4+) EHEC-infected (EHEC+) mice showed the highest intestinal damage, as assessed by histology, displaying submucosal infiltration and the highest number of apoptotic epithelial cells. LTC4+/EHEC+ mice showed a decreased survival rate as compared to LTC4-non-treated (LTC4-) EHEC+ mice. Survival: LTC4+/EHEC+= 62.5%, n=16; LTC4-/EHEC+=93.7% n=16, $p < 0,05$. Both LTC4+ and LTC4- non-infected mice (EHEC-) showed 100% survival. In addition, LTC4+/EHEC+ mice that died after the infection (died) showed clinical parameters related to Stx2 toxicity, including neutrophilia and high urea levels: (% neutrophils in blood \pm DS; n): LTC4+/EHEC+ (died) 40.0 ± 18.1 , n=6; LTC4+/EHEC+ (survivors) 33.0 ± 16.2 , n=10; LTC4-/EHEC+ (survived) 22.5 ± 8.2 , n=15, ($p < 0,05$ LTC4+/EHEC+ (died) vs LTC4+/EHEC- (survivors)). Urea: (mg% urea in plasma \pm DS; n): LTC4+/EHEC+ (died) 288 ± 137 , n=6; LTC4+/EHEC+ (survivors) 91 ± 32 , n=10; LTC4-/EHEC+ (survivors) 95 ± 24 , n=15, ($p < 0,05$ LTC4+/EHEC+ (died) vs LTC4+/EHEC- (survivors)) Finally, ELISA studies showed that EHEC-ingestion increased per se the endogenous gut levels of LTC4 at 96 h post infection. (pg/ml LTC4 \pm DS, n) EHEC+: 1205 ± 185 n=4; EHEC-: 923 ± 217 , n=4; $p < 0,05$. Taking together, our results suggest that LTC4 plays a role increasing the pathogenicity of EHEC intragastric infection in mice, mainly by affecting intestinal mucosal integrity.

157. (415) BRUCELLA ABORTUS RNA INHIBITS THE EXPRESSION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I (MHC-I) MOLECULES IN HUMAN MONOCYTES

Milillo, María Ayelen¹; Velasquez, Lis N.¹; Delpino, M. Victoria²; Giambartolomei, Guillermo H.²; Barrionuevo, Paula¹ Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM¹. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA²

Brucella abortus elicits a vigorous Th1 immune response which activates cytotoxic T lymphocytes. However, *B. abortus* is able to persist inside its host and establishes a chronic infection. We recently reported that infection of human monocytes/macrophages with *B. abortus* inhibits the IFN- γ -induced MHC-I cell surface expression down-modulating cytotoxic CD8⁺ T cell responses. MHC-I down-modulation depends on bacterial viability and results from the capacity of *B. abortus* to retain the MHC-I molecules within the Golgi apparatus. However, the components of *B. abortus* involved in this phenomenon remained unknown. Prokaryotic RNA has been recently characterized as a class of viability-associated PAMPs (*vita*-PAMPs). Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of *B. abortus* RNA on IFN- γ -induced MHC-I expression. For this, human monocytic THP-1 cells were incubated with *B. abortus* RNA (0.1-20 μ g/ml) in the presence of IFN- γ for 48 h. The expression of MHC-I molecules (HLA-ABC) was then, evaluated by flow cytometry. *B. abortus* RNA significantly ($p < 0,05$) down-regulated the IFN- γ -induced surface expression of MHC-I molecules in a dose-dependent fashion. Accordingly, when THP-1 cells were stimulated with heat-killed *B. abortus* or different structural components of the bacteria (lipoproteins, LPS or DNA), MHC-I down-modulation was not observed. By confocal microscopy, we also demonstrated that *B. abortus* RNA mimics the intracellular retention of MHC-I molecules observed with the infection. Interestingly, significant MHC-I down-regulation ($p < 0,05$) was obtained with *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* RNAs but not with PBMCs RNA, indicating that the effect could be extended to other prokaryotic but not eukaryotic RNAs. Overall, these results indicate that the *vita*-PAMP RNA is a component employed by *B. abortus* to inhibit MHC-I expression whereby the bacteria could evade the cytotoxic CD8⁺ T cell immunological surveillance establishing a chronic infection.

158. (109) VIP ENHANCES TROPHOBLAST CELL-MEDIATED MONOCYTE MIGRATION, PHAGOCYTOSIS AND M2 PHENOTYPE EXPRESSION

Paparini, Daniel; Grasso, Esteban; Calo, Guillermina; Vota, Daiana; Ramhorst, Rosanna; Pérez Leirós, Claudia
Lab. de Inmunofarmacología, Depto. Química Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA

The generation and maintenance of the maternal-placental interface is a dynamic process that involves the concerted action of different population of leucocytes and mediators to favor a tolerogenic micro-environment. Monocytes (Mo) are recruited to the maternal-placental interface and "educated" by trophoblast cells (Tb) to express an M2 alternative activation profile, thus contributing to the maintenance of immune homeostasis. On the basis that vasoactive intestinal peptide (VIP) has anti-inflammatory and immunosuppressive effects; we evaluated the functional profile of Mo co-cultured with Tb and their modulation by VIP. We used an in vitro model of co-culture of first trimester trophoblast cell line (Swan-71) and Mo isolated from PBMCs (Percoll gradient) from healthy volunteers. The expression of cytokines and VIP receptors (VPAC) was evaluated in Mo by FACS and RT-PCR. Mo treated with VIP increased the% of CD39 while diminished IL-12 and TNF- α positive cells. When Mo were co-cultured with Tb alone or in the presence of 10 nM VIP the % of IL-10 positive cells was enhanced ($X \pm ES = 29.5 \pm 3.5$; 32.4 ± 4.3 vs 16.3 ± 4.3 ; $P < 0,05$) as well as CD39 ($X \pm ES = 35.6 \pm 14.4$; 42.4 ± 14.0 vs 6.6 ± 2.3 ; $P < 0,05$) without changes in IL-12 and TNF- α . Moreover, when Mo were cultured with conditioned media (CM) obtained from Tb treated with VIP (10 nM) for 20 h, an increase in IL-10 and a decrease in TNF- α positive cells were observed. These CM also enhanced phagocytosis of apoptotic Tb cells (% of CD14/CFSE cells: CM-VIP 22.0% vs. control media 13.5%; $P < 0,05$) and apoptotic neutrophils (71.5% vs control: 41.1%; $P < 0,05$) and Mo migration. These results support that VIP acting on Tb and promoting Mo functional profile modulation would favor immune homeostasis maintenance in the maternal placental-interface.

159. (171) CONSTITUTIVE β -DEFENSIN 1 IS MODULATED BY *CANDIDA ALBICANS* IN VULVOVAGINAL CANDIDIASIS
Miró, María Soledad; Rodríguez, Emilse; Icely, Paula Alejandra; Vigezzi, Cecilia; Sotomayor, Claudia Elena
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBIC)-CONICET-UNC

β -defensins (BDs) are antimicrobial peptides expressed by epithelial barriers and immune cells that play an important role in the innate host defense. BDs exert antimicrobial and chemoattractant activities. Human BD1 (mouse BD1 orthologous), unlike other BDs which are induced by microbial compounds or inflammatory stimuli, is constitutively expressed with constant levels in normal tissue. *Candida albicans* (*Ca*) is a common commensal of mucosal surfaces and the most frequent cause of vulvovaginal Candidiasis (VVC). The role of BD1 during this pathology is unclear and modulation of BD1 by fungal factors remains to be elucidated. We aimed to study *Ca* ability to modulate the expression of BD1 *In Vivo* in a mouse model of VVC and *In Vitro* using a cervicovaginal human epithelial cell line. Female C57BL/6 mice were used. Estrus phase was induced by estradiol injections. Infected animals (Inf) were intravaginally inoculated with 5.106 *Ca* ATCC 36801 at day (D) 0. Treated uninfected (Treat) mice were used as controls. At D 2, 4 and 8 post infection (pi), vaginal lavage was obtained to evaluate fungal burden (CFU) and intracellular expression of mBD1 (flow cytometry) in Cytokeratin+ cells (epithelial cells) and Gr1+ (myeloid cells). BD1 was increased in epithelial and Gr-1+ cells in Inf mice at D2 pi ($p < 0,05$) compared with Treat animals. For *In Vitro* assays HeLa cells were incubated with *Ca* at different fungus/cell ratios (0.5:1; 1:1; 5:1) during 4 and 24 hs. *Ca* activated cells as was shown by Reactive Oxygen Species production (Quimiol. and NBT assay) without modifying cell viability (LDH release). hBD1 transcripts (qPCR) didn't exhibit changes after 4 hs of incubation, meanwhile after 24 hs of interaction a significant decrease of hBD1 transcripts was observed at all ratios ($p < 0,05$). These results demonstrate that *C. albicans* is able to modulate the expression of BD1, which was thought to be constitutively expressed with constant levels, in female genital tract during VVC.

160. (210) EXPRESSION AND FUNCTIONAL EFFECTS OF MODULATION OF ALPHA7 NICOTINIC RECEPTOR ON HUMAN NK CELLS

Zanetti, Samanta¹; Ziblat, Andrea²; Zwirner, Norberto²; Bouzat, Cecilia¹
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²

Acetylcholine (ACh) is the main brain neurotransmitter; it can be detected in the blood of several mammals including humans. ACh synthesis also occurs in non-neuronal cells, such as immune cells. Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ligand-gated ion channels that are activated by ACh and mediated calcium (Ca^{2+}) signals. nAChRs are pentameric transmembrane proteins, some are homomeric nAChRs, such as $\alpha 7$ and others are heteromeric nAChRs. In the present study, we investigated the expression of $\alpha 7$ in NK cells and the regulation of NK cell function by agonists and antagonist of $\alpha 7$ during their activation with IL-12, IL-18 and IL-15 for 48 h. First, we determined the surface expression of $\alpha 7$ with Alexa488-conjugated α -bungarotoxin (α -Bgt), a specific antagonist of $\alpha 7$. Strong binding of α -Bgt was observed on the surface of activated NK cells by confocal microscopy and flow cytometry, while it was slightly detected in non-activated cells. Using confocal microscopy and Fluo-3/AM, a Ca^{2+} -sensitive fluorescent indicator, we observed a 1.5-2.5 fold increase of intracellular Ca^{2+} in activated NK cells when nicotine (an agonist of nAChRs) was added, indicating that $\alpha 7$ is functional in NK cells. We also observed that nicotine and PNU282987 (a specific agonist of $\alpha 7$) induced a down-regulation of the expression of NKG2D, and this effect was abolished by α -Bgt, without affecting other NK cell receptors such as NKp46. Moreover, NK cells stimulated with IL-12, IL-15 and IL-18 incubated with nicotine and PNU120596 (a specific allosteric modulator of $\alpha 7$) showed a reduction in the production of IFN- γ . Overall, our results provide evidence that effector function and phenotype of NK cells can be negatively regulated by activation of $\alpha 7$ receptor, which may contribute to tumor progression or dissemination of intracellular infections where NKG2D and IFN- γ play a critical role.

161. (280) INFLAMMATORY IMMUNE RESPONSE ELICITED BY THE CROSS-INTERACTION BETWEEN TROPHOBLASTS, MONOCYTES AND NEUTROPHILS INFECTED WITH *BRUCELLA ABORTUS*

Fernández, Andrea Giselle; Ferrero, Mariana Cristina; Hielpos, María Soledad; Fossati, Carlos Alberto; Baldi, Pablo César
Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA

It is well known that *Brucella* induces abortion in humans and animals, very likely due to a shift towards an inflammatory profile of cytokines present at the maternal-fetal interface. In this work we evaluated cytokines and chemokines secreted after the interaction of human trophoblasts, monocytes and neutrophils infected with *B. abortus*. The trophoblastic cell line Swan-71 (Sw71), the monocytic cell line THP-1, and neutrophils isolated from peripheral blood were infected with *B. abortus* 2308 at a multiplicity of infection of 100 for 2 h. After treatment with gentamicin, supernatants were collected at 24 or 48 h post infection and filter-sterilized. THP-1 and neutrophils were stimulated with conditioned medium (CM) from infected Sw71 cells. An increase in IL-8 ($p < 0,05$) and IL-6 ($p < 0,001$) levels was detected after stimulation only in THP-1 cells. In a reciprocal experiment, when Sw71 cells were stimulated with CM from infected monocytes (CM-m) or neutrophils (CM-n), an increase in MCP-1, IL-8 and IL-6 was observed ($p < 0,001$ to $p < 0,05$ in all cases). To analyze the possible involvement of TNF- α and IL-1 β in these stimulations, two series of experiments were performed. First, we confirmed that trophoblastic cells respond to recombinant human TNF- α and IL-1 β with an increased production of IL-8 and MCP-1 ($p < 0,001$ at all concentrations tested). Second, CM-m and CM-n were treated with a neutralizing anti-human TNF antibody or recombinant human IL-1ra (IL-1 receptor antagonist)

before using them to stimulate Sw71 cells. IL-1ra produced a significant decrease in the secretion of IL-8 and IL-6 in response to both CM ($p < 0,05$), whereas both blocking agents decreased MCP-1 production in response to CM-n ($p < 0,05$). These findings show that cross-interaction between trophoblasts and immune cells during *B. abortus* infection lead to an inflammatory cytokine profile which might be involved in fetus miscarriage.

162. (306) TOLL-LIKE RECEPTOR EXPRESSION IN THE NERVOUS SYSTEM OF BOVINE ALPHA-HERPESVIRUS-INFECTED CALVES

Marin, Maía¹; Quintana, Silvina²; Leunda, María Rosa¹; Odeón, Anselmo¹; Pérez, Sandra³

Laboratorio de Virología, Área de Producción y Sanidad Animal, INTA Estación Experimental Agropecuaria Balcarce¹ Instituto de Análisis Fares Taie, Mar del Plata, Buenos Aires² CONICET³

Alpha-herpesviruses are capable of causing neurologic disease in cattle. In this study, the expression levels of viral Toll-like receptors (TLRs) in the nervous system of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5)-infected calves were investigated. Twelve calves were inoculated with BoHV-5 at doses of high titer ($10^{6.3}$ TCID₅₀) and they were slaughtered during the peak of acute infection. Thirteen calves were challenged with a low virus titer (10^3 TCID₅₀) to induce the establishment of latency. Two of them were euthanized 2 months post-inoculation while the remaining calves were treated with dexamethasone to stimulate reactivation. Uninfected calves were used as control and BoHV-1-infected calves were used to determine whether TLR signalling had influence on the differences on neuropathogenicity between both alpha-herpesviruses. Total RNA from several areas of the frontal cortex and trigeminal ganglia of calves was isolated by using Trizol and Real time RT-PCR was applied for quantification of TLRs 3 and 7-9 mRNA levels. Statistical analysis was performed by using the Relative Expression Software Tool. A significant increase in the expression of TLRs 3 and 7-9 was found in the anterior cerebral cortex during acute infection and BoHV-5 reactivation. In the trigeminal ganglia, only TLR9 expression was significantly affected by infection. The magnitude of the increase was lower in BoHV-1-infected calves, suggesting that a restricted immune response might protect against exacerbated inflammatory responses in the brain. This work describes, for the first time, the involvement of TLRs 3 and 7-9 in the recognition of BoHV in the bovine nervous system, indicating that the expression of these receptors might be associated with the development of neurological disease. Modulation of the signalling pathways mediated by TLRs might provide an effective approach to control the neuro-immune response to BoHV-5, which may, in part, be responsible the neurological lesions caused by the virus.

163. (333) KINETIC AND THERMODYNAMIC STUDIES OF THE INTERACTION BETWEEN ACTIVATING AND INHIBITORY LY49 NATURAL KILLER RECEPTORS AND MHC-I MOLECULES

Romasanta, Pablo¹; Sarratea, María Belén¹; Curto, Lucrecia²; Noli Truant, Sofía¹; Fernández Lynch, María Julieta¹; Antonoglou, Belén¹; Todone, Marcos¹; De Marzi, Mauricio¹; Delfino, Jose María²; Fernández, Marisa¹; Malchiodi, Emilio¹ Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA¹ Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB), CONICET.²

The interactions between mice Natural Killer (NK) cell receptors Ly49 and the endogenous mayor histocompatibility complex type I (MHC-I) ligands are of capital importance for the regulation of viral infections and tumorigenic processes. The interactions Ly49H/H-2D^a, Ly49I/H-2D^d and Ly49G/H-2D^k were particularly studied. They embrace the structural heterogeneity of Ly49 and interact with different MHC-I alleles. Thermodynamic and kinetic experiments were carried out in order to elucidate the Ly49/MHC-I binding mechanism. Combining surface plasmon resonance (SPR), fluorescence anisotropy (FA), and far-UV circular dichroism (CD), an identical and independent binding sites model was determined,

where the MHC-I binds to Ly49 with a $\sim 10^6$ M⁻¹ binding constant. There is no evidence of a strong positive cooperativity such as seen with the interactions between Ly49 and m157, a murine cytomegalovirus decoy molecule. The rate-limiting step of the overall mechanism is the diffusion of the molecules. Using SPR we also studied the Ly49G/MHC-I peptide insensitivity, and identified for the first time interactions between activating Ly49H and endogenous ligands in the absence of viral molecules.

164. (375) IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS)

Sabbione, Florencia¹; Keitelman, Irene¹; Lula, Leonardo¹; Podaza, Enrique A.¹; Towstyka, Nadia¹; Giordano, Mirta¹; Jancic, Carolina¹; Trevani, Analía S^{1,2}

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional De Medicina¹ Depto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA²

Airway epithelial cells provide a mechanical barrier to prevent lung infection and produce chemokines and cytokines that recruit and activate phagocytic cells. In response to alveolar inflammatory stimuli, neutrophils transmigrate the epithelium to eliminate microorganisms by either phagocytosis or NETs. They are chromatin fibers decorated with antimicrobial proteins that can trap and kill microorganisms. The aim of this study was to address if NETs also exert immunomodulatory actions. NETs were obtained from culture supernatants of neutrophils isolated from healthy donors by stimulation with monosodium urate crystals (300 µg/ml) for 4 h at 37° C, gentle sonication and centrifugation. As controls, neutrophils were also stimulated in the presence of Diphenyleneiodonium (DPI) or elastase inhibitor (EI) to avoid NETs release. The presence of NETs in supernatants was determined by fluorometry. NETs preparations or their controls were added to A549 and BEAS-2B epithelial cells cultures for 24 h at 37°C and then supernatants were collected and IL-6 and IL-8 were determined by ELISA. Cell viability was assessed by Annexin V-FITC/PI staining by FACS. NETs increased the secretion of IL-8 and IL-6 by both types of epithelial cells (n=3, $p < 0.0001$) in contrast to supernatants of stimulated neutrophils treated with either DPI or EI, which induced the production of much more reduced levels of cytokines, similar to those induced by unstimulated neutrophil supernatants. None of these treatments affected cell viability. Cytokines levels produced by A549 cells in response to NETs were similar to those produced in response to LPS and PAM3CSK (n=5). The cytokine stimulatory effects mediated by NETs were also observed in macrophages differentiated from human monocytes (n=4 $p < 0,001$), but not in monocyte derived-dendritic cells (n=5). Altogether our results suggest that beyond their microbicide properties, NETs also constitute potent and selective proinflammatory stimuli.

165. (48) LP07 MURINE LUNG ADENOCARCINOMA CELLS INDUCE THE FORMATION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS)

Karas, Romina Alejandra; Abrigo, Mariana; Diament, Miriam

Depto. de Bioterio y Cáncer Experimental, Instituto de Oncología Ángel Roffo.

Among the inflammatory cells that are involved in the neoplastic process, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) contribute favoring or inhibiting tumor growth. Under appropriate stimuli, PMNs prolong their survival by delaying apoptosis. They can also produce extracellular fibers or networks called *neutrophil extracellular traps* (NETs). We have previously studied the participation of PMN in tumor progression of the murine lung adenocarcinoma LP07, derived from P07 lung tumor, arisen spontaneously in a BALB/c mouse. Mice bearing LP07 tumor (TBM) show paraneoplastic syndromes such as: cachexia, leukocytosis at expense of PMNs (TBM-PMN) and hypercalcemia. The TBM-PMN has a higher production of reactive oxygen species, compared to the PMNs from normal mice (N-PMN), and promotes migration and invasion of LP07 cells (cLP07). Coinoculation of PMNs and cLP07 increases artificial lung metastasis. Our objective was to determine whether cLP07

induce PMNs to generate NETs, and if NETs promote or inhibit *in vitro* the growth of cLP07. cLP07 ($3 \times 10^5/0.2\text{ml}$) were inoculated s.c. into normal BALB/c mice. When the tumor volume reached 500 mm³, the animals were anesthetized and bleeding via the retroorbital vein. PMNs were obtained centrifuging the blood in a Ficoll-Triyosom gradient (δ 1090). TBM-PMN ($4 \times 10^5/\text{ml}$), cultivated for 18 hours in RPMI alone, generated NETs. When adding to the culture, conditioned media of 24 h of cLP07 (CM-LP07), an increase of NETs was observed, while N-PMN not formed NETs in presence or absence of CM-LP07. To evaluate if the NETs modulate cLP07, we induce *in vitro* formation of NETs in TBM-PMN with CM-LP07, 18 hours, and seeded on this culture LP07 ($10 \times 10^4/\text{ml}$). After 18 hours we observed that cLP07 were grouped and covered by fibers of DNA of the NETs. The LP07 tumor prime PMNs, modifying its functionality, allowing the formation of NETs. Despite the fact that NETs were described as microbicides, they are not cytotoxic on cLP07.

166. (78) VISUALIZING PRODUCTION OF IFN- β IN VIVO IN A THERAPEUTIC MURINE MODEL OF INTRATUMORAL POLY AU ADMINISTRATION

Nocera, David Andrés¹; Araya, Paula¹; Roselli, Emiliano¹; Gatti, Gerardo²; Lienenklaus, Stefan³; Jablonska-Koch, Jadwiga³; Maccioni, Mariana¹

Depto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, CIBICI-CONICET¹ Fundación para el Progreso de la Medicina, Córdoba. Argentina.² Department of Molecular Immunology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany.³

Polyadenylic-polyuridylic acid (pAU) is a synthetic analog of viral dsRNA, recognized mainly by TLR3 and capable of triggering type I IFN production. Whereas exogenously administered type I IFN was used with some success in anti-cancer therapy, the role of endogenous type I IFNs in cancer has only recently begun to be elucidated. Intratumor administration of pAU in tumor-bearing mice reduces tumor growth, increases mice survival and enhances the specific immune response against tumor antigens. Recognition of type I IFN by host cells is crucial for this effect. In this work, we extend our data regarding the capacity of pAU of eliciting endogenous type IFN β production in therapeutic settings. To visualize the endogenous IFN β production, B16 tumors were generated in IFN β reporter mice which have the luciferase reporter gene under the control of the IFN β promoter (IFN $\beta^{+/ΔβLuc}$). When tumors reached a measurable size a group of mice was i.t. treated with 50 μg of pAU (n=10, 4 doses every 2 days). *In vivo* IFN β induction was visualized after i.p injection of D-luciferin and monitoring luciferase induction in an IVIS 200 imaging system, and additionally *ex vivo* tissue-specific luciferase assay was performed. Alternatively, tumors were induced in lineage specific reporter mice, which express luciferase exclusively in LysM+, CD11c+, CD4+ or CD19+ cells. Kinetics studies revealed that IFN β was effectively induced after 6 hs of pAU-treatment and that this production decreases after consecutive doses. Furthermore, LysM+ and CD11c+ cells were mainly responsible of host IFN β induction within tumor (93.1 and 45.8.% of global respectively). B16 tumors were also generated in IRF3^{-/-}, IRF5^{-/-}, IRF7^{-/-}, UNC93b1^{-/-} reporter IFN $\beta^{+/ΔβLuc}$ mice. Our results indicate that IRF3 and UNC93b1 proteins are directly involved in the induction of IFN β in our pre-clinical model. These data shed light about the mechanisms of IFN β induction in preclinical therapeutic models of pAU administration.

167. (97) INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA BASADA EN EL BLOQUEO DE STAT3

De Martino, María; Mercogliano, María Florencia; Tkach, Mercedes; Venturutti, Leandro; Proietti, Cecilia Jazmín; Izzo, Franco; Elizalde, Patricia Virginia; Schillaci, Roxana Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

La proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3 (Stat3) se encuentra constitutivamente activa en cáncer de mama (CM) y su bloqueo induce la expresión de citoquinas

proinflamatorias. Hemos demostrado que la inmunización de ratones con células de CM que tienen Stat3 bloqueada y son senescentes, inducen una respuesta antitumoral dependiente de linfocitos T CD4+ y células NK. Aquí estudiamos si la inmunización con sobrenadantes (SN) producidos por dichas células induce una respuesta inmune antitumoral y la contribución de la senescencia a este fenotipo. Utilizamos el modelo de CM murino progéstágeno-dependiente C4HD que tiene activado Stat3. El bloqueo de Stat3 con ARN de interferencia (ARNi) aumentó la expresión de p16 (Western blot) y el bloqueo de p16 revirtió el fenotipo senescente (tinción β -galactosidasa ácida). Inmunizamos ratones 3 veces con pellets preparados a partir de SN de células C4HD transfectadas *in vitro* con ARNi control, ARNi Stat3 (senescentes) y ARNi Stat3 y p16 (no senescentes) junto con células C4HD irradiadas. Luego los desafiamos con el tumor C4HD salvaje y monitoreamos su crecimiento por 40d. La inmunización con SN de células con ARNi Stat3 disminuyó el crecimiento tumoral vs control (84%, $P < 0.01$) mientras que no hubo diferencia con los SN de las células ARNiStat3 vs ARNi Stat3+p16 (84% vs 74%). En estos dos últimos grupos se observó una mayor actividad citotóxica de las células NK y un incremento en el número de linfocitos T CD4+ de memoria vs control. Por último, observamos inducción de senescencia y un aumento de marcadores moleculares como p21 en las líneas MDAMB-231, JIMT-1 y KPL-4 transfectadas con ARNi Stat3. Estos resultados sugieren que podría formularse un adyuvante efectivo para inmunoterapias, basado en el secretoma de células que tienen bloqueado Stat3 pero que no senescen, ya que las poblaciones celulares involucradas en el efecto antitumoral observado tienen potencial aplicación en la clínica.

168. (114) THE BTK INHIBITOR IBRUTINIB (IBRU) IMPAIRS MACROPHAGE-MEDIATED PHAGOCYTOSIS OF LEUKEMIC B CELLS FROM CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL) PATIENTS

Borge, Mercedes^{1,2}; Podaza, Enrique¹; Colado, Ana¹; Almejún, Belén¹; Fernández Grecco, Horacio³; Cabrejo, María³; Bezares, Fernando Raimundo⁴; Giordano, Mirta^{1,2}; Gamblerale, Romina^{1,2}

Laboratorio de Inmunología Oncológica, Instituto de Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Depto. de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA.² Hospital Méndez³ Hospital Álvarez⁴

Malignant B cell expansion is promoted by the permissive microenvironment present in lymphoid organs of CLL patients. There, BCR stimulation of leukemic cells and the array of signals provided by T lymphocytes, stroma and myeloid cells favor leukemic clone proliferation and prevent both spontaneous and drug-induced apoptosis. Ibrutinib (Ibru) is an orally available BTK inhibitor which, administered once daily continuously, has shown impressive results in clinical trials and has recently been approved as a single agent for CLL treatment. Combined therapies with Ibru and monoclonal antibodies (mAb) are being tested in clinical trials. The standard first-line treatment of fit CLL patients includes the anti-CD20 mAb Rituximab (Rx) while the anti-CD52 mAb Campath (Cpth) was employed for relapsed or refractory patients. They both mediate anti-tumor effects by a variety of mechanisms including the ingestion of opsonized target cells by macrophages. The objective of this study was to determine the effect of Ibru on macrophage phagocytosis of CLL cells opsonized with Rx or Cpth. To this aim macrophages were differentiated from monocytes from healthy donors in the presence of GM-CSF. Then, CFSE-labeled CLL cells were coated with Rx or Cpth and used as target cells. The phagocytosis assay was performed in the presence or absence of Ibru and was analyzed by flow cytometry after 2hs. We found that Ibru diminishes macrophage-phagocytosis of Rx-coated CLL cells ($p < 0.05$ for Ibru 0.5 μM and 5 μM) and Cpth-coated CLL cells ($p < 0.05$ for Ibru 5 μM). This impairment was not due to a reduced binding of opsonized cells by Ibru-treated macrophages ($p < 0.05$). Importantly, Ibru did not affect macrophage viability during the phagocytosis assay ($p < 0.05$). Our results suggest that Ibru may impair mAbs anti-tumor effects. Thus, alternative Ibru dosing schedules, sequential vs concurrent, might be consider in

clinical trials testing the combination of lbru and mAb to preserve the efficacy of both.

169. (148) LOS OLIGOSACÁRIDOS DEL ÁCIDO HIALURÓNICO SENSIBILIZAN AL EFECTO DE IMATINIB A LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Lompardía, Silvina L.; Mascaró, Marilina; Díaz, Mariángeles; Pibuel, Matías; Papademetrio, Daniela L.; Álvarez, Elida; Hajos, Silvia E.

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Instituto de Estudios de la Inmunidad Homolar (IDEHU)-CONICET-UBA

El ácido hialurónico (AH), componente de la matriz extracelular, activa vías de señalización como PI3K y MAPK de importancia en oncología. Sus oligosacáridos (oAH) no entrecruzan receptores atenuando así sus señales. Poco se sabe de su implicancia en oncohematología. Previamente reportamos que los oAH inhiben la proliferación de las células humanas de leucemia mieloide crónica (LMC) K562 y sensibilizan a la acción de la Vincristina a las células Kv562 (derivada resistente de K562), si bien la droga de primera línea para la LMC es Imatinib. Por ello, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de los oAH en combinación con Imatinib sobre diferentes mecanismos biológicos en las células K562 y Kv562. Se utilizó Imatinib en dosis de 0,5 y 0,25µM para K562 y de 2 y 0,5µM para Kv562. La concentración empleada de oAH fue de 300µg/ml. La proliferación celular se evaluó mediante incorporación de ³H-T. Se observó que los co-tratamientos (Imatinib + oAH) incrementaron el efecto anti-proliferativo de Imatinib en ambas líneas celulares (p<0,01). La senescencia se analizó mediante la actividad de SA-β-gal y la presencia de SAHF. Para las dosis bajas de Imatinib el co-tratamiento aumentó la inducción de senescencia en K562 y Kv562 (p<0,01). El estudio de la apoptosis se realizó mediante CF (AnexinaV-PE-7AAD y pico subG1) y microscopía de fluorescencia (DAPI). Sólo para las dosis altas el co-tratamiento incrementó la apoptosis inducida por Imatinib en ambas células (p<0,01). Mediante WB se analizó la relación pAkt/Akt y pERK/ERK observándose que en ambas líneas celulares el co-tratamiento disminuyó los niveles de pAkt/Akt aún más que Imatinib (p<0,01). Un efecto similar se observó para pERK/ERK sólo en las células K562 (p<0,05). Concluimos que los oAH sensibilizarían a las células K562 y Kv562 a la acción anti-proliferativa de Imatinib induciendo senescencia o apoptosis dependiendo de la dosis de Imatinib empleada, e inhibiendo vías de señalización como PI3K/Akt y MEK/ERK.

170. (63) EXTRACELLULAR ATP AS A DANGER SIGNAL IN HUMAN VISCERAL ADIPOSE TISSUE: IMPLICATIONS FOR OBESITY

Pandolfi, Julieta¹; Ferraro, Ariel²; Lerner, Martín²; Payaslian, Florencia¹; Fainboim, Leonardo¹; Arruvito, Lourdes¹

*Laboratorio Inmunogenética, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ Div. Cirugía Gastroenterológica, Hospital de Clínicas "José de San Martín"*²

Obesity (OB) is associated with a low grade inflammation located in visceral adipose tissue (VAT). Chronic inflammatory conditions induce the release of ATP from intracellular stores, which is catabolized into Adenosine (ADO) by ectonucleotidases (CD39/CD73). In the extracellular space, these nucleotides act through P2X7 and A2A receptors. Purinergic signaling is involved in vascular or lung chronic inflammation. However, no studies in humans have examined the role of this signaling pathway in the modulation of VAT inflammation in Obesity. Aims: 1-To demonstrate the release of pro-inflammatory mediators in VAT; 2- To analyze the expression and activation of the purinergic pathway in VAT. Samples of VAT were obtained from the greater omentum during endoscopic repair of hernias and during the performance of bariatric surgeries from lean (LD) or obese (OB) patients, respectively. VAT of OB secreted higher levels of pro-inflammatory cytokines/chemokines (IL-1β, TNF-α and MCP-1) quantified by Bioplex. ATP released by VAT, measured by Luminometry, correlated positively

with patients BMI (p <0.05, r = 0.66). OB showed a higher expression of CD39/CD73 compared with LD (p <0.05) analyzed by Flow cytometry. ARNm levels of P2X7 and A2A receptors were higher in OB determined by RTqPCR (p <0.05). The ATP hydrolyzing capacity and ADO production was studied by Luminometry and HPLC respectively. These functions were abrogated with the addition of either ATPase inhibitor ARL67156 or blocking anti-CD39 (p<0,05), showing the involvement of this enzyme in the regulation of the purinergic pathway. Our results provide insight into the mechanisms that regulate chronic inflammation in human VAT. The increased expression of the CD39/CD73 and the purinergic receptors establish a relationship between this signaling pathway and the local inflammation, highlighting the role of VAT in the pathogenesis of obesity.

171. (293) LIPOPOLYSACCHARIDE MODULATES THE CHEMOKINE RECEPTORS CCR2 AND CX3CR1 AND INDUCES RECRUITMENT OF LEUKOCYTES TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Peralta Ramos, Javier María; Gaviglio, Emilia Andrea; Arroyo, Daniela Soledad; Bussi, Claudio; Iribarren, Pablo *Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBIC)-CONICET-UNC*

Microglial cells (MC) are components of the immune system intrinsic to the central nervous system (CNS) and they participate in responses induced by infection, aseptic inflammation, injury and/or neurodegeneration. These cells migrate to injury sites in response to chemoattractant agents that are produced under inflammatory circumstances. This response greatly depends on the expression and function of chemokine receptors. In this work, we evaluate the role of TLR4 in the regulation of the expression and function of chemoattractant receptors important in the recruitment of phagocytes and neuroinflammation such as CCR2 and CX₃CR1. First of all, the study of the modulation of chemokine receptors in the CNS after a systemic pro-inflammatory stimulus with lipopolysaccharide (LPS), revealed a decreased gene expression of CX₃CR1 and CX₃CL1 in mice total brain under these conditions (p<0,05). On the other hand, we evaluated the induction of neuroinflammation, activation of MC and recruitment of leukocytes to the CNS. We observed an increase in the absolute number of MC, neutrophils, lymphocytes, dendritic cells and inflammatory monocytes in LPS-treated mice (p<0,001). Besides, we noted recruited monocytes showed CX₃CR1 intracellularly and in the membrane, and intracellular CCR2, but only half of them expressed CCR2 in the membrane (p<0,001). Similarly, although the majority of MC displayed CX₃CR1 intracellularly and in the membrane, and most of CCR2 was expressed intracellularly, only a low frequency of these cells exhibited this receptor in the membrane (p<0,001). Our results suggest that stimulation of TLR4 would induce the regulation of chemoattractant receptors which are key in the recruitment of leukocytes to the central nervous system and in the neuroinflammatory response. Further research is merited to delineate the precise mechanisms underlying this modulation and which consequences would have over this response.

172. (167) CUTANEOUS MANIFESTATIONS IN PRIMARY IMMUNODEFICIENCY DISEASES IN CHILDREN

Cantisano, Claudio A; Díaz, Héctor J; Quiroz, Héctor M; Balbaryski, Jeanette I; Gaddi, Eduardo A *Hospital General de Niños Pedro de Elizalde*

Primary immunodeficiencies (PIDs) comprise a number of serious genetically determined disorders predisposing to recurrent infections, inflammatory, autoimmunity and neoplastic process. During the course of these diseases different cutaneous features are observed. In a retrospective study of 179 clinical records of patients with PIDs, cutaneous manifestations were observed in 25 of them (14%) .7 children (28%) with hyper IgE syndrome, and 3 (12%), with selective immunoglobulin A deficiency and ataxia telangiectasia, presented the highest incidence of dermatological interurrences. By the time of PIDs diagnosis, serum immunoglobulin levels outside of reference range were recorded

in 16 children. Low IgA and increased IgE levels were the most frequent humoral alterations. Similarly, quantitative changes in lymphocyte subsets levels were observed in 15 children. B lymphocytes increased levels and CD4/CD8 inversion rate were the most prevalent changes. Deficit in phagocytic function were recorded in two patients. Infectious etiology of cutaneous symptoms were observed in 9 out of 25 patients (36%), allergic in 12 (48%) and autoimmune in 4 (16%). First dermatological manifestation median age in 84% of children (n:21), was 5 months (range 1-108), significantly diminished ($p<0,05$) to the median of PIDs diagnosis age, 33 months (range 3-168). In the remaining 4 children median PIDs diagnosis age, 47 months (range 12-80), preceded to first cutaneous feature median age, 78 months (range 15-84) ($p:NS$). The study of frequency, nature and evolution of cutaneous alterations improve the awareness of PIDs diagnosis.

173. (175) FUNCTIONAL FEATURES OF KIR2DS4 EXPRESSED IN NK AND T CELLS: ROLE IN PEDIATRIC AUTOIMMUNE HEPATITIS

Podhorzer, Ariel¹; Theiler, Graciela¹; Paladino, Natalia¹; Cuarterolo, Miriam²; López, Susana.^{1,2}; Capucchio, Monica¹; Baz, Placida¹; Udovin, Lucas¹; Machicote, Andrés¹; Fainboim, Leonardo¹

Laboratorio de Inmunogenética, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ División Hepatología, Hospital de Pediatría Garrahan²

Activation of natural killer (NK) cells involves integration of signals from activating and inhibitory receptors. The oldest, most prevalent KIR2DS is KIR2DS4, which is represented by a variable balance between "full-length" (FL) and "deleted" forms (KIR1D). In a previous work we have found that KIR2DS4-FL gene frequency was increased showing a very strong synergistic effect with HLA-DRB1*1301 in the susceptibility to develop type I pediatric autoimmune hepatitis (PAH) Despite its increased frequency, little is known about the functional activity mediated by KIR2DS4. Thus, we explore: 1-The presence of putative KIR2DS4 ligands. 2-The presence of inhibitory KIR-HLA-C ligands. 3-Evaluate the expression KIR genes between PAH and controls. 4-The pattern of cytokine secretion mediated by anti-KIR2DS4 as its ligand. Using PCR-SSOP method we observed that HLA-Cw2, one of proposed KIR2DS4 ligands, is increased in PAH ($p<0,01$). HLA-C1 the ligand for KIR2DL2/3 inhibitor receptors is diminished within KIR2DS4-FL patients ($p<0,01$). Although KIR2DL3 expression is increased ($p<0,05$) and KIR2DL2/S2 is decreased ($p<0,01$) in patients (detected by flow cytometry), functionality may be affected by the decreased expression of the HLA-C1 ligand. Anti-KIR2DS4 induce a strong cytotoxic effect with a smaller secretion of IFN- γ , confirmed by a Bioplex assay showing a preferential increase of pro-inflammatory IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN γ , MIP-1 β , TNF α cytokines on NK and T2DS4+ population. We propose that KIR2DS4-FL, found increased in PAH, have an enhanced ability to play its activating role through an increased frequency of a putative ligand and a decreased expression of inhibitory KIR2DL2/3 inhibitory ligands. A preferential cytotoxic activity and the secretion of pro-inflammatory cytokines by anti-KIR2DS4 specific activation shows for the very first time that T and NK 2DS4+ cells share the same functional pattern ascribed to the innate response.

174. (211) RAS-ASSOCIATED AUTOIMMUNE LEUKOPROLIFERATIVE DISEASE (RALD): CASE REPORT

Cabanillas, Diana¹; Fynn, Alcira¹; Pérez, Laura²; Oliveira, Joao Bosco³; Regairaz, Lorena¹

Hospital de Niños Sor María Ludovica¹ Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan² Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira-IMIP³

RALD are ALPS-like disorders caused by mutations in NRAS and KRAS genes. We report the first Argentinian patient with RALD by NRAS mutation. The patient is a 2-years-old girl, without consanguinity in the family. When she was 3 months old she developed CMV infection (positive IgM and RCP) that resolved with valaciclovir, BCGitis and muguet. She was referred to our unit

with high suspicion of primary immunodeficiency. During the follow up she developed chronic, non-malignant lymphoproliferation (persistent lymphomonocytosis, hepatosplenomegaly), and autoimmunity (hemolytic anemia (Coombs: +++) and thrombocytopenia, with good response to steroids. She was evaluated by hematologist with high suspicion of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). Immunological assessment showed hipergammaglobulinemia, normal lymphocyte subsets and normal "double-negative" T cells (<2%). Evaluation of the intrinsic pathway of apoptosis revealed defective IL-2 withdrawal-induced apoptosis. An heterozygous mutation (G12D) in NRAS confirmed the diagnosed of RALD. RALD must be suspected in patients with autoimmunity, immune cytopenia and lymphadenopathy or hepatosplenomegaly who do not meet with the well-defined diagnostic criteria of ALPS or JMML.

175. (393) PACIENTES CON HEMOFILIA A SEVERA (HAS) PRESENTAN UN PERFIL DE RESPUESTA INMUNE PREDOMINANTEMENTE ANTI-INFLAMATORIO

Rearte, Bárbara¹; Irigoyen, María Belén¹; Neme, Daniela²; Felippo, Marta¹; De Tezanos Pinto, Miguel²; De E. De Bracco, María Marta¹; Galassi, Nora¹

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina.¹ Fundación de la Hemofilia².

Entre un 20-30% de pacientes con Hemofilia A Severa desarrollan anticuerpos (Ac) contra el FVIII administrado como tratamiento. En una respuesta humoral de alto título predomina la IgG4, una subclase de perfil antiinflamatorio. Se desconocen los mecanismos que conducen dicho cambio. El objetivo de este trabajo fue estudiar parámetros inmunes que conducen a este tipo de respuesta evaluando el perfil de células T (Th1/Th2), TFH (linfocitos T foliculares), moduladoras de la síntesis de Ac, y el entorno de citoquinas en especial la IL-10 y la IL-21. Se incluyeron 20 pacientes con HAS, 10 con Ac activos (PI), 10 sin Ac (P) y 12 dadores sanos (N). Las células TFH fueron evaluadas en sangre periférica por citometría de flujo empleando la marcación CD4/CXCR5 y CCR7/PD-1 para definir subpoblaciones reposo/efectoras. Las citoquinas IFN-gamma, IL-4, IL-10 e IL-21 se midieron en linfocitos estimulados con PMA e ionomicina. Si bien no hubo diferencias en el porcentaje de TFH entre los 3 grupos, en PI la subpoblación PD-1⁺ se encontró incrementada (% células media \pm DS: N: 4 \pm 1; P: 3 \pm 1; PI: 6 \pm 0,2*; * $p<0,05$) y la CCR7 disminuida (% células media \pm DS: N: 13 \pm 1; P: 10 \pm 1; PI: 8 \pm 1*; * $p<0,05$). Los grupos P y PI mostraron un menor cociente Th1/Th2 respecto al grupo N (% células CD3⁺CD4⁺IFN-gamma⁺/CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ media \pm DS: N: 23 \pm 11; P: 7 \pm 2*; PI: 12 \pm 2*; * $p<0,05$). Ambos grupos, especialmente PI, presentaron menores niveles de linfocitos CD3⁺CD8⁺ productores de IFN-gamma (% células media \pm DS: N: 25 \pm 5; P: 11 \pm 5*; PI: 5 \pm 3*; * $p<0,05$). No se encontraron diferencias en linfocitos T productores de IL-10, sin embargo, en PI se observó una mayor producción de IL-21 (%CD3⁺CD4⁺IL21⁺ media \pm DS: N: 0,3 \pm 0,1; P: 0,6 \pm 0,5; PI: 1 \pm 0,8*; * $p<0,05$). Los resultados demuestran un perfil de respuesta antiinflamatoria en pacientes HAS, más acentuado en PI, con un mayor nivel de células TFH efectoras, reportadas como productoras de IL-21, citoquina asociada a la síntesis de IgG4.

176. (47) STUDY OF CYTOKINE PROFILE INDUCED IN MOUSE MUCOSA AFTER ESCHERICHIA COLI O157:H7 INTRAGASTRIC INOCULATION

Fernández Brando, Romina J¹; Cabrera, Gabriel¹; Mejias, María P¹; Panek, Analía C¹; Abrey-Recalde, María J¹; Ramos, María V¹; Ibarra, Cristina²; Palermo, Marina S¹ *Laboratorio de Patogenia e Inmunología de Procesos Infecciosos, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM¹ Laboratorio de Fisiopatogenia, Facultad de Medicina, UBA²*

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is a life-threatening complication of Shiga-toxin (Stx) *Escherichia coli* (STEC) infections. In Argentina HUS constitutes an endemic disease. Our hypothesis is that the interaction between the mucosal associated lymphoid tissue (MALT) and STEC strains during the acute stage of infection

would determine the outcome of the disease and the onset of HUS. Therefore, the aim of this work was to assess the cytokine profile induced locally in a model of HUS by intragastric administration of STEC strains in mice at weaning. In order to understand the role of Stx in the local activation of lymphocytes, we also administered the same STEC strain knocked out on *stx* (Δ Stx) in a group of mice. To do this we removed mesenteric lymph nodes (MLN) at several times after infection (10, 12, 36, 48 and 72 h). The single cell suspensions were incubated with anti-CD3/ CD28 antibodies for 72 h. We analyzed proliferation by MTT assay and cytokine release in culture medium by ELISA (IFN γ , TGF β , IL10, and IL17). We observed that there was a significant increased number of pre-activated lymphocytes in mice inoculated with Δ Stx and STEC strains compared to control (PBS-inoculated) at 10 h after inoculation (mean OD₅₇₀ \pm SEM,n): Ctl= 0.28 \pm 0.04, 6; Δ Stx=0.53 \pm 0.06, 7; STEC=0.48 \pm 0.04, 14; ANOVA p<0.005. In addition, we observed an increased production of IL10 and IL17 cytokines in both bacterial inoculated mice only at 10 h after infection (mean pg/ml \pm SEM,n): IL10: Ctl= 121.4 \pm 9.6, 8; Δ Stx=229.7 \pm 45.0, 7; STEC=216.9 \pm 30.9, 10; ANOVA p<0,05; IL17: Ctl= 22.2 \pm 6.2, 9; Δ Stx=203.1 \pm 62.8, 7; STEC=127.6 \pm 50.3, 10; ANOVA p<0,05. Significant differences were not found in the other tested cytokines. In conclusion, both bacterial strains induced lymphocyte activation and a similar profile of cytokine secretion, which is compatible with an inflammatory response, thus suggesting that these changes were not dependent on Stx2.

177. (62) P31-43 INDUCES ENTEROPATHY IN C57BL/6 MICE AND PRODUCES GLUTEN SUSCEPTIBILITY IN GENETICALLY-PREDISPOSED MICE

Araya, Romina Elizabeth¹; Jury, Jennifer²; Verdu, Elena²; Chirido, Fernando¹

Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP ¹ *Mc Master University, Hamilton, Canadá*²

Celiac disease (CD) is an immune-mediated intestinal pathology induced by gluten in HLA-DQ2 or DQ8 positive individuals. Different animal models were proposed for the study of CD, however, even using complex strategies none of them have obtained the typical enteropathy observed in small intestine from active celiac patients. Several *in vitro* studies demonstrated that p31-43, a non-immunodominant gliadin peptide, is associated with the activation of innate immunity. The aim of our study was to develop an acute enteropathy model based on the p31-43 induction and to study if this innate stimulus may predispose to a chronic process in an appropriated genetic background. Eight-week male C57BL/6 or NOD-DQ8 mice were intraluminally administered with 0.1 mg/ml of p31-43 or PBS as control. NOD-DQ8 mice were then fed with 5mg/time three times a week during 2 weeks with gliadin or kept under gluten free diet (GFD) as control. Mice were sacrificed at different time points for further studies. Real Time PCR, histological, western blot studies and permeability assays were performed. After 12h post intraluminal stimulation with p31-43 a severe histological impairment of small intestinal mucosa was observed. p31-43 produced a decrease of villus-to-crypt (V/C) ratio (p<0.01), an increase of Intraepithelial lymphocytes (p<0.01) and an increase of the histological score (p<0,05). In a time course experiment, we observed an increase in IFN γ mRNA expression at 2h (p<0.01), followed by CXCL10 (p<0.01) and IFN β (p<0,05) which peaked at 6h. NOD-DQ8 mice, stimulated with p31-43 and then fed with gliadin, showed a decrease in V/C ratio (p<0,001), an increase of IELs (p<0,001) and an increase of histological score (p<0,001) after 2 weeks compared to control mice. The isotopic influx was impaired in these mice as well (p<0,05). All together, these data demonstrate that p31-43 induces an acute enteropathy in wild type mice, and predisposes to gluten susceptibility in NOD-DQ8 mice.

178. (64) INTESTINAL INFLAMMATION DICTATES GALECTIN-1-INDUCED APOPTOSIS OF EPITHELIAL CELLS

Muglia, Cecilia Isabel¹; Papa Gobbi, Rodrigo¹; Smaldini, Paola¹; Orsini Delgado, Luca¹; Zanuzzi, Carolina N.²;

Sambuelli, Alicia³; Rocca, Andres³; Toscano, Marta A.⁴; Rabinovich, Gabriel A.⁴; Docena, Guillermo H.¹

Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP ¹ *Depto. de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP*² *Servicio de Enfermedades Inflammatorias, Hospital de Gastroenterología Bonorino Udaondo*,³ *Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM*⁴

Intestinal epithelial cells (IEC) are key players in mucosal homeostasis. When the epithelial barrier is impaired inflammatory disorders may arise, such as in IBD and allergy. Based on our previous findings on the role of Gal-1 in IEC apoptosis, we studied the influence of pro-inflammatory cytokines on the pro-apoptotic effect of this β -galactoside binding protein. IEC were isolated from Balb/c mice and incubated with different pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-5 and IL-13). Gal-1 binding and apoptosis were evaluated by flow cytometry using biotinylated Gal-1, annexinV/propidium iodide and JC1. To investigate the *in vivo* effect of an inflammatory Th1 or Th2 environment we performed these assays in IEC isolated from a TNBS-induced colitis and a cholera toxin-driven allergy model. Finally, we assessed Gal-1 binding and Gal-1-induced apoptosis by TUNEL (confocal microscopy) in IEC of IBD patients. We found increased binding of Gal-1 to IEC incubated with IL-1 β , TNF- α or IL-13 (35 \pm 4; 55 \pm 13 and 76 \pm 8 compared to 9 \pm 2 of controls, p<0.01), which promoted higher frequency of apoptotic cells compared to cells incubated with Gal-1 in the absence of pro-inflammatory cytokines (19 \pm 8 vs 4 \pm 2% annexin V⁺ cells, p<0.05). Similarly, enterocytes from the colitis model and the food allergy model showed higher binding of Gal-1 (p<0.05 in both cases) compared to cells isolated from control mice. Accordingly, we observed higher percentages of annexin V⁺ cells in IEC isolated from colitis or allergic mice compared to controls (p<0.05 and P<0.01, respectively). Moreover, IECs from inflamed areas of IBD showed higher binding and higher frequency of TUNEL⁺ cells, compared to non-inflamed tissues of the same patient or from control patients (p<0.05). Our results provide evidence of the pro-apoptotic role of Gal-1 in IEC survival, which may impact on integrity of the gut barrier and the influence of a pro-inflammatory microenvironment in the immunoregulatory activity of this lectin.

179. (86) IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF SEMINAL VESICLES CONTENT: IMPACT ON IMMUNE RESPONSE AGAINST HSV-2

Varese, Augusto; Remes Lenicov, Federico; Glenda, Ernst; Merlotti, Antonela; Dantas, Ezequiel; Erra Daz, Fernando; Rubione, Julia; Duette, Gabriel; Pereyra Gerber, Pehun; Geffner, Jorge; Ceballos, Ana

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS)-CONICET-UBA

Semen is the main vector of a wide range of sexually transmitted infectious diseases. In addition, it is able to induce significant immunosuppressive actions that favor allo-reactive tolerance to paternal antigens. Our hypothesis is that semen, beyond being a vehicle of infectious agents, has the ability to modulate the immune response against sexually transmitted pathogens. Six- to 8-week-old female Balb/C mice, previously injected (sc) with progesterone, were inoculated ivag. with HSV-2 in the presence or absence of seminal vesicles content (VS). Another group of mice were vaccinated ivag. with inactivated HSV-2 in the presence or absence of VS, and a month later challenged with a lethal dose of HSV-2. VS was extracted post mortem from 10-12 week-old male Balb/C mice and pooled. Virus titers in vaginal fluids and spinal cord were measured by PFU method. Iliac lymph nodes, spleen and genital mucosa cells were washed and used to measure TNF- α , IL-17, IL-6, IL-10 or IFN- γ in cells supernatants by ELISA, and IFN- γ producing cells by ELISPOT. TGF- β , IL-10, CCL2, CCL5, CXCL9 and CXCL10 expression in these cells was analyzed by RT-qPCR and main cell populations were characterized by flow cytometry: T CD4⁺, T CD8⁺, T CD4⁺CD25⁺FOXP3, CD11c, CD11b, Ly6g and NK. IgG and IgA in blood and vaginal fluids were quantified

by ELISA. When analyzing the primary infection, no significant differences were found in clinical progression and survival between groups. However, mice infected with VS showed lower viral titers in vaginal washes at day 3 pi (n=20 p<0,05), and an increase IFN- γ production in spleen cells at day 10 pi (n=10 p<0.01). In the vaccinated mice, those immunized in the presence of VS showed a 90% survival compared to the control group 10% (n=20), and minor signs of disease. We also observed an increased IFN- γ production (n=20 p<0,05), augmented presence of T CD8+ cells at the site of infection (n=20 p<0,05), and an increased CXCL9 production (n=10 p<0,05) at day 3 pi in the group vaccinated in the presence of VS. Our results suggest that VS increases IFN- γ mediated mechanisms against HSV-2 infection, promoting strong specific immune response to new challenges with the virus.

180. (94) NON-VIABLE IMMUNOBIOTIC LACTOBACILLUS RHAMNOSUS CRL1505 AND ITS PEPTIDOGLYCAN IMPROVE SYSTEMIC AND RESPIRATORY INNATE IMMUNE RESPONSE DURING RECOVERY OF IMMUNOCOMPROMISED-MALNOURISHED MICE

Kolling, Yanina; Salva, Susana; Villena, Julio; Marranzino, Gabriela; Álvarez, Susana
Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET

The effect of nasally administered non-viable *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 (Lr05) and its peptidoglycan (Pg05) on respiratory immunity in malnourished mice was studied. Five experimental groups were used. Weaned mice were malnourished with a protein-free diet (PFD) for 21 days (M group). Aged-matched well-nourished mice consumed a balanced conventional diet (BD) for 21 days and were used as a control group (W group). In addition, malnourished mice received BD during 7d (B group) or BD with nasal non-viable Lr05 (Lr05 group) or its Pg (Pg05 group) supplementation during last 2d of the treatment. On d8, the five groups were infected nasally with *Streptococcus pneumoniae* (Sp) (10^9 cells/mouse). Resistance against Sp was significantly reduced in M mice since the levels of lung and blood bacterial cell counts were higher than those detected in W mice (p<0,05). Repletion with B significantly reduced lung and blood bacterial cell counts when compared to M mice but the counts did not reach the levels of the W group. However, when malnourished mice were repleted with Lr05 or Pg05, Sp was not detected in lung or blood samples. Challenge with Sp increased the numbers of neutrophils and macrophages and levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 in the respiratory tract, however the values were lower in M than in W mice (p<0,05). B treatment was not able to improve phagocytes' numbers or the levels of respiratory cytokines in response to the infection. Lr05 and Pg05 groups showed values of phagocytes, IL-1 β and IL-6 that were similar to W mice, while TNF- α was significantly higher in those groups when compared to W mice (p<0,05). Moreover, Lr05 and Pg05 treatments improved levels of respiratory IL-10, reaching values that were superior to those observed in the W mice (p<0.01). Dead probiotic bacteria or their cellular fractions could be an interesting alternative as mucosal adjuvants, especially in immunocompromised hosts in which the use of live bacteria might be dangerous.

181. (187) SEMINAL PLASMA MODULATES THE FUNCTIONAL PROFILE OF DENDRITIC CELLS IMPROVING THEIR ABILITY TO GENERATE CD25+/FOXP3+ T CELLS

Merlotti, Antonela; Erra Daz, Fernando; Dantas, Ezequiel; Varese, Augusto; Remes Lenicov, Federico; Rubione, Julia; Duette, Gabriel; Pereyra, Pehuen; Ernst, Glenda; Geffner, Jorge; Sabatté, Juan
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS) CONICET-UBA

Seminal plasma (SP) plays a major role in reproduction and also in the transmission of a number of infectious diseases. Moreover, it is well known that seminal plasma contains high concentrations of immunomodulatory compounds. We have previously demonstrated that SP was able to modulate the differentiation of

monocytes into dendritic cells (DCs) favoring the induction of a tolerogenic profile. Here, we analyzed whether SP was also able to modulate the functional profile of already differentiated DCs. SP was obtained from healthy donors. DCs were obtained from monocytes (% of purity>90) cultured during 5 days with IL-4 + GM-CSF. To analyze a possible modulatory effect mediated by SP, DCs were cultured for 24 h with SP (diluted 1/100) in the absence or presence of LPS (10 ng/ml). We analyzed: a) cell viability (anexinV/propidium iodide), b) the phenotype of DCs (flow cytometry), c) the production of IL-1, TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12p70 (ELISA), and d) DC ability to trigger the expansion of CD25+/FOXP3+ T cells in the mixed lymphocyte culture. We found no differences in the viability of DCs cultured in the absence or presence of SP (% of viability >90). SP did not change the phenotype of DCs cultured either in the absence or presence of LPS. On the contrary, SP significantly inhibited (p<0,05) the production of IL-1, IL-6, TNF- α and IL-12 triggered by LPS: % of inhibition 37.5 ± 13.15 , 43.45 ± 2.87 , 69.8 ± 17.31 , 81.2 ± 11.07 , respectively (n=4-8) without modifying the production of IL-10. Finally, we found that SP improved the ability of DCs to induce the expansion of CD25+/FOXP3+ T cells: LPS vs LPS + SP = 6.0 ± 5.0 vs 20.4 ± 8.3 , p<0,05. Our results suggest that, acting on already differentiated DCs, SP induce the acquisition of a tolerogenic profile.

182. (217) ORALLY-INDUCED CD4+ CD25+ FOXP3+ TREG SUPPRESSED FOOD ALLERGIC REACTIONS

Smaldini, Paola Lorena; Orsini Delgado, María Lucia; Fos-sati, Carlos Alberto; Docena, Guillermo Horacio
Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP

Food allergy is an immune-mediated adverse reaction to food and its prevalence has increased worldwide. Defects in Treg cells have been reported in patients with food allergies, suggesting that an impaired tolerance may play a key role in the intestinal allergic inflammation. We aimed to assess the suppressive effect of regulatory T cells to alleviate food allergy in a mouse model. Balb/c mice were orally given CMP (CMP_{prev}) prior to oral sensitization with CMP and cholera toxin (prevention), or after sensitization (desensitization) (CMP_{des}). Mice were orally challenged with CMP and the immune response was evaluated with *in vivo* (clinical score and cutaneous tests) and *in vitro* assays (serum specific IgE, IgG1, IgG2a; IL-5, IL-13, IFN- γ , IL-10 and TGF- β secretion by spleen cells, and analysis of Treg cells in the intestinal mucosa). *In vitro* and *in vivo* induced-Treg cells were intravenously transferred to naïve mice before sensitization. We found that symptoms were controlled with oral administration of CMP, with a concomitant negative skin test. Accordingly, serum specific IgE and IgG1 were abrogated (IgE: 1.57 ± 0.2 vs 0.87 ± 0.2 CMP_{des}; 0.52 ± 0.1 CMP_{prev}), and a substantial reduction in the secretion of IL-5 and IL-13 by stimulated spleen cells from sensitized mice was observed. Importantly, we found that IL-10 and TGF- β were induced with treatment along with an induction of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells ($1.02 \pm 0.3\%$ vs $10.5 \pm 0.5\%$ CMP_{des}; $4.30 \pm 0.2\%$ CMP_{prev}) and IL-10- and TGF- β -producing regulatory T cells (Tregs) in the lamina propria and in MLN. Mice that received Treg by adoptive transfer showed alleviated clinical signs, low levels of serum IgE and induced a negative skin test. We concluded that the oral administration of milk proteins pre- or post-sensitization with CMP induced lamina propria Treg, that restored tolerance and subsequently controlled the allergic response.

183. (257) THE CHOLINERGIC SYSTEM MODULATES THE PHYSIOLOGY OF DENDRITIC CELL ACTIVATED BY TSLP.

Gori, María Soledad¹; Vermeulen, Mónica¹; Sabbione, Florencia¹; Towstyka, Nadia¹; Ruiz, Marianela¹; Scordo, Walter²; Jancic, Carolina¹; Geffner, Jorge³; Salamone, Gabriela¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Servicio de Medicina Transfusional, Hospital Italiano de Buenos Aires² Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS)-CONICET-UBA³

Acetylcholine (ACh) is the major neurotransmitter of Parasympathetic Nervous System. The functions of ACh are mediated through muscarinic (mAChR) and nicotinic receptors (nAChR). The ACh plays a key role in allergic diseases, as well as the Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), which triggers dendritic cell-mediated T helper (Th)2 inflammatory responses. Previously, we describe the presence of mAChR, ChAT and AChE (enzymes that synthesized and hydrolyzed ACh, respectively) in human myeloid dendritic cells (DC) and its activation by cholinergic agonists. In this work, we evaluated the TSLP-activated DC (TSLP-DC) physiological modulation by ACh. The monocytes were isolated from peripheral blood obtained from healthy nonsmoker donors, by positive selection (CD14, Miltenyi, % purity >95), and then were cultured with GM-CSF and IL-4 for 5 days for obtain DC. The TSLP-DC and DC were cultured with or without ACh 10^{-8} M for 24hs and we observed an increase in the expression of co-stimulatory molecule OX40L in TSLP-DC ($p < 0,05$) and ACh-DC ($p < 0,001$) compared with untreated DC (DC), as well as in TSLP+ACh-DC ($p < 0,05$) compared with TSLP-DC. Also the TSLP+ACh-DC increased the production of TNF-alpha and IL-8 compared with TSLP-DC and ACh-DC ($p < 0,05$). However, this was not observed when we evaluated the production of cytokines Th2 chemoattractants, TARC and MDC, despite the increase observed in TSLP-DC and ACh-DC compared with untreated DC ($p < 0,05$ in TARC, $p < 0,01$ in MDC). On the other hand, the ACh-DC ($p < 0,05$) increased the stimulation of the allogeneic T cell response and we observed an increase of production of IL-2 ($p < 0,05$), TNF-alpha ($p < 0,05$) and IL-13 ($p < 0,05$) in TSLP+ACh-DC compared with ACh-DC. In conclusion, these results suggest that the DC was pre-activated by TSLP enhanced even more proinflammatory cytokines production and Th2 CD4+ T cell allogeneic response when it was also incubated with ACh.

ENDOCRINOLOGÍA 2

- 184. (407) EFECTO DIFERENCIAL DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA COMPETENCIA DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS ADIPOCITARIAS (CPAS) AISLADAS DE TEJIDO ADIPOSO ABDOMINAL Y SUBCUTÁNEO**
 Frontini López, Yesica Romina¹; Rey, María Amanda¹; Zubiría, María Guillermina¹; Spinedi, Eduardo²; Giovambattista, Andrés¹
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-CONICET¹ Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET²

Aunque es conocido que los glucocorticoides (GCs) ejercen varias funciones sobre el tejido adiposo (TA) y que su exceso favorece la acumulación de TA abdominal (TAA) pero no de subcutáneo (TASC), poco se sabe del efecto de GCs sobre la competencia de CPAs. En el presente trabajo evaluamos el efecto de dexametasona (DXM) sobre la competencia de CPAs provenientes de TAA (retroperitoneal) y de TASC (inguinal). Se aislaron células de la fracción estroma vascular (FEV) de ambos TAs de ratas S-D macho adultas, se cultivaron hasta alcanzar confluencia, y luego fueron incubadas con medio solo o conteniendo DXM (0,25 y 2,5 μ M) durante 48 hs. Finalizado este periodo: a) se evaluó la expresión génica (qPCR) de PPAR γ 2, Zfp423, WNT10b y de receptores de GC (RG) y de mineralocorticoide (RM) en las células sin diferenciación (d0); o b) se indujo la diferenciación adipocitaria y se determinó la expresión de PPAR γ 2 (d4) y el contenido lipídico por Oil Red O (d10). Los resultados indican que el pre-tratamiento con DXM indujo un incremento de los niveles de PPAR γ 2 a d0, parámetro de competencia de las CPAs, en ambos TAs, siendo mayor este estímulo en el TAA ($p < 0,05$). Además la expresión de RG y RM aumentó en las células aisladas del TAA tratadas con DXM ($P < 0,05$) y no en las del TASC; sin embargo, no hubo cambios en el ARNm de WNT10b y Zfp423 en las células de ambos TAs. Cuando las células de ambos TAs fueron pre-tratadas con DXM e inducidas a su diferenciación mostraron un incremento ($p < 0,05$) de ARNm de PPAR γ 2 (d4) y del contenido lipídico intracelular (d10), siendo este último mayor en el TAA comparado con el TASC ($p < 0,05$). Los resultados indican que los

GCs aumentan la competencia y la capacidad adipogénica de las CPAs contenidas en la FEV del TA, efecto más pronunciado en células provenientes de TAA que de TASC. Este estudio sugiere que en estados caracterizados por exceso de GCs endógeno se favorece la expansión hiperplásica del TAA por encima de la del TASC. PICT20130930

- 185. (413) RATONES HEMBRA QUE SOBREENPRESAN EL RECEPTOR CLÁSICO DE PROGESTERONA TIPO A (PR-A) DESARROLLAN PROLACTINOMAS. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ESTEROIDEOS DE MEMBRANA**
 Camilletti, María Andrea¹; Recouvreux, Sol²; Faraoni, Erika¹; Abeledo, Alejandra¹; Calabró, Lara¹; Simian, Mariana²; Díaz-Torga, Graciela¹; Bottino, María Cecilia¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Instituto de Oncología "Dr. Ángel Roffo"²

En nuestro laboratorio estudiamos el efecto de la progesterona en la génesis de prolactinomas. La función de la progesterona en hipófisis es controvertida y aún no ha sido estudiado el rol local de los receptores de progesterona de membrana, de los cuales se han comprobado efectos antiapoptóticos/proliferativos en otros tejidos. Es sabido que la función de la progesterona depende de un regulado balance entre los receptores nucleares clásicos PR-A/PR-B. En este trabajo evaluamos las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis en ratones hembra en los que la relación natural de PR-A/PR-B ha sido alterada por la introducción de un transgen adicional de PR-A (PRA+). Observamos que las hembras PRA+ adultas poseen elevados niveles séricos de progesterona y de prolactina, respecto a sus pares controles (wt en diestro). En forma concomitante, el tamaño hipofisario también se encontró incrementado. Cuando evaluamos el impacto de la sobreexpresión de PR-A sobre la expresión de otros receptores de esteroides (ARNm medido por qRT-PCR en tiempo real) encontramos disminuida la expresión del receptor de estrógenos alfa (ER α) y aumentadas las expresiones de los receptores de progesterona de membrana (Pgrmc1, mPR α y mPR β). Asimismo, la expresión hipotalámica de la enzima tirosina hidroxilasa (TH, enzima limitante en la síntesis de dopamina) se encontró disminuida. Postulamos que el aumento en la expresión de receptores esteroides de membrana en las hembras PRA+, en conjunto con una disminución de TH hipotalámica, predispone a la hipófisis a los efectos proliferativos de los esteroides, favoreciendo el desarrollo de un prolactinoma.

- 186. (419) EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CONSTITUTIVAS EN LA GLÁNDULA MAMARIA AL FINAL DE LA LACTANCIA**
 Campo Verde Arbocco, Fiorella¹; Sasso, Corina Verónica²; Nasif, Daniela Lucía^{1,3}; Hapon, María Belén^{1,3}; Jahn, Graciela Alma¹
Laboratorio de Reproducción y Lactancia – Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza¹ Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer - IMBECU-CONICET, Mendoza² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza³

La involución mamaria involucra eventos celulares como la expresión de marcadores de involución y re-estructuración del tejido mamario. En resultados previos mostramos que el hipotiroidismo (hipoT) genera éstasis de leche, altera la señalización de prolactina, invierte el perfil del ARNm de los receptores de estrógeno α y β (ER α y ER β) y disminuye la síntesis de las principales proteínas de la leche. Además demostramos que el hipoT adelanta la re-estructuración de tejido mamario sin alterar la expresión normal de genes característicos de la primera fase de involución. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del hipoT sobre el nivel de expresión de proteínas estructurales consideradas de mantenimiento y de expresión constitutiva de las células mamarias. Analizamos el nivel proteico de Actina y Tubulina como indicadores de la organización del citoesqueleto, de GAPDH como indicador de actividad metabólica, de Lamina

como indicador del mantenimiento de la membrana nuclear y del ER β como control interno de expresión constante. Se usaron ratas Wistar hembras tratadas con 0,1 g/l PTU (hipoT) en el agua de bebida (n=6). Al final de la lactancia (L21) se obtuvo el homogenato proteico a partir de las glándulas mamarías inguinales y se determinó el contenido de las proteínas mencionadas mediante Western Blot. En el final de la lactancia existe una desestructuración del tejido mamario. El grupo control presentó alterado el nivel proteico de las principales proteínas estructurales, aun siendo que mantuvo constante el nivel proteico del ER β . El hipoT produjo un marcado aumento en el nivel proteico de las proteínas estructurales Actina, Tubulina y Lamina respecto al grupo control ($p < 0,05$). En L21 no se detectó la expresión de GAPDH en ningún grupo estudiado. Podemos concluir que el hipoT genera aumento en nivel de proteínas del citoesqueleto y membrana nuclear, en lo que podría reflejar un retorno prematuro a la arquitectura de la glándula mamaria virgen.

187. (431) MODULACIÓN DE HEMOOXIGENASA-1 POR HISTAMINA

Correa Torrado, María Florencia¹; Abiuso, Adriana M. Belén¹; Besio Moreno, Marcos¹; Mondillo, Carolina¹; Pignataro, Omar Pedro^{1,2}; Pereyra, Elba Nora¹
Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²

Previamente hemos descripto que la inducción de la hemooxigenasa-1 (HO-1) modula la esteroidogénesis en células de Leydig (CL). Nuestro laboratorio ha reportado también un efecto bifásico de la histamina sobre la esteroidogénesis en CL, observándose un efecto inhibitorio a través de receptores H1 (RH1) a concentración 10^{-5} M, o estimulador a través de receptores H2 (RH2) a concentración 10^{-9} M. Objetivo: Investigar la modulación de la expresión de HO-1 por histamina en CL, evaluando su posible participación en la regulación de la esteroidogénesis. Métodos: Se utilizó la línea celular MA-10 de CL como modelo experimental. Se estudiaron los niveles de HO-1 por Western Blot, la síntesis de progesterona por RIA y la expresión y localización subcelular de HO-1 por inmunocitoquímica. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal y procesadas con Photoshop. Resultados: Se observó que histamina tanto a 10^{-9} como a 10^{-5} M disminuyó los niveles de la enzima estimulada por hemina, no alterando los niveles basales de HO-1. Tanto la esteroidogénesis basal como la estimulada con dbAMPc se vio afectada por la incubación simultánea de las células con hemina e histamina 10^{-9} M o 10^{-5} M. Ambas concentraciones revirtieron la inhibición producida por hemina sobre la síntesis de progesterona. Además se observó una disminución en los niveles de HO-1 tanto en presencia de hemina más FMPH (agonista RH1) como de hemina más AMTH (agonista RH2). En condiciones basales, la distribución de HO-1 entre núcleo (N) y citoplasma (CIT) fue 1/1, mientras que en células estimuladas con hemina o con dbAMPc, se observó una distribución diferencial: hemina N/CIT=1/2, dbAMPc N/CIT=1/0,75. Conclusión: Los resultados sugieren que los niveles de HO-1 son modulados por histamina a través de los subtipos de receptores H1 y H2. (Subsidios: CONICET y UBA a OPP).

188. (438) EXPRESIÓN DE RECEPTORES NOTCH Y SU LIGANDO JAGGED EN TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS

Gazza, Elias¹; Perrone, Sofía¹; Demarchi, Gianina¹; Zubeldia Brenner, Lautaro³; Baccharini, Leticia¹; Picard, Nelson⁴; Becú-Villalobos, Damasia³; Berner, Silvia Inés²; Cristina, Carolina¹
Centro de Investigación y Transferencia del Noroeste Bonaerense (CIT NOBA), Junín, Buenos Aires¹ Servicio de Neurocirugía, Hospital Santa Lucía² Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET³ Servicio de Neurocirugía, Clínica La Pequeña Familia, Junín, Buenos Aires⁴

La señalización Notch ha sido reportada en diversos tipos de cáncer con un rol promotor o represor del crecimiento tumoral dependiendo del contexto celular. Esta vía participa en el mantenimiento de células madre, las cuales se proponen como potenciales responsables del desarrollo y reincidencia de los adenomas hipofisarios. La vía Notch comprende 4 receptores (Notch1-4). La señalización se inicia con la interacción del receptor con su ligando (Jagged1,2 y Delta1,3,4) en una célula vecina, desencadenando la translocación del dominio intracelular de Notch al núcleo y activando la transcripción de genes blanco. El objetivo del trabajo fue analizar la expresión de componentes de la vía Notch en muestras de tumores hipofisarios obtenidas de pacientes derivados a cirugía del Hospital Santa Lucía (CABA) y de la clínica La Pequeña Familia (Junín), para evaluar la expresión de *NOTCH1*, *NOTCH3* y *JAGGED1* por qRT-PCR y de *NOTCH3* por inmunohistoquímica. El patrón de expresión de Notch resultó diferencial en los distintos tipos de adenomas hipofisarios. Detectamos una elevada expresión del receptor *NOTCH1* a nivel de ARNm en corticotropinomas y somatotropinomas respecto a los no funcionantes. Se detectó expresión de ARNm de *NOTCH3* en adenomas no funcionantes, corticotropinomas y somatotropinomas ($p > 0,05$, NS). A nivel de la proteína, detectamos una tendencia a una mayor expresión de *NOTCH3* en corticotropinomas, respecto al resto de los adenomas ($p = 0,06$) con una localización característica en grupos aislados de células. De manera interesante también detectamos *NOTCH3* en la glándula normal. Hallamos expresión del ligando, Jagged1, en todos los adenomas estudiados, sin diferencias entre los distintos histotipos. Estos resultados proponen la participación de la vía Notch en el desarrollo de los adenomas hipofisarios y probablemente la existencia de células madre/progenitoras intratumorales, ampliando así los potenciales abordajes terapéuticos de estos adenomas.

189. (449) EL ESTADO TIROIDEO MODULA IN VIVO EL CRECIMIENTO TUMORAL MEDIANTE LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Sterle, Helena A¹; Valli, Eduardo¹; Paulazo, María Alejandra¹; Cayrol, María Florencia¹; Díaz Flaqué, María Celeste¹; Klecha, Alicia Juana²; Barreiro Arcos, María Laura¹; Cremaschi, Graciela Alicia^{1,2}
Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²

Previamente demostramos que las hormonas tiroideas (HTs) son capaces de regular la funcionalidad del sistema inmune. Sin embargo, el efecto del estado tiroideo sobre las respuestas antitumorales es muy controversial. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del hiper- e hipotiroidismo sobre la proliferación de líneas celulares creciendo *in vivo* como tumores sólidos en ratones singéneos. Para ello, animales C57BL/6J o BALB/c fueron tratados con tiroxina (12mg/l) por 30 días o propiltiouracilo (500mg/l) por 15 días en el agua de bebida, con el fin de obtener ratones hipertiroideos (hiper) o hipotiroideos (hipo), respectivamente. Los animales fueron inoculados subcutáneamente con células de las líneas de carcinoma mamario 4T1, de melanoma B16F1 o de linfoma T EL-4. Los animales hiper mostraron una mayor velocidad de crecimiento tumoral para todas las líneas tumorales, evidenciada por un mayor volumen de dichos tumores ($p < 0,05$). Sólo los animales hipo inoculados con células 4T1 presentaron una menor velocidad de crecimiento tumoral respecto de los animales eutiroideos ($p < 0,05$). La evaluación de componentes del sistema inmune muestra que los animales hiper tienen un mayor número de células linfocíticas en ganglios linfáticos y en bazos. Estos animales presentan una distribución diferencial de subpoblaciones linfocitarias sólo en bazos, con un incremento en el porcentaje de células NK ($p < 0,05$). Además, los bazos de animales hiper inoculados con células EL-4 mostraron un menor porcentaje de células supresoras de origen mieloide (MSC), respecto de los eutiroideos ($p < 0,05$). Sin embargo, los animales hiper inoculados con células B16F1 y 4T1 mostraron un porcentaje mayor de MSC ($p < 0,05$), respecto de los animales controles. Estos resultados sugieren que el estado tiroideo es

capaz de modular el crecimiento de diferentes tumores a través del control de la respuesta inmune antitumoral.

190. (492) ROL DEL GLP-1 EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN PERROS CON SÍNDROME DE CUSHING Y EN PERROS OBESOS

Miceli, Diego; Cabrera Blatter, María Fernanda; Vidal, Patricia; Castillo, Víctor; Pignataro, Omar
Hospital Escuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Introducción: El Síndrome de Cushing (SC) es una de las endocrinopatías más prevalentes en perros. El hipercortisolismo induce un estado de insulinoresistencia que predispone a la Diabetes Mellitus (DM). En estudios previos, observamos que el 10% de los perros con SC desarrollan DM. El GLP-1 (glucagon-like peptide 1) es un péptido intestinal que potencia la secreción de insulina. En humanos con DM, los niveles de GLP-1 se encuentran reducidos. El objetivo del estudio fue evaluar las concentraciones de GLP-1, glucemia, insulinemia e índices HOMA en perros con SC y en perros obesos. Metodología: Se estudiaron 18 perros, los cuales fueron distribuidos en 3 grupos (normopesos, obesos y SC). A todos se les realizó el Test de Tolerancia Oral a la Glucosa. El protocolo de extracciones fue: tiempo basal, 15, 30, 60, 120 minutos para dosar GLP-1, glucemia e insulinemia. Se calculó el HOMA^{insulinosensibilidad} y HOMA^{función-células β} . Se utilizaron los test de Friedman/Mann-Whitney seguidos por el test de Dunn. Valores expresados como medianas y rangos intercuartiles ($p < 0,05$). Resultados: Los niveles de GLP-1 e insulina fueron mayores en los perros con SC respecto a los demás grupos ($p < 0,001$). Un perro con SC desarrolló DM dos meses después del estudio y fue el que presentó los niveles más altos de GLP-1 e insulina. Las glucemias fueron mayores en los perros con SC ($p < 0,01$). El HOMA^{insulinosensibilidad} se encontró disminuido en los perros con SC ($p < 0,01$) y el HOMA^{función-células β} se halló más elevado en los perros con SC ($p < 0,01$). Conclusiones: Los perros con SC presentan mayores niveles de GLP-1 (en ayuno y luego de la sobrecarga de glucosa), glucemia e insulinemia, menor sensibilidad insulínica y mayor funcionalidad de la célula- β pancreática. Los obesos presentan un comportamiento intermedio entre los perros con SC y los normopesos. Los mayores niveles de GLP-1 del SC podrían agotar a la célula- β y así predisponer el desarrollo de DM.

191. (538) FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A ENFERMEDAD TIROIDEA Y EMBARAZO

Melillo, Claudia M.^{1,2,4}; Prener, Paola C.^{1,2,5}; Cabral, Agustina S.^{1,2,3}; Suecun, M. Olga^{1,2,3}
Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata¹ Cátedra de Endocrinología y Laboratorio de Salud Pública² Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-Conicet³ Instituto Médico Mater Dei, La Plata⁴ Hospital San Juan de Dios, La Plata⁵

Es bien conocido que la disfunción tiroidea clínica o subclínica en el embarazo está relacionada a complicaciones maternas y fetales. Además, diversos estudios vinculan a estas patologías con dificultades en la concepción. El objetivo de este trabajo fue tratar de relevar los factores de riesgo, las posibles asociaciones entre ellos y el perfil tiroideo en embarazadas del primer trimestre y en mujeres bajo estudios preconcepción. Se reclutaron embarazadas cursando el primer trimestre, menores (E1, n: 170) y mayores (E2, n: 180) de 30 años de edad. Se las comparó con un grupo de no gestantes con deseos de embarazarse, menores (N1, n: 180) y mayores (N2, n: 185) de 30 años. Se siguieron las recomendaciones de la Sociedad Americana de Endocrinología para la evaluación de los factores de riesgo (FR). Se determinaron los niveles séricos de Tiroxina (TSH), Tiroxina total y libre (T4T y T4L) y anticuerpos antitiroideos (aa) por Fluorescencia y Quimioluminiscencia. En E1, el 14% de las pacientes tenía por lo menos un FR y el 8% al menos dos. En el grupo E2, el 20% tenía un FR y el 12% más de uno. En los grupos preconcepción N1 y N2, el 16 y 25% un FR y el 20 y 32% más de un FR, res-

pectivamente. Las asociaciones más comunes en los grupos E y N fueron hipotiroidismo con aa positivos y síntomas y signos clínicos de disfunción tiroidea con aa positivos. La TSH promedio aumentó significativamente según la edad en cada grupo ($X \pm ES$; E2: $1,85 \pm 0,63$ vs E1: $1,33 \pm 0,55$ $\mu\text{UI/mL}$ y N2: $2,80 \pm 0,58$ vs N1: $2,10 \pm 0,75$ $\mu\text{UI/mL}$, $p < 0,05$). Los niveles de T4 y T4L no mostraron diferencias significativas. Los títulos de aa más elevados se observaron en mujeres no gestantes mayores de 30 años. La tasa de embarazo fue de 33% en N1 y 22% en N2. Nuestros resultados evidencian una clara relación entre niveles de Tiroxina, autoinmunidad y edad en la mujer, avalando el estudio del eje tiroideo durante la preconcepción y el embarazo.

192. (539) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LOS EFECTOS APOPTÓTICO Y ANTIPROLIFERATIVO DE LA PROLACTINA SOBRE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS

De Dios, Nataly¹; Zarate, Sandra¹; Gottardo, María Florencia¹; Magri, María Laura¹; Seilicovich, Adriana¹; Goffin, Vincent²; Pisera, Daniel¹; Ferraris, J¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)¹ Institute Necker Des Enfants Malades, Inserm U845, Université Paris Descartes, France²

A diferencia de los efectos descriptos habitualmente para la prolactina (PRL), esta hormona induce apoptosis e inhibe la proliferación de lactotrofos, contribuyendo a la regulación de los procesos de renovación celular que ocurren en la adenohipófisis. El receptor de PRL (PRLR) presenta una isoforma corta y una isoforma larga (LPRLR), las cuales pueden desencadenar diferentes señales intracelulares. Nuestro objetivo fue identificar las vías de señalización que median los efectos apoptótico y antiproliferativo de la PRL en la adenohipófisis. Tanto las células adenohipofisarias en cultivo como los lactotrofos de la línea celular GH3 secretan PRL de manera constitutiva. Con el objetivo de estudiar el efecto sobre los lactotrofos de la PRL liberada, células adenohipofisarias en cultivo y células GH3 fueron incubadas en presencia de un antagonista del PRLR ($\Delta 1-9$ -G129R-hPRL) durante 15' a 360'. Se determinó por western blot la fosforilación de STAT5, ERK1/2 y Akt respecto a la forma total de cada proteína. Observamos un incremento en la fosforilación de STAT5 entre los 15' y los 30', comenzado a descender a los 60' post-tratamiento. La presencia del antagonista del PRLR incrementó la fosforilación de la isoforma de 44 kDa de ERK1/2 desde los 15' hasta los 240' de tratamiento, mientras que la fosforilación de la isoforma de 42 kDa se observó sólo a los 60'. La fosforilación de Akt fue mayor a los 15' de tratamiento ($p < 0,05$, ANOVA de una vía). Además células GH3 fueron incubadas en presencia de un inhibidor de JAK2 (AG460, INH), primera quinasa que media la señalización a través del LPRLR. La presencia del INH redujo la apoptosis (células TUNEL positivas) de células GH3 (C: 18,0 IC+ 21,7 IC-15,3, INH: 12,4 IC+15,6 IC-9,4 $p < 0,05$ χ^2). Nuestros resultados sugieren que la PRL induce apoptosis mediante la activación de la vía JAK2/STAT5 y que la activación del PRLR en lactotrofos involucra también la inhibición de las vías ERK1/2 y Akt.

193. (574) LA EXPRESIÓN DEL RE β FLUCTÚA DURANTE EL CICLO ESTRAL CONTRIBUYENDO AL BALANCE DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR ADENOHIPOFISARIA

Pérez, Pablo A; Wagner, Ignacio A; Mukdsi, Jorge H; Torres, Alicia I; Gutiérrez, Silvina
Centro de Microscopía Electrónica. FCM. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET

Los niveles de 17 β -estradiol (E2) fluctúan durante el ciclo estral, regulando la proliferación celular adenohipofisaria, actuando a través de sus receptores estrogénicos específicos (RE) α y β , ambos presentes en adenohipófisis. Numerosos trabajos han demostrado que en esta glándula las acciones de E2 son mediadas principalmente por el RE α , siendo poco conocidos los efectos ejercidos a través del RE β . Estos antecedentes nos inducen a estudiar la expresión del RE β durante el ciclo estral y analizar si este subtipo de RE regula la expresión de ciclina D1. Se utilizaron adenohipófisis de ratas Wistar hembras en diferentes etapas del

ciclo estral y células GH3 transfectadas para la sobre-expresión del RE β (GH3 β +). Se realizaron estímulos con 17 β -estradiol y DPN (agonista del RE β). Se cuantificó la expresión del RE β por citometría de flujo (CF) y se determinó la expresión de ciclina D1 por western blot. Análisis estadístico ANOVA-Tukey. Por CF se determinó que 34,12 \pm 7,7% de células obtenidas de glándulas de ratas en diestro expresaron el RE β , durante el proestro 35,4 \pm 2,5% fueron RE β +, observándose un descenso en la expresión de este subtipo en estro, 18,79 \pm 1,1%. En células GH3 la expresión del RE β fue de 0,94 \pm 0,17%, con un 24,87 \pm 2,13% de GH3 β + luego de la transfección. En células adenohipofisarias de ratas en proestro y en estro, los niveles de ciclina D1 se incrementaron en relación a los encontrados en diestro. La sobre-expresión del RE β en células GH3 disminuyó los niveles de ciclina D1 y el estímulo con DPN inhibió completamente su expresión. Estos resultados indican que los niveles del RE β en adenohipofisis fluctúan durante el ciclo estral y sugieren que su expresión es modulada por E2. El RE β ejercería un rol inhibitorio sobre la proliferación celular adenohipofisaria con participación de ciclina D1, adecuando la población celular y su funcionalidad a los requerimientos del organismo.

194. (587) EFECTO MODULADOR DEL INGAP-PP SOBRE LA FUNCIÓN SECRETORA DE LAS CÉLULAS B: POSIBLE ROL DE LA ANGIOGENESIS INSULAR

Roman, Carolina Lisi¹; Maiztegui, Bárbara; Flores, Luis Emilio; Gagliardino, Juan José
 Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata

Introducción: Las células endoteliales estimulan la expresión del gen de insulina en las células B mientras que el déficit de VEGF-A disminuye la secreción de esta hormona debido a la inadecuada vascularización insular. La administración de INGAP-PP a ratas normales produce un aumento de la masa y función celular β junto con un incremento de marcadores angiogénicos. Objetivo: determinar el posible rol de la neogénesis vascular insular en el mecanismo por el cual el INGAP-PP potencia la secreción de insulina inducida por glucosa. Materiales y Métodos: Se aislaron islotes de ratas Wistar macho normales por digestión con colagenasa y se cultivaron durante 4 días en medio RPMI con glucosa (G) 10 mM sin (C) o con el agregado al medio de 10 μ g/ml de INGAP-PP (I), con el agregado de 10 ng/ml de VEGF-A (V), y los grupos C e I en presencia de 10 ng/ml de rapamicina (inhibidor de angiogénesis) (R e I+R respectivamente), quedando conformados 5 grupos experimentales. Al finalizar el cultivo, se midieron los niveles de V liberados al medio por ELISA y los islotes se mantuvieron en medio con G 3,3 mM a 37°C por 45 min, para luego incubarse 1 h en presencia de distintas concentraciones de G. La insulina secretada al medio (SI) se midió por RIA. Resultados: (p<0,05: *vs. C; #vs. I; &vs. V) La secreción de V (pg/ml) fue significativamente mayor en el grupo I (C: 109,94 \pm 9,35; I: 139,73 \pm 11,60*; R: 73,01 \pm 7,89**#; I+R: 73,44 \pm 6,91**). En presencia de G 3,3 mM la SI (ng/isl/h) fue similar en todos los grupos, mientras que frente a G 16,7 mM fue significativamente mayor en los grupos I y V y menor en R (C: 0,63 \pm 0,03; I: 0,77 \pm 0,03*; V: 0,81 \pm 0,04*; R: 0,50 \pm 0,04**#; I+R: 0,62 \pm 0,04**#). Conclusión: La activación de la vía del VEGF participaría activamente en el efecto potenciador del INGAP-PP sobre la secreción de insulina inducida por glucosa.

195. (615) LA PALMITOILACIÓN DEL RE α INDUCIDA POR E2 PROMUEVE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES ADENOHIPOFISARIAS

Sosa, Liliana¹; Chumpén, Sabrina²; Vaca, Alicia Maldre¹; Gutiérrez, Silvana¹; Pettiti, Juan Pablo¹; De Paul, Ana Lucía¹; Valdez-Taubas, Javier²; Torres, Alicia Inés¹
 Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET¹ Centro de Investigaciones en Química Biológica (CIQUIBIC)-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.²

El agregado del residuo palmitato al receptor estrogénico α (RE α) es un paso crítico en los efectos rápidos inducidos por

E2, ya que posibilita el tráfico del receptor hacia la membrana plasmática, siendo aún desconocido si esta modificación post-traducciona ocurre en hipofisis. En este trabajo nos propusimos determinar la palmitoilación del RE α en células adenohipofisarias y su implicancia en el efecto del E2 iniciado en la membrana plasmática que desencadena la proliferación celular. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata Wistar hembra y de la línea tumoral GH3 fueron tratados con E2 (10nM) por 30 min. La palmitoilación del RE α fue evaluada por el método de intercambio acil-biotina (ABE) y los niveles de ARNm de las palmitoilasas DHHC-7 y -21 se determinaron por RT-PCR luego de 24h de estímulo con E2. El efecto proliferativo fue cuantificado mediante la incorporación de BrdU observada luego de 24h por inmunocitoquímica. La expresión del RE α y ERK total y fosforilada fue analizada por WB. Además, se utilizó el inhibidor de la palmitoilación: 2bromo palmitato (2BP, 10 μ M). Estadística: Test-t. En cultivos primarios el estímulo con E2 indujo la palmitoilación del RE α , mientras que en células GH3 la palmitoilación basal del RE α aumentó con el tratamiento de E2. La expresión del ARNm de DHHC-7 y DHHC-21, enzimas involucradas en la palmitoilación de los receptores esteroideos endógenos fue evidenciada en células normales y tumorales. En cultivos primarios el estímulo de E2 no produjo cambios en la actividad mitogénica de lactotropas. Mientras que, E2 indujo un aumento significativo de la proliferación de células tumorales, en forma coincidente con la fosforilación de ERK1/2, efectos que fueron parcialmente inhibidos por pre-incubación con 2BP. Estos resultados sugieren que la palmitoilación del RE α contribuiría en los efectos del E2 iniciados en la membrana plasmática desencadenando la proliferación de células tumorales adenohipofisarias.

REPRODUCCIÓN 2

196. (309) SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS) Y PÉRDIDA DE LA INTEGRIDAD VASCULAR: ROL DE LAS CÉLULAS VASCULARES DE MÚSCULO LISO (VSMCS)

Pascuali, Natalia M¹; Scotti, Leopoldina¹; Abramovich, Dalhia¹; Di Pietro, Mariana¹; Gómez Peña, Mariana²; De Zúñiga, Ignacio²; Bisioli, Claudio²; Tesone, Marta¹; Parborelli, Fernanda¹
 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ PREGNA Medicina Reproductiva²

El Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (OHSS) es una complicación iatrogénica severa del crecimiento folicular generada por las gonadotropinas en tratamientos de fertilización asistida. Se caracteriza por un aumento significativo de la permeabilidad vascular y presencia de ascitis. Previamente, observamos niveles aumentados de ANGPT1 y niveles disminuidos de PDGFB y de S1P en fluidos foliculares (FF) provenientes de pacientes OHSS comparado con FF normales. Hasta ahora no existe ningún trabajo que evalúe el efecto directo de los FF sobre la madurez e integridad vascular. Los objetivos fueron: a) Optimizar un cultivo primario de células vasculares de músculo liso (VSMCs) de aorta de rata adulta y b) Evaluar el efecto de los FF OHSS en el cultivo VSMCs sobre la migración celular, la reorganización de los filamentos de actina, y la expresión de N-caderina, PDGFR β , β -catenina y S1P1 (receptor del esfingolípido S1P). Para corroborar el fenotipo VSMC, se realizó inmunocitoquímica para los marcadores α -actina, PDGFR β y desmina. Los resultados mostraron marca positiva en el total de las células. Además, se observó por ensayo de herida que la migración en presencia de FF OHSS fue mayor respecto de FF normales. Por inmunofluorescencia, se observó que la incubación de VSMCs con FF OHSS provoca cambios en la forma celular debido a la redistribución de los filamentos de actina comparado a FF normales. Por western blot, se observó que los niveles de N-caderina y β -catenina disminuyeron significativamente al incubar VSMCs con FF OHSS, comparado a los FF normales. Sin embargo, no se vieron cambios en los niveles de PDGFR β y de S1P1. En conclusión, la permeabilidad vascular característica de pacientes OHSS estaría causada no sólo por alteraciones en células endoteliales, sino también en las VSMCs

que las recubren. Mediante esta nueva herramienta, se puede estudiar la integridad vascular ovárica y evaluar distintas estrategias terapéuticas en pacientes OHSS y en otras disfunciones ováricas con angiogénesis alterada.

197. (350) EFECTO DE FLUTAMIDA EN LA EXPRESIÓN DE SERPINA 1 F EN TEJIDOS DE RATA

Monclus, María de los Ángeles^{1,2,3,4}; López, María Elisa²; Simón, Layla^{1,4}; Sáez Lancellotti Estefanía^{1,2,3,4}; Fornes Miguel Walter^{1,2,3,4}
Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM)¹ Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo² Centro de Investigaciones de la Universidad del Aconcagua (CIUDA)³ CONICET⁴

Antecedentes: La asociación epididimaria de espermatozoides es un fenómeno observado en numerosas especies de mamíferos. Cuando los espermatozoides maduros alcanzan la cola del epidídimo pueden asociarse entre sí mediante sus cabezas formando estructuras características cuya morfología depende de cada especie. En la rata estas asociaciones se denominan Rosetas. De este modo los espermatozoides permanecen almacenados hasta la eyacuación, luego de la cual, la activación de la movilidad espermática produce que uno a uno se desprendan originando una suspensión de células móviles y aisladas. En las especies de mamíferos estudiadas, este proceso de asociación reversible se relaciona con el grado de maduración epididimaria alcanzado por los espermatozoides. En trabajos previos nuestro grupo aisló e identificó en el fluido epididimario caudal de rata la proteína Serpina 1 F perteneciente a la familia de las Serpinas (inhibidores de serin proteasas). Se relaciona la presencia de esta proteína con la formación de Rosetas y la maduración epididimaria. Objetivo: A fin de identificar si la expresión de esta proteína en distintos segmentos del tracto reproductor masculino y en otros órganos es dependiente de andrógenos, se administró previamente a los animales Flutamida durante 15 días según protocolos previamente establecidos en la bibliografía. Metodología: Mediante RT-PCR se analizaron distintos tejidos para determinar la expresión del RNAm de Serpina 1F en animales deprivados de andrógeno en comparación con un grupo control. Resultados: En los tejidos analizados de animales tratados con Flutamida no se detectó expresión de Serpina 1F mientras que sí se observó en animales control. Conclusión: Estos resultados sugieren que la expresión del ARNm de Serpina 1F es un proceso andrógeno dependiente.

198. (352) RELEVANCIA DEL VIP EN LA GESTACIÓN TEMPRANA: CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS GIGANTES (TGC) EN RATONES NORMALES Y DEFICIENTES EN EL PÉPTIDO

Hauk, Vanesa¹; Calo, Guillermina¹; Gallino, Lucila¹; Meiss, Roberto²; Ramhorst, Rosanna¹; Waschek, James³; Pérez Leirós, Claudia¹
Laboratorio de Inmunofarmacología, Depto. de Química Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA¹ Depto. de Patología, Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina² The David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, USA³

Las complicaciones gestacionales asociadas con defectos en la placentación y remodelación vascular, como la pre-eclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino, se asocian con alta tasa de morbilidad materna y neonatal. La constitución de la interfase materno-placentaria se caracteriza por cambios funcionales de células trofoblásticas que adquieren un fenotipo invasivo bajo un estricto control de la homeostasis tisular. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) activa receptores VPAC1/VPAC2 con efecto relajante muscular, inmunomodulador y trófico. Previamente propusimos que VIP participa en el mantenimiento de la homeostasis en la interfase materno-placentaria temprana, generando un microambiente favorable para la placentación y el crecimiento fetal. Con el fin de investigar la relevancia del sistema VIP/VPAC endógeno en la gestación y las principales células productoras

de VIP en la interfase temprana, en este trabajo estudiamos la gestación en ratones C57BL/6 deficientes en la expresión de VIP. En hembras VIP(+/-), (-/-) y WT apareadas con machos de esos genotipos analizamos parámetros macroscópicos (duración de la gestación, número de crías al día P1, número de embriones viables al día 9,5) y estructura de sitios de implantación al día 8,5 por IHQ. Aislamos células trofoblásticas gigantes (TGC) de los sitios al día 8,5 por microdissección por captura laser y en éstas determinamos expresión de VIP, VPAC1, VPAC2 y marcadores de TGC por RT-qPCR. Por IHQ las principales células que expresan VIP en la interfase normal son las TGC que, una vez aisladas, presentaron altos niveles de expresión de RNAm de PRL3D1, VIP y VPAC2 y menor de VPAC1 y MMP9 (P<0,05). Las madres deficientes en VIP presentaron menor número de crías (8,3±0,5 WTxWT vs 5,8±0,8 VIP(+/-)x(+/-) P<0,05). Los resultados apoyan la participación de VIP en la gestación señalando a las TGC asociadas a un fenotipo invasivo entre las principales fuentes locales.

199. (354) EL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) INDUCE MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS HUMANAS DE PRIMER TRIMESTRE

Vota, Daiana Marina¹; Hauk, Vanesa¹; Toro, Ayelén²; Grasso, Esteban¹; Papparini, Daniel¹; Varone, Cecilia²; Ramhorst, Rosanna¹; Pérez Leirós, Claudia¹
Laboratorio de Inmunofarmacología, Depto. de Química Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA¹ Laboratorio de Fisiología Molecular Placentaria, Depto. de Química Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA²

La constitución de la interfase materno-placentaria y placentación requieren la diferenciación de células trofoblásticas (Tb) a diversos fenotipos con capacidad de proliferar, formar sincicios, migrar, invadir el estroma decidual y participar en la remodelación vascular. VIP es un péptido pleiotrópico y describimos su efecto en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en la gestación temprana. Su expresión está controlada por neurotransmisores o factores de crecimiento y depende de sitios en su promotor con secuencias de elementos de respuesta a AMPc y a citoquinas de la familia gp130 como LIF e IL-6. Altos niveles de LIF en la interfase materno-placentaria se asocian a una implantación exitosa. El objetivo de este trabajo es investigar la expresión de VIP en Tb humanas de primer trimestre (línea Swan-71) estimuladas con VIP o LIF y su efecto en la diferenciación a un fenotipo con mayor capacidad de migración e invasión. La expresión de VIP se determinó por citometría de flujo y RT-qPCR. La migración se evaluó por ensayos de cierre de herida luego de 4-24 h de realizada una incisión en la monocapa. La capacidad invasiva de Tb se estudió en dispositivos tipo *transwells* cubiertos con matrigel. Las Tb expresan VIP en forma basal y su expresión es inducida significativamente luego de 18 h de incubación con VIP 10 nM (P<0,05). LIF 10 ng/ml también indujo la expresión de VIP en Tb (P<0,05). VIP aumentó la migración en monocapa en forma concentración-dependiente con un efecto máximo para VIP 50 nM (% migración: B 32±1,9; VIP 10 nM 38±5,4; 50 nM 55±2,7; 100 nM 42±2,1) (VIP 50 nM vs 10 nM P<0,05) de magnitud similar al inducido por LIF. VIP 50 nM también aumentó la invasión del matrigel por Tb (P<0,05). Los resultados sugieren la contribución de VIP endógeno a la placentación a través de inducir su propia síntesis en Tb y favorecer un fenotipo con mayor capacidad de migración e invasión en forma similar al LIF que, a su vez, aumenta la síntesis del neuropéptido.

200. (357) FOSFOPROTEÓMICA DEL OVIDUCTO EN RELACIÓN AL CICLO REPRODUCTIVO

Teijeiro, Juan Manuel¹; Marini, Patricia²
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario¹ Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario (IBR)-CONICET²

El oviducto modula, en un entorno hormonal particular del ciclo reproductivo, la fisiología de las gametas y aporta factores

esenciales para el desarrollo del embrión. En este contexto, el estudio del microambiente oviductal es requerido para comprender los mecanismos que participan en el proceso reproductivo. Un análisis detallado del proteoma oviductal requeriría del estudio de las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas. Dados el rol clave de la fosforilación de proteínas en la regulación de la fisiología celular y la importancia de la fisiología oviductal en el proceso reproductivo, el objetivo de este trabajo fue estudiar la fosforilación de proteínas oviductales en relación al ciclo hormonal reproductivo en los modelos bovino y porcino. Mediante Western blot, utilizando anticuerpos anti-fosfoproteínas, pudimos observar modificaciones en la fosforilación de proteínas oviductales por la proteína quinasa C (PKC) en bovinos en relación al ciclo estral. Resulta notable que no se observaron cambios en porcinos. Además, no se observaron modificaciones en los perfiles de proteínas fosforiladas en residuos de treonina, tirosina o en motivos de fosforilación de la proteína quinasa A (PKA) en relación al ciclo hormonal en ninguno de los modelos. Sin embargo, utilizando activadores de PKA pudo establecerse la presencia de la vía de señalización intracelular AMPc/PKA solamente en oviducto porcino y se identificaron por espectrometría de masas al menos dos proteínas fosforiladas por dicha activación. En conclusión, este estudio demuestra que se producen modificaciones en la fosforilación de proteínas a través de PKC en relación al ciclo hormonal en bovinos, mientras que en oviducto porcino no se observan las mismas, pero si demostramos en ellos la presencia y activación de la vía de señalización intracelular que involucra a PKA.

201. (362) LA DIABETES MATERNA PROGRAMA ALTERACIONES CARDÍACAS EN LA DESCENDENCIA EN FORMA GÉNERO DEPENDIENTE.

Roberti, Sabrina Lorena; Mazzucco, María Belén; Jawerbaum, Alicia; Higa, Romina Daniela
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET

El ambiente intrauterino anómalo inducido por la diabetes materna altera la programación intrauterina y constituye un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. Durante la cardiogénesis, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y las metaloproteasas de matriz (MMP) se encuentran involucrados en procesos de remodelación tisular y el receptor nuclear PPAR- α regula procesos metabólicos. La desregulación de estos procesos se vincula a la inducción de un entorno prooxidante y proinflamatorio. Objetivo: Evaluar en el corazón de crías hembras y machos de ratas sanas y diabéticas marcadores prooxidantes/proinflamatorios y de remodelación de la matriz extracelular, como así también los niveles de PPAR α y su coactivador PGC-1 α . Metodología: Ratas con diabetes pregestacional se obtuvieron por administración neonatal de estreptozotocina (90 mg/kg) y se aparearon con machos sanos. Se midió en el corazón de la cría de 2 días de edad los niveles de nitrotirosina (marcador del daño inducido por peroxinitritos), MMP9, CTGF, PPAR α y PGC-1 α por inmunohistoquímica. Resultados: En los corazones de las crías de ratas diabéticas se encuentran incrementados los niveles de MMP9 (hembra:175%, macho:255%, $p<0,05$), CTGF (hembra:160%, macho:240%, $p<0,01$) y nitrotirosina (hembra:127%, macho:226%, $p<0,01$). En los corazones de crías machos de ratas diabéticas se encuentran incrementados los niveles de PPAR α (300%, $p<0,001$) y PGC-1 α (200%, $p<0,05$), mientras que no se observan diferencias en las crías hembras de ratas sanas y diabéticas. Conclusión: La diabetes materna programa intraútero alteraciones cardíacas observándose incrementos en marcadores proinflamatorios/prooxidantes y alteraciones en la remodelación de la matriz extracelular en las crías de ratas diabéticas. En la cría macho, estas anomalías son más marcadas y se acompañan de alteraciones en el sistema PPAR α /PGC-1 α .

202. (372) EL INCREMENTO DE GRASAS SATURADAS EN LA DIETA MATERNA PROGRAMA SOBRECUMULACIÓN LIPÍDICA Y ANOMALÍAS EN LAS ENZIMAS DEL CATABOLISMO LIPÍDICO Y DE DETOXIFICACIÓN EN EL HÍGADO DE LA DESCENDENCIA

Mazzucco, María Belén; Fornes, Daiana; Jawerbaum, Alicia; White, Verónica
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET

La obesidad materna programa la inducción de síndrome metabólico en la descendencia. Previamente evidenciamos que fetos de ratas con sobreingesta de grasas saturadas presentan sobrepeso, hiperlipemia y sobrecumulación de triglicéridos hepáticos. Las enzimas acilCoA oxidasa (ACO) y carnitina palmitoil transferasa (CPT-1) son clave en el catabolismo de lípidos y los transportadores MRP (proteína de resistencia a multidrogonas) 2 y 4 en la función de detoxificación hepática. Objetivo: Investigar si la sobreingesta materna de grasas saturadas induce alteraciones en enzimas del metabolismo lipídico y detoxificación hepática en fetos y crías. Métodos: Se indujo el sobrepeso en ratas Wistar alimentándolas con un 25% de incremento en grasas saturadas dietarias. Las ratas con sobrepeso o control (alimentadas con dieta estándar) se aparearon con machos sanos. Se obtuvo hígado de fetos de 21 días de preñez y de la cría de 21 días y 4 meses de edad. Se analizaron los niveles de lípidos por TLC y la expresión génica de CPT1, ACO, MRP2 y MRP4 por RT-PCR. Resultados: En forma semejante a lo evidenciado en fetos, se encontró sobrecumulación lipídica en los hígados de la cría hembra y macho de ratas con sobrepeso comparadas con el control a los 21 días (50%; $p<0,05$) y a los 4 meses de edad (40%; $p<0,05$). En ratas con sobrepeso la expresión hepática de ACO fue menor en los fetos (25%) y crías de 21 días (15%) y 4 meses (25%; $p<0,05$) y la de CPT1 fue menor en la cría de 21 días (18%; $p<0,05$) con respecto al control. En ratas con sobrepeso, la expresión de MRP2 se encontró disminuida en fetos y la cría de 21 días (20%; $p<0,05$) y la de MRP4 en fetos (20%; $p<0,05$) respecto al control. Conclusión: El incremento de grasas saturadas en la dieta materna induce sobrecumulación lipídica hepática en la descendencia mediante mecanismos que involucran la deficiencia en enzimas del catabolismo de lípidos y programa anomalías en la función de detoxificación del organismo.

203. (398) EVALUACIÓN DEL DAÑO NUCLEAR EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS SOMETIDOS A CRIOPRESERVACIÓN

Cabral, Noelia Edith^{1,2}; Medina Méndez, Esteban Darío¹; Faut, Mónica¹; Rawe, Vanesa¹
REPROTEC - Diagnóstico y Tratamiento Reproductivo
*Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico, Universidad Maimónides*²

Introducción: Actualmente, la criopreservación de espermatozoides humanos, constituye una herramienta útil y altamente difundida en tratamientos de reproducción asistida. Sin embargo, se ha reportado que el proceso de congelación y descongelación puede tener un impacto evidenciable en la estructura y conformación del núcleo espermático. Objetivo: Evaluar el nivel de daño del ADN antes y después de la criopreservación, como medida de la crioinjuria producida durante el proceso de congelación y descongelación. Determinar si algunos parámetros seminales previos a la congelación podrían servir como predictores del impacto de la criopreservación. Diseño: Descriptivo. Medida de compactación de la cromatina a través de Azul de Anilina y Cromomicina A3. Medición de la fragmentación del ADN a través de TUNEL. Resultados: Se analizaron 44 muestras de donantes sanos, fértiles, normozoospermicos. Los valores de AA y CMA3 de las muestras se encontraban dentro de los parámetros normales. Luego de ser criopreservadas, las muestras sufrieron un aumento altamente significativo en sus niveles de fragmentación. Como método de mejoramiento post-descongelación se realizó un gradiente de selección, obteniendo como resultado una reducción significativa, aunque no completa, de estos niveles de daño. Ninguno de los parámetros seminales básicos originales (volumen, concentración, movilidad, etc.) mostraron una correlación con el nivel de daño post-congelación, por lo que no serían adecuados como estimadores de la "susceptibilidad" al daño. Conclusión: El proceso de congelación-descongelación de las muestras espermáticas tiene

como consecuencia un daño sustancial a nivel del ADN de los espermatozoides. Sin embargo, con un correcto procedimiento de selección post-descongelación, se puede disminuir significativamente estos niveles de daño, permitiendo de este modo, su utilización en técnicas de reproducción asistida de manera segura.

204. (416) EL ESTRADIOL (E2) REGULA LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE LA HORMONA ANTI-MÜLLERIANA (AMH) A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN UNA LÍNEA DE CÉLULAS DE SERTOLI PRE-PUBERALES DE RATÓN

Valeri, Clara¹; Edelsztein, Nadia¹; Riggio, Marina²; Giulianelli, Sebastián²; Lanari, Claudia²; Schteingart, Helena²; Rey, Rodolfo¹

Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr. César Bergadá (CEDIE)-CONICET- FEI, División de Endocrinología Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez¹ Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²

Las células de Sertoli del testículo prepuberal producen altos niveles de AMH. La FSH estimula y los andrógenos inhiben dicha producción durante la pubertad. En ciertas patologías, como la insensibilidad a los andrógenos, aumentan los niveles de FSH, AMH y E₂. El promotor humano de la AMH (5'hAMH) posee un hemisitio de respuesta a estrógenos (½-ERE) en posición -1772. Nuestra hipótesis es que los estrógenos están involucrados en el aumento de la producción de AMH. Para evaluar si el E₂ regula la actividad de 5'hAMH, se realizaron ensayos luciferasa luego de transfectar células SMAT1 (línea de Sertoli inmortalizada) con el vector luciferasa pGL2B controlado por diferentes 5'hAMH. Los resultados se expresan como% del control correspondiente (media±EE). En células SMAT1, la actividad de pGL2B-5'hAMH-3068pb fue estimulada en presencia de E₂ (10⁻⁹ M) cuando se cotransfectó el ERα (267,6±14,5%; p<0,01 vs basal sin E₂) pero no el ERβ (129,9±29,7%). En células cotransfectadas con ambos ER, el E₂ produjo un estímulo de pGL2B-5'hAMH-3068pb (202,9±48,7%) similar al obtenido en células con ERα solo. El efecto del E₂ fue impedido cuando se agregó el antiestrógeno ICI 182780 a 10⁻⁶M (118,8±24,2%; p<0,01 vs E₂). Estos resultados indican que la activación de 5'hAMH en respuesta a E₂ es mediada por ERα. Para evaluar si el ½-ERE en -1772 de 5'hAMH está involucrado en la respuesta al E₂, se midió la actividad de 5'hAMH en células SMAT1 cotransfectadas con ERα y pGL2B-5'hAMH-3068pb mutado en el ½-ERE (105,3±47,7%), o con pGL2B-5'hAMH truncos: de -1 a -423 (111,4±25,1%), de -1916 a -3068 (63,39±10,58%) o de -1916 a -2580 (75,07±6,20%); en todos los casos, p<0,01 vs pGL2B-5'hAMH-3068pb. Estos resultados indican que el ½-ERE es necesario para la activación de 5'hAMH en respuesta a E₂. En conclusión, el E₂ estimula la actividad del promotor de AMH en células SMAT1 en presencia del ERα. Un hemisitio ERE presente en posición -1772 del promotor de la AMH estaría involucrado en dicho efecto.

205. (423) EL RECEPTOR CB1 PARTICIPA EN LOS MECANISMOS PROINFLAMATORIOS ASOCIADOS A LA REABSORCIÓN EMBRIONARIA INDUCIDA POR LPS.

Wolfson, Manuel Luis¹; Bradshaw, Heather²; Leishman, Emma²; Schander, Julieta¹; Blanco, Julieta¹; Schiariti, Victoria¹; Correa, Fernando¹; Franchi, Ana María¹

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET¹ Department of Psychological and Brain Sciences. Indiana University²

Previamente desarrollamos un modelo de reabsorción embrionario (RE) inducida por LPS donde demostramos una elevada producción de óxido nítrico y una caída en los niveles plasmáticos de progesterona (P) como eventos centrales en la fisiopatología de la pérdida temprana de la preñez. Dado que se ha demostrado una correlación entre abortos tempranos con una alteración en la concentración plasmática de endocannabinoides, nuestro objetivo fue estudiar en este modelo de RE la posible participación del receptor CB1 en el aborto temprano y su relación con la P. En primer lugar observamos que la P revirtió el incremento, inducido

por el tratamiento con LPS, de los niveles plasmáticos de los endocannabinoides AEA, OEA, PEA y SEA (p<0,05). Durante la RE, la decidua es infiltrada por células del sistema inmune. Dada la reducida tasa de RE inducida por LPS en ratones transgénicos deficientes en el receptor CB1 (KO-CB1) comparada con la de la cepa silvestre (WT), comparamos la infiltración leucocitaria entre ambos grupos. Los ratones WT mostraron una mayor tasa de infiltración leucocitaria que los KO-CB1 (p<0,05). Esta diferencia en la infiltración leucocitaria podría deberse a una diferencia en la expresión de quemoquinas. Sin embargo, el análisis del ARNm por RT-PCR de RANTES, CXCL-10 y MCP1 no mostró diferencias significativas entre los ratones WT y KO-CB1 tratados con LPS. Cuando se analizó la expresión del ARNm de citoquinas, se observó una menor incremento de la expresión de IL-6 y TNFα (p<0,05) inducida por LPS en ratones KO-CB1 que en ratones WT. Por otro lado, al analizar la actividad de óxido nítrico sintasa de las deciduas, no se observaron cambios en su actividad en los ratones KO-CB1 desafiados con LPS mientras que en los WT se observó un incremento (p<0,05). Este trabajo demuestra que los ratones KO-CB1 muestran una menor respuesta inflamatoria al LPS lo cual podría explicar la menor tasa de RE y confirma la participación del CB1 en el aborto temprano.

206. (472) EL CANAL CFTR ES ESENCIAL PARA LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA AMPc/PKA ASOCIADA A LA CAPACITACIÓN Y PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DEL PH INTRACELULAR EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Puga Molina, Lis Del C.; Romarowski, Ana; La Spina, Florenza A.; Vitale, Alejandra M.; Buffone, Mariano G.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

El canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) es un transportador de aniones, entre ellos Cl⁻ y HCO₃⁻. Si bien se conoce que ambos iones son fundamentales para la capacitación del espermatozoide y que la inhibición de este canal produce una disminución de su capacidad fertilizante, poco se conoce acerca del rol de CFTR en los procesos moleculares asociados a la capacitación en espermatozoides humanos (spz). El objetivo de este trabajo es evaluar cómo el transporte del Cl⁻ y HCO₃⁻ mediado por CFTR afecta dos eventos asociados a la capacitación: el aumento de pH intracelular y la activación de la vía de señalización AMPc/PKA. Para ello, los spz fueron incubados en condiciones capacitantes en ausencia de Cl⁻ o en presencia del inhibidor de CFTR (CFTRinh-172). En estas condiciones, se determinaron mediante Western immunoblotting los sustratos fosforilados de PKA (pPKA) y los de Tirosina Kinasas (pY). Como resultado, tanto la ausencia de Cl⁻ como la inhibición de CFTR causaron una disminución significativa en los niveles de activación de esta vía. La estimulación farmacológica de PKA (dbcAMP + pentoxifilina) logró restaurar los niveles de pPKAs y pY en ausencia de Cl⁻ o en presencia de CFTRinh-172, sugiriendo que el efecto observado se encuentra río arriba de la activación de PKA. Para estudiar la alcalinización intracelular en la capacitación, se midió la fluorescencia de la sonda BCECF-AM mediante citometría de flujo. Tanto en ausencia de Cl⁻ como en presencia del inhibidor de CFTR, una población de spz no alcanzó el mismo nivel de alcalinización que en la condición capacitante. Proponemos que el CFTR mediaría la entrada de Cl⁻ y HCO₃⁻ y que su funcionamiento se acoplaría al de otros transportadores para regular el pH intracelular y la entrada de HCO₃⁻ necesaria para desencadenar la activación de la vía de AMPc/PKA.

207. (477) LA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA A UN HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO PROVOCA PÉRDIDAS POST-IMPLANTACIÓN

Ingaramo, Paola I; Guerrero Schimpf, Marliese; Milesi, Mercedes; Muñoz-De-Toro, Mónica; Varayoud, Jorgelina; Luque, Enrique Hugo

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)-CONICET, Universidad Nacional del Litoral

En los últimos años se ha asociado la exposición a agroquímicos con alteraciones en la fertilidad. Nos interesa evaluar si

la exposición a dosis bajas de un herbicida a base de glifosato (HBG) durante el periodo postnatal temprano, produce fallas reproductivas en ratas hembras. Ratas Wistar hembras recibieron los días 1, 3, 5 y 7 postnatales (PN) vía s.c. sol. fisiológica (C, n=21) o solución comercial de herbicida (HBG, n=21) 2 mg/kg/día de glifosato. A los 90 días PN se aparearon con machos fértiles. Cada grupo de hembras preñadas se dividió en 2 sub-grupos, sacrificados al día 9 (D9G, n=6) o 19 (D19G, n=15) de gestación. En D19G, se cuantificó el número de sitios de implantación (nSI), de reabsorción (nSR) y cuerpos lúteos (nCL) por animal. En D9G se extrajeron porciones de úteros que incluían los SI. Por IHQ se evaluó la expresión de Ki67, receptores esteroideos (receptor de estrógenos a REa y receptor de progesterona RP), desmina y Hoxa10 en la zona anti-mesometrial (AM) y en el epitelio luminal, glandular y estroma subepitelial (EL, EG y ES) de la región mesometrial. En D19G, la exposición postnatal a HBG produjo un aumento del nSR/rata. No se observaron diferencias en el nSI/rata o nCL/rata entre los grupos HBG y C. En D9G, al cuantificar la expresión de proteínas observamos que los animales expuestos al HBG presentaron una disminución de RP en AM (3,3±0,2 vs. 1,9±0,4), EL (7,8±0,8 vs. 3,4±1,0) y EG (9,9±1,6 vs. 4,3±1,8) y de REa en EG (14,6±1,8 vs. 8,6±1,1). La expresión de Ki67 en estos animales aumentó en AM (1,9±0,6 vs. 6,7±1,3) y EL (24,5±3,3 vs. 51,5±3,5). No se observaron diferencias en la expresión de Hoxa10 y desmina. Los resultados indican que la exposición a una dosis baja de un HBG provoca pérdidas post-implantación y alteraciones moleculares en el proceso de decidualización que podrían ser responsables de una menor fertilidad.

208. (479) EVALUACIÓN DE LA COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA EN PACIENTES VIH POSITIVOS.

Cabral, Noelia Edith^{1,3}; Perco, Mariano²; Faut, Mónica¹; Redini, Liliana²; Rave, Vanesa¹
REPROTEC - Diagnóstico y Tratamiento Reproductivo¹ Hospital "Dr. Francisco Javier Muñoz".² Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico (CEBAD), Universidad Maimónides³

Introducción: La técnica de 'doble lavado' de muestras de espermatozoides en tratamientos de reproducción asistida, permitieron a los hombres portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), ser padres de una manera segura en términos infectológicos. Ciertos parámetros espermáticos como el volumen, la concentración y la movilidad han sido evaluados exhaustivamente en estos hombres, sin embargo, es escasa la información acerca del impacto de la medicación antiretroviral sobre la integridad de la cromatina espermática. Objetivo: Evaluar el estado de la compactación de la cromatina espermática en hombres portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH+) en tratamiento antiretroviral, sin factor masculino y compararla con donantes sanos y pacientes VIH- pero con algún factor masculino presente. Diseño: Comparativo, experimental. Marcadores de la Integridad Cromatínica (MIC - Azul de Anilina y Cromomicina A3). Resultados: Se estudiaron un total de 288 casos: 78 hombres VIH+ en tratamiento reproductivo con parejas serodiscordantes, 123 pacientes VIH- con algún factor masculino presente y 87 donantes fértiles y sanos como grupo control. Al evaluar los parámetros seminales básicos se encontró que los pacientes VIH- y hombres VIH+ tienen el volumen, la concentración y la movilidad espermática disminuidos respecto a los donantes. Al analizar los valores de compactación de la cromatina a través del estudio de Azul de Anilina y Cromomicina A3, los hombres VIH+ mostraron valores normales y similares al de los donantes. Por su parte, los hombres con factor masculino y VIH-, mostraron valores patológicos de MIC. Conclusión: Los hombres VIH+ sin un factor masculino presente tienen un estado de compactación de la cromatina conservado y comparable a donantes normales. La presencia de un factor masculino pareciera tener mayor peso sobre los defectos de compactación de la cromatina que la infección por VIH.

209. (524) ESTUDIO DEL MECANISMO DE SUBFERTILIDAD EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATONES MACHOS B6

Funes, Abi Karenina¹; Simón, Layla¹; Della-Vedova, Cecilia²; Monclus, María de los Ángeles¹; Bernal, María Florencia¹; Jakovcevic, Daiana¹; Gómez-Mejiba, Sandra²; Sáez Lancellotti, Estefanía¹; Ramírez, Darío²; Fornés, Miguel¹
Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM)¹ Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas-San Luis (IMIBIO-SL)-Universidad Nacional de San Luis²

Obesidad y sobrepeso son causas conocidas de infertilidad en hombres, sin embargo el mecanismo involucrado no ha sido aún clarificado. El modelo de obesidad inducida por la dieta (OID) en ratones B6 se caracteriza por incremento en la grasa visceral, inflamación/estrés oxidativo sistémico, resistencia a la insulina. La hipótesis a probar es que la obesidad inducida por la dieta incrementaría la acumulación/activación de células adiposas (foam cells) y macrófagos en intersticio testicular. La activación en el testículo obeso causaría estrés oxidativo e inflamación a nivel local y sistémico. El objetivo es evaluar el perfil redox/inflamación/sistema metabólico y anomalías morfológicas que expliquen la sub-fertilidad. El modelo de OID en ratones C57BL/6J incluye 2 grupos: LFD (Low fat diet) y HFD (High fat diet), los cuales son alimentados con una dieta control (GEPSA, 10 Kcal de grasa) o esta dieta suplementada con un 60% kcal aportadas por grasa vacuna, respectivamente, durante 6, 10 y 18 semanas. El consumo de alimento y peso corporal fue mayor en el grupo HFD a partir de las 10 semanas de dieta. A las 18 semanas el grupo HFD mostró un incremento significativo de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-6) y marcadores de estrés oxidativo (carbonilos y TBARS) en suero. El peso de grasa epididimal fue mayor en el grupo HFD, y los testículos del grupo mostraron células espumosas en el intersticio. La espermatogénesis/espermioogénesis mostró desorganización del epitelio en parches, espermatozoides anormales, con un complejo acroplaxoma-acrosoma anormal. La morfología (y ultraestructura) manifiestan cambios aún incipientes, pero es de esperar que períodos más largos de seguimiento marquen claramente los daños celulares. Estos datos sugieren que las anomalías encontradas en espermatogénesis pueden ser causadas por cambios en el estado redox/inflamatorio/metabólico en testículo, reflejando la situación sistémica asociada a la inflamación del tejido adiposo.

210. (549) EFECTO DE LA DIETA GRASA A NIVEL TESTICULAR Y SU REVERSIÓN POR ACEITE DE OLIVA

Simón, Layla Y¹; Funes, Abi¹; Monclus, María^{1,2}; Boarelli, Paola^{1,2}; Sáez Lancellotti, Estefanía^{1,2}; Fornés, Miguel^{1,2}
Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM)-CONICET¹ Facultad de Ciencias Médicas, Universidad del Aconcagua²

Se han observado en conejos hipercolesterolémicos, por alimentación con dieta grasa, alteraciones espermáticas como disminución del número de espermatozoides eyaculados, aumento de las formas anormales y decremento en la capacitación y reacción acrosomal. Estos trastornos se logran revertir con dietas suplementadas con aceite de oliva. Una espermatogénesis defectuosa podría ser la causa de las formas anormales, observable mediante microscopía electrónica de transmisión; y una menor eficiencia en la espermatogénesis la responsable del bajo número, demostrable por recuentos celulares diferenciales del epitelio seminífero. Para realizar este trabajo se generaron 3 grupos de conejos neozelandeses machos adultos: control (C) mantenido con alimento balanceado, grasa (G) adicionando 14% grasa animal (p/p), y protegido (P). La dieta de este tercer grupo P se obtuvo suplementando la mitad de grasa de G (7%) con aceite de oliva (AO 7% v/v) después de 6 meses de ser alimentado con grasa (14%) para lograr la reversión de la hipercolesterolemia. Los animales se sacrificaron y se obtuvo y estudió el tejido testicular. La ultraestructura mostró cambios en la formación de la cabeza y núcleo espermático. Dividiendo el túbulo seminífero en un compartimento proliferativo y otro de diferenciación se contaron los tipos celulares totales. Se observó que en los grupos G y P hay una depresión del primer compartimento, ya que el número de esper-

matogonias se observa disminuido significativamente respecto a C. La eficiencia del grupo G está disminuida, con menor número de espermátides. En tanto que el AO induce una recuperación mostrando un aumento significativo del número de espermátides elongadas a expensas de espermátocitos y espermátides redondas. Estos valores coinciden con lo observado en los recuentos de espermatozoides seminales. Los resultados sugieren que el AO revierte el efecto negativo de una dieta grasa a nivel testicular.

211. (555) LOS ESPERMATOZOIDES DE ANIMALES KNOCKOUT PARA LA PROTEÍNA CRISP2 PRESENTAN ALTERACIONES EN LA MOTILIDAD Y CAPACIDAD FERTILIZANTE

Brukman, Nicolás Gastón¹; Da Ros, Vanina Gabriela²; Torres, Pablo²; Cisales, Humberto Osvaldo²; Lombardo, Daniel²; Ikawa, Masaito³; Okabe, Masaru³; Cuasnicú, Patricia Sara¹

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires² Research Institute for Microbial Diseases, Universidad de Osaka³

La proteína testicular CRISP2 (Cysteine-Rich Secretory Protein 2) se encuentra presente en el acrosoma y la cola de los espermatozoides de mamíferos y participa en el proceso de fertilización. El estudio de animales *knockout* (KO) para el gen *crisp2* mostró que cuando los machos KO eran puestos en apareo con hembras superovuladas, el porcentaje de ovocitos fertilizados recuperados del oviducto al día siguiente del apareo (%F) era significativamente menor que el de los machos control (heterocigotas, HT). En base a ello, el objetivo del presente trabajo fue analizar más profundamente el fenotipo reproductivo de estos animales. Para ello, machos KO o HT fueron colocados en apareo durante una noche con hembras en estro natural (en vez de superovuladas), analizándose el %F. Bajo estas condiciones, el %F de los machos KO y HT no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, al emplear hembras tanto superovuladas como en estro, el %F de los machos KO disminuyó en forma significativa en función del número de ovocitos ovulados, sin observarse diferencias para los HT. Ensayos de fertilización *in vitro* utilizando ovocitos con *cumulus oophorus* (CO), sin CO y con *zona pellucida* (ZP) y sin CO ni ZP, mostraron, en todos los casos, porcentajes de fertilización significativamente menores para los espermatozoides KO que HT. Asimismo, los espermatozoides KO mostraron una menor capacidad de penetrar el CO sin evidenciar diferencias en su capacidad de unirse a la ZP respecto a los controles. Finalmente, el análisis de la motilidad por CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) reveló que los espermatozoides KO presentaban alteraciones en varios parámetros cinéticos (VAP, VSL, VCL y ALH) asociados a hiperactividad, motilidad vigorosa necesaria para penetrar las envolturas del ovocito. En conjunto, los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* indican que CRISP2 participaría en el proceso de fertilización a través de su capacidad de regular la hiperactividad de los espermatozoides.

METABOLISMO/NUTRICIÓN 2

212. (241) DINÁMICA Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIALES EN UN MODELO DE OBESIDAD Y DIABETES

Finocchietto, Paola; Pagnini, María Cecilia; Pérez, Hernán; Peralta, Jorge; Poderoso, Juan José; Carreras, María Cecilia

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Instituto de Genética, Inmunología y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA

El aumento del tejido adiposo visceral y la inflamación en estados de obesidad y diabetes se asocian a estrés oxidativo, nitrosativo y a disfunción mitocondrial. Objetivo: estudiar la dinámica y biogénesis mitocondriales y la oxidación y nitración en el tejido adiposo visceral de los ratones Ob^{-/-} (deficientes de leptina), un modelo de obesidad y diabetes. Métodos: Se utilizaron ratones

machos Ob^{-/-} y C57BL/6 (6-7 meses) con y sin tratamiento con leptina 1 mg/kg intraperitoneal por 4 días. Se extrajo tejido adiposo periepididimario visceral. Se determinaron la expresión de ARNm por RT-PCR y por Western blot de proteínas DRP-1, OPA, mitofusina 2, NRF1 y PGC-1 α . La ultraestructura mitocondrial se evaluó por microscopía electrónica. Se determinaron el consumo de oxígeno mitocondrial por medio de un electrodo específico, la actividad y nitración de los complejos mitocondriales por espectrofotometría y anticuerpo anti 3- nitrotirosina, respectivamente; y la expresión de proteínas oxidadas por el método Oxyblot. Resultados: Los ratones Ob^{-/-} presentaron: 1) aumento en la expresión de DRP-1 y disminución de mitofusina 2, OPA y NRF-1 respecto a los controles y de los Ob^{-/-} tratados con leptina ($p < 0,05$), 2) nitración del complejo I con reducción de un 50-70% de su actividad y mayor oxidación de proteínas adiposas respecto a los controles y a los Ob^{-/-} tratados con leptina ($p < 0,05$). Conclusiones: a) Los adipocitos de ratones Ob^{-/-} presentan disfunción mitocondrial, estrés nitrosativo y oxidativo con desbalance entre la fisión y fusión mitocondriales y menor biogénesis. b) La leptina revierte el daño mitocondrial favoreciendo la fusión y biogénesis mitocondriales incrementando la capacidad oxidativa, disminuyendo la síntesis de ácidos grasos e impidiendo el desarrollo de obesidad.

213. (268) DIFERENTES CONCENTRACIONES Y FUENTES LIPÍDICAS: CONSECUENCIAS SOBRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE SUERO Y TIMO. MODELO EXPERIMENTAL.

Perris, Paula D; Fernández, Inés; Silva, Carolina; Mambrín, Cecilia; Slobodianik, Nora H; Felio, María S

Cátedra Nutrición, Facultad Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Los ácidos grasos que componen los lípidos dietarios cumplen un rol importante en la prevención de enfermedades crónicas. Se evaluó el efecto de dietas con diferentes concentraciones y fuentes lipídicas sobre el perfil de ácidos grasos (AG) en suero y timo de ratas en período de crecimiento activo. Ratas Wistar al destete fueron alimentadas 10 días con dietas conteniendo 15 y 40Kcal de lípidos% (F%) aportados por manteca (M15 y M40); aceite de oliva (O15 y O40) y aceite de girasol (G15 y G40). La dieta control (F%:15) contenía aceite de soja (C). El perfil de AG se determinó por Cromatografía gaseosa. Resultados: AG(%área \pm DS): SUE-RO Oleico M15=18,18 \pm 1,55* M40=19,1 \pm 5,2* O15=19,40 \pm 3,36* O40=22,0 \pm 5,1* G15=8,91 \pm 1,04 G40=11,2 \pm 1,9 C=10,6 \pm 2,0 Linoleico M15=7,70 \pm 1,94* M40=8,9 \pm 1,8* O15=12,44 \pm 1,85* O40=11,8 \pm 2,8* G15=19,49 \pm 3,94 G40=20,1 \pm 0,7 C=19,0 \pm 3,5 Linolénico M15=0,37 \pm 0,11* M40=0,4 \pm 0,1* O15=0,34 \pm 0,06* O40=0,5 \pm 0,2* G15=0,20 \pm 0,07* G40=0,5 \pm 0,2* C=1,2 \pm 0,3 TIMO Oleico M15=19,0 \pm 5,4 M40=22,0 \pm 5,4* O15=21,5 \pm 5,9 O40=25,4 \pm 6,7* G15=13,5 \pm 2,1 G40=19,2 \pm 1,4 C=18,2 \pm 3,2 Linoleico M15=3,7 \pm 0,5* M40=4,8 \pm 0,4* O15=5,9 \pm 0,6* O40=7,2 \pm 0,7* G15=9,2 \pm 1,8 G40=15,5 \pm 0,9* C=9,5 \pm 0,7 Linolénico M15=0,4 \pm 0,04* M40=0,3 \pm 0,04* O15=0,3 \pm 0,02* O40=0,3 \pm 0,09* G15=0,3 \pm 0,03* G40=0,3 \pm 0,1* C=0,6 \pm 0,1 (* $p < 0,01$ con respecto al control). En suero: M y O presentan disminución de linoleico y linolénico con aumento de oleico. G presenta disminución de linolénico. En timo: M y O presentan disminución de linolénico y linoleico pero sólo se observa aumento de oleico cuando F%=40. G presenta disminución de linolénico y sólo aumento de linoleico cuando F%=40. Los resultados en suero y timo de M y O sugerirían exacerbación de la ruta de la familia $\omega 9$ con disminución de AG esenciales. Los cambios en el suero del grupo G se deben al alto aporte de linoleico de la dieta; y en timo, además, por la alta concentración de lípidos. A pesar del corto tiempo de administración de las dietas, el perfil de AG se encuentra modificado. UBACyT20020120200068

214. (281) ESTADO NUTRICIONAL RESPECTO DEL HIERRO Y GEN HFE EN UN GRUPO DE VARONES ADULTOS DONANTES DE SANGRE DEL HOSPITAL DE CLÍNICAS (UBA)

Fleischman, Silvana J¹; Castro, Marcelo²; Rey, Jorge²; Vellisce, Alejandra²; Airalidi, Romina³; Sebastián, Vanesa³; Donadio, Luján³; Ceballo, M Fernanda¹; Felipoff, Ana Lía¹; Pandolfo, Marcela¹; Lardo, Marta M¹; Langini, Silvia¹

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Hospital de Clínicas "José de San Martín"² Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³

El Hierro (Fe) es un elemento esencial, pero también un potencial tóxico para las células. La hemocromatosis hereditaria (HH) es un defecto genético asociado al gen *HFE* caracterizado por elevada absorción del Fe de la dieta y acumulación excesiva en diferentes órganos. En Argentina, el principal aportador de Fe es la carne y, a partir de la Ley N° 25630/2002, la harina de trigo. Para evaluar estado nutricional del Fe y marcadores moleculares del gen *HFE*, se estudiaron 106 varones donantes de sangre (D) (19-65 años) asistentes al Servicio de Hemoterapia, Htal de Clínicas (UBA) durante 2012-2014, con serología de rutina del Banco de Sangre y Proteína C Reactiva (Wiener lab) negativa. Se calculó saturación de transferrina (%ST) a partir de Fe sérico (Fe_s) (IRON2 Cobas) y capacidad total de fijación de Fe (TIBC) (Tina-quant Transferrin, Cobas) y, ferritina sérica (FS) IMMULITE Ferritin, DPC. Los D respondieron un cuestionario de "Frecuencia de Consumo de Alimentos" para conocer la Ingesta diaria de Fe (IFE), la IFe hem y la IFe no hem (Programa Informático SARA y Tabla de Composición de Alimentos, USDA). En un subgrupo (n=66) se identificaron las mutaciones C282Y, H63D y S65C. La media \pm DS (rango) fue: %ST: 30,2 \pm 9,9 (6,1- 67,9), FS (ng/mL): 247 \pm 220 (6,1-1403); 4,4% de D presentó %ST > 50 y, 26,5% FS > 300 ng/mL. La IFe (mg/día) fue: 22,8 \pm 9,8 (8,9-58,2), la IFe hem: 2,1 \pm 1,3 (0,0-6,7) y la IFe no hem: 20,7 \pm 9,4 (7,4-56,9). El 46,2% de IFe total fue aportado por las harinas enriquecidas (30 mg Fe/kg). Se observó IFe > 8 mg/día (RDA, NAS 2001) en 100% de D y > 45 mg/día (Nivel Máximo Tolerable, NAS 2001) en 2,8% D. Los genotipos con mutaciones se encontraron en 22,7% de D: 13,6% fueron H63D/WT, 4,5% H63D/H63D y 4,5%, C282Y/WT. Los resultados sugieren la necesidad de implementar programas de rastreo de sobrecarga de Fe para prevenir efectos adversos asociados al exceso de este micronutriente. Financiado por Universidad de Buenos Aires, UBACyT 20720120200004BA

215. (322) EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA SOBRE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA Y TIPO DE VLDL EN INSULINO-RESISTENCIA.

Bursztyn, Michelle¹; Lucero, Diego¹; Stranges, Andrea²; Morales, Celina³; Matoso, Mirian³; Macri, Vanesa²; Schreier, Laura¹; Zago, Valeria¹

Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Depto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)-UBA¹ Cátedra de Química General y Bucal, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires² Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Depto. de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³

La esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) se asocia con insulino-resistencia (IR) y aumento de VLDL aterogénica. Los ácidos grasos (AG) dietarios tendrían un papel importante en la patogénesis de EHNA. Existen controversias en cuanto a las respuestas biológicas frente a diferentes AG insaturados dietarios. Objetivo: evaluar el efecto de suplementación con AG sobre EHNA y tipo de VLDL secretada en un modelo de IR. Se utilizaron aceites de pescado, girasol y girasol alto oleico (AGAO), fuentes de ω 3, 6 y 9 respectivamente. Se estudiaron durante 12 semanas ratas wistar macho 200g, divididas en 5 grupos: 1 con dieta estándar (DE n=10) y 4 con dieta rica en sacarosa (DRS 30% en agua de bebida) subdivididos en: AG- ω 3 (n=10), AG- ω 6 (n=8) y AGAO (n=8), 15g/100g dieta y DRS control (DRS-C n=10). En ayuno se midió perfil lipídico, insulina y AG libres (AGL). En VLDL aislada se analizó su composición química y tamaño por HPLC de exclusión molecular. Se determinó grama visceral y hepática por gravimetría e histología. DRS-C vs DE presentó: VLDL con mayor contenido en triglicéridos (TG) (64,4 \pm 7,3% vs 48,3 \pm 9,8 p<0,05) y mayor% de VLDL grandes (mediana[rango]: 49,1[14,5-82] vs 20,9[5,1-41,3] p=0,02) mayor contenido de grasa visceral y hepática (p<0,04) con depósito hepático micro y macrovacuolar, p=0,004. Sólo AG- ω 3, vs DRS-C, presentó disminución de TG-VLDL (55,2 \pm 4,4% p<0,05) y%

de VLDL grandes (22,5[19,7-35,6] p<0,02), menor AGL e insulina (p<0,012). AGAO mostró aumento de peso (Δ 307 \pm 37 vs 255 \pm 30) y grasa visceral (24 \pm 7 vs 17 \pm 4g p<0,023). No se observaron diferencias en contenido graso hepático entre grupos. Si bien AG- ω 3 mejoró las características aterogénicas de VLDL, AG- ω 6 y AGAO no evidenciaron este efecto y ninguno de los AG dietarios evitaron el depósito de grasa hepática, en las dosis y tiempos estudiados. Los resultados no aseguran beneficio en el tratamiento de las dislipemias asociadas a IR, con AG especialmente ω 6 y AGAO.

216. (332) HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO: POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS OMEGA-3

Labourdette, Verónica¹; Olguín, María Catalina²; Revelant, Gilda C.²; Marinozzi, Darío O.²; Posadas, Marta D.¹

Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹ Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario²

El aumento de la grasa hepática del Hígado Graso No Alcohólico (HGNA) se asocia a insulino-resistencia (IR), sin embargo no está claro si la IR es responsable del aumento de los triacilglicérols (TAG) en el hígado o si la elevación de los TAG es la causa de la IR. Algunos estudios sugieren que el acúmulo de lípidos en el hígado es previo a la IR y otros muestran que los TAG hepáticos no serían tóxicos sino protectores al evitar la acumulación de ácidos grasos. Los tratamientos más promisorios serían, los que tienden a restaurar la sensibilidad insulínica. En este sentido, la composición lipídica de la dieta es fundamental. En ratas macho de la línea obesa e hipertriacilglicérolémicas β se evaluó el efecto de dietas con diferente calidad de grasa sobre los lípidos del hígado. Por un lapso de 90 días, recibieron dietas isocalóricas e isolipídicas según las recomendaciones del American Institute of Nutrition 1993 (AIN 93), con distinta calidad de lípidos. **Dieta A** (control, n6) AIN 93 (aceite de girasol, ácido linoleico). **Dieta J** (n7) AIN 93 modificada reemplazando el aceite de girasol por primer jugo bovino (ácidos grasos saturados). **Dieta W** (n7) AIN 93 modificada reemplazando el aceite de girasol por primer jugo bovino y adicionada con aceite de pescado. La relación w6/w3 fue 4:1. RESULTADOS (media \pm desvío estándar; letras distintas: diferencia estadística): Glucemia (mg/dl): J:245,1 \pm 23,2a, A:249,8 \pm 40,9a, W:264,4 \pm 43,3a. Insulinemia (pmol/l): J:695,2 \pm 211,5b, A:390,5 \pm 173,2c, W:532,0 \pm 133,0bc. HOMA-IR: J:68,6 \pm 18,2d, A:42,1 \pm 10,8e, W:56,5 \pm 8,9de. TAG plasmáticos (mg/dl): J:238,7 \pm 78,8g, A:190,2 \pm 95,5g, W:126,4 \pm 41,0h. Grasa hepática (g%): J:3,59 \pm 0,62a, A:2,52 \pm 0,44b, W:1,45 \pm 0,32b. Col. hepático (mg%): J:206,8 \pm 47,3c, A:118,1 \pm 28,7d, W:97,2 \pm 18,4d. TAG hepáticos (mg%): J:171,0 \pm 239,2e, A:605,8 \pm 113,3f, W:490,1 \pm 180,4f. La incorporación de w3 a la dieta amortiguó la IR exacerbada por los ácidos grasos saturados, corrigió el nivel de TAG plasmáticos a valores normales y redujo la esteatosis hepática.

217. (336) EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS DIETARIOS SOBRE ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE ENZIMAS LIPOGÉNICAS Y OXIDATIVAS EN ANIMALES ALIMENTADOS CON DISTINTAS FUENTES DE GRASA DIETARIA

Lavandera, Jimena Verónica^{1,2}; Sain, Juliana^{1,2}; Jovellano, M. Julieta¹; Bernal, Claudio^{1,2}; González, Marcela¹

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

El consumo de distintos tipos de grasa dietaria está directamente relacionado con la modulación de los niveles tisulares y plasmáticos de triglicéridos. La elevada ingesta de ácidos grasos trans (AGt) se ha asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. El objetivo del siguiente trabajo fue evaluar el efecto de los AGt dietarios sobre el metabolismo de lípidos hepáticos en ratones alimentados con diferente perfil de AG insaturados. Ratones CF1 machos (22g) fueron alimentados (16 semanas) con dietas estándar (7% de grasa) con distintas relaciones de n-3/n-

6/n-9: Aceites de Canola 10,9/19,0/63,2 (C); Maíz 0,9/53,3/31,3 (M) y Oliva, 0,8/9,7/76,3 (O); y la presencia o no de 1%AGt: Ct, Mt y Ot, respectivamente. Se determinó en hígado la actividad de la enzima lipogénica Ácido Graso Sintasa (FAS, Lynen 1969) y de la enzima oxidativa Carnitina-Palmitoil Transferasa I (CPT-I, Bieber 1972), y los niveles de triglicéridos (TG, Laurell 1976). Además se determinaron por PCR en tiempo real los niveles de ARNm de FAS, CPT-I y de los factores de transcripción que regulan la actividad de dichas enzimas: SREBP-1a, SREBP-1c y PPAR α . Los datos fueron analizados mediante ANOVA seguido de test de Scheffé ($p < 0,05$). La adición de AGt a las dietas incrementó la actividad de FAS (187%) solo en el grupo O. Por otro lado, el contenido de TG aumentó por la adición de AGt en los grupos: Ct (68%), Mt (76%) y Ot (53%). No se detectaron alteraciones en la actividad de CPT-I en ninguno de los grupos dietarios. La expresión de FAS y SREBP1a fue incrementada (230%) y (300%) respectivamente por la suplementación con AGt en el grupo O. No se observaron cambios significativos en las expresiones de CPT-I, SREBP-1c y PPAR α frente a ninguna de las dietas utilizadas. En los animales alimentados con aceite de oliva el incremento en la concentración de TG hepáticos por la adición de AGt a la dieta estaría asociado a un desbalance producido entre la lipogénesis y la β -oxidación.

218. (340) PAPEL MODULADOR DEL TEJIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR SOBRE LA CONTRACTILIDAD DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

Fariña, Juan Pablo¹; García, María Elisa¹; Marra, Carlos Alberto³; Gagliardino, Juan José¹; Rinaldi, Gustavo²
*Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)-CONICET*¹ *Centro de Investigaciones Cardiológicas (CIC)*² *Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP)*³

Introducción: El tejido adiposo perivascular (TAPV), es una capa de grasa localizada fuera de la capa adventicia del vaso. El TAPV secreta varios factores de relajación, pero poco se sabe sobre sus factores moduladores de la contracción. **Objetivo:** Identificar el efecto modulador del TAPV sobre la contracción y relajación del músculo liso vascular y su posible mediador. **Materiales y métodos:** Se sacrificaron ratas Wistar machos normales (340-370g) para obtener anillos aórticos que se suspendieron en un transductor de fuerza termostatzado a 37° C en buffer de Krebs-Ringer-Bicarbonato, con o sin K⁺ 80mM. Los anillos tuvieron la siguiente composición: a) intacto (I), b) sin TAPV (STAPV), c) sin endotelio (SENDO) y d) sin TAPV ni ENDO (MLV). Paralelamente, alícuotas de TAPV se incubaron con y sin K⁺ 80 mM y luego se extrajeron los lípidos del TAPV y del medio de incubación para determinar la composición de ácidos grasos (AG) por HPLC. **Resultados:** Los anillos I y SENDO mostraron mayor fuerza de contracción que los STAPV y los MLV: 0,962 \pm 0,148 y 1,030 \pm 0,094, respectivamente vs. 0,584 \pm 0,081 y 0,603 \pm 0,121, $p < 0,05$. Complementariamente, el tiempo de relajación (T50) fue mayor en la aorta I y SENDO que en la STAPV y MLV: 376 \pm 49 y 525 \pm 149 vs. 60 \pm 11 y 106 \pm 40, respectivamente, $p < 0,02$). En la composición de ácidos grasos se observó un aumento en la relación de saturados/poliinsaturados 1,90 \pm 0,18 vs. 3,41 \pm 0,19 $p < 0,005$. La presencia de K⁺ modificó significativamente la composición/contenido de AG: disminución significativa del ácido araquidónico del TAPV (7,7 \pm 0,4 vs. 5,1 \pm 0,2 $p < 0,005$) y aumento del mismo en el medio de incubación: (5,8 \pm 0,1 vs 10,3 \pm 0,1 $p < 0,001$). **Conclusión:** El TAPV incrementa la contractilidad del MLV siendo su mediador probablemente el ácido araquidónico o alguno de sus derivados.

219. (343) EFECTO DE DROGAS PORFIRINOGÉNICAS SOBRE DIFERENTES METABOLISMOS EN UN MODELO MURINO GENÉTICO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

Ruspini, Silvina Fernanda¹; Zuccoli, Johanna¹; Lavandera, Jimena²; Batlle, Alcira¹; Buzaleh, Ana María^{1,3}
*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires*¹ *Cátedra de Bro-*

*matología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral*² *Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*³

Las porfirias son enfermedades metabólicas producidas por alteraciones en la biosíntesis del hemo. La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) se caracteriza por una disminución de la actividad de la Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-D) y clínicamente se observa sintomatología neuroabdominal y polineuropatía motora. Previamente describimos alteraciones en la biosíntesis del hemo y otros metabolismos relacionados en modelos farmacológicos de porfiria. El objetivo fue continuar la investigación con un modelo genético de PAI. Se usaron ratones knockout deficientes en la enzima PBG-D homocigotas (T1) y dobles heterocigotas (PAI) de ambos sexos, tratados con los agentes porfirinogénicos: Alilisopropilacetamida (AIA) (350 mg/kg; i.p) y anestésicos volátiles: Isoflurano (2 ml/kg; i.p.) y Sevoflurano (1,5 ml/kg; i.p.). Se midieron las actividades de las hemoproteínas Catalasa y Triptofanopirrolasa (TRP), la actividad de la enzima marcadora de daño hepático Glutacion-s-transferasa (GST), y los niveles de Glutacion reducido (GSH) en hígado, cerebro y riñón. Los ratones PAI macho tratados con Isoflurano presentaron una disminución del 40% ($p < 0,05$) en la actividad de catalasa hepática, mientras que en los ratones T1 hembra fue del 30% ($p < 0,05$). El AIA disminuyó 25% ($p < 0,05$) los niveles de GSH en riñón de los ratones T1 hembra. Para la catalasa se observaron disminuciones del 20% ($p < 0,05$) en hígado y del 35% ($p < 0,05$) en riñón en el grupo de las hembras, mientras que en el grupo de los machos se observó un aumento del 25% ($p < 0,05$) en riñón. La actividad de TRP se incrementó 30% ($p < 0,05$) en el hígado de los ratones macho. No se observaron variaciones significativas en la actividad de GST. En conclusión se observó la instauración de estrés oxidativo debido a las alteraciones de Catalasa y GSH y una variación en el pool de hemo regulatorio debido al aumento de TRP. El hecho de que la actividad de GST no estuviera alterada indicaría la ausencia de daño hepático.

220. (378) ALTERACIONES MITOCONDRIALES DEBIDO AL TRATAMIENTO CON ALILISOPROPILACETAMIDA (AIA) EN ENCÉFALO DE RATÓN

Zuccoli, Johanna Romina¹; Martínez, María Del Carmen²; Ruspini, Silvina Fernanda¹; Batlle, Alcira¹; Buzaleh, Ana María^{1,2}

*Centro de Investigación sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Hospital de Clínicas "José de San Martín" Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*²

Las mitocondrias actúan como centrales energéticas de la célula sintetizando ATP a partir del proceso de fosforilación oxidativa, suministrando así la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. La producción continua de radicales libres y especies oxidantes por parte de la mitocondria la hace una fuente cuantitativamente muy importante de estas especies. El hemo es el grupo prostético de una gran variedad de proteínas como la Citocromo c oxidasa (CcOx), complejo IV de la cadena respiratoria. El alilisopropilacetamida (AIA) provoca la pérdida del Citocromo P450 como consecuencia de la unión al grupo hemo, disminuyendo la concentración del "pool" de hemo regulatorio, estimulando así la actividad de la enzima ácido 5 aminolevúlico (ALA) sintetasa. Teniendo en cuenta la multiplicidad de metabolismos afectados por los agentes porfirinogénicos, razón por la cual es difícil establecer las causas de la neuropatía porfirica, resultó de interés dilucidar el efecto de estas drogas sobre la cadena respiratoria en encéfalo de ratón. Previamente observamos alteraciones en la actividad de los distintos complejos respiratorios por acción de anestésicos volátiles como el Sevoflurano e Isoflurano, etanol, ayuno y ALA. El objetivo fue dilucidar el efecto del AIA sobre la cadena respiratoria en encéfalo de ratón y analizar el estado redox mitocondrial. Se midieron las actividades los complejos: I-III (NADH- Citocromo C reductasa), II-III (Succinato-Citocromo C reductasa), II (Succinato deshidrogenasa) y IV (Citocromo C

oxidasa) en mitocondria de encéfalo de ratón cepa *CF1* tratados con AIA (350 mg/ kg, i.p.). Se cuantificó el daño a proteínas. Los resultados mostraron una disminución en la actividad de los complejos respiratorios: I-III (37,5%; $p < 0,05$), II-III (48,2%; $p < 0,05$) y II (55%; $p < 0,01$) por acción del AIA. La actividad del complejo IV también se redujo (26,3%), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. El tratamiento con AIA generó un elevado daño a las proteínas mitocondriales (147,28%; $p < 0,01$). En conclusión, el AIA afectó los complejos respiratorios lo que llevaría a la disrupción de la función mitocondrial, generando daño oxidativo que podría afectar proteínas involucradas en la síntesis del hemo, como en otros metabolismos.

221. (382) EFECTO DE LA EXPANSIÓN IN VITRO DE CÉLULAS DE LA FRACCIÓN ESTROMA VASCULAR DE TEJIDO ADIPOSO ABDOMINAL SOBRE LA CAPACIDAD ADIPOGÉNICA

Portales, Andrea¹; Alzamendi, Ana¹; Spinedi, Eduardo²; Giovambattista, Andrés¹
*Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-CONICET*¹ *Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (GENEXA)- CONICET*²

El tejido adiposo (TA) está constituido por diferentes poblaciones celulares, entre las que se encuentran los adipocitos y las presentes en la fracción estroma vascular (FEV). Incluidas en la FEV están las células precursoras adipocitarias (CPAs) y las mesenquimáticas, entre otras. Es aceptado que existe una gran plasticidad entre estas poblaciones, tal como la des-diferenciación de adipocitos a CPAs. El propósito del presente estudio fue evaluar el impacto de la replicación *in vitro* de la FEV sobre las CPAs presentes en la misma, y por lo tanto, en su capacidad adipogénica. Se aislaron células de la FEV de TA abdominal (TAA; retroperitoneal) de ratas S-D macho adultas. Las células de la FEV fueron cultivadas hasta alcanzar confluencia, se levantaron por tripsinización y las células obtenidas (pasaje 1, p1) se resembraron. Este procedimiento se repitió hasta el p5. Células de la FEV y de los p3 y p5 se utilizaron para la cuantificación de la expresión de distintos marcadores (qPCR). Además, las células de la FEV, p3 y p5 se cultivaron y diferenciaron, cuantificándose al día 10 el porcentaje de células diferenciadas (tinción PAP) y el contenido intracelular de lípidos (Oil Red O, ORO). Los resultados mostraron que el porcentaje de diferenciación a adipocitos maduros y el contenido lipídico disminuyeron drásticamente ($P < 0,05$) en la población p3 vs. FEV, resultando prácticamente nulos en la población p5. Los niveles de dos factores de competencia como son PPAR γ 2 y Zfp423 medidos en las células sin diferenciar fueron menores en el p3 y p5 con respecto a la FEV ($P < 0,05$). Por el contrario, la expresión de Pref-1 (factor anti-adipogénico) se incrementó progresivamente ($P < 0,05$) entre la FEV y p5. Nuestros resultados indicarían que la replicación *in vitro* de las células de la FEV afecta el potencial adipogénico de las CPAs, al menos disminuyendo la competencia para diferenciarse a células adiposas, lo que podría estar indicando un cambio de linaje celular. PICT2013-0930.

222. (448) ACCIÓN DEL VANADATO SOBRE LA DELTA AMINOLEVULINATO SINTETASA EN UN MODELO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

Oliveri, Leda María¹; Ruspini, Silvina Fernanda¹; Buzaleh, Ana María^{1,2}; Battle, Alcira¹; Gerez, Esther Noemí¹
*Centro de Investigación sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Hospital de Clínicas "José de San Martín"*¹ *Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*²

La Porfiria Aguda Intermittente (PAI) se caracteriza por una reducción en la actividad de la enzima porfobilinógeno deaminasa (PBGD), un aumento en los niveles de la primera enzima del camino del hemo, la delta-aminolevulinato sintetasa (ALAS) y una acumulación de los precursores neurotóxicos ALA y PBG. El ALAS hepática puede ser inducida tanto por ayuno como por varios agentes químicos. En nuestro laboratorio hemos demostrado que

el vanadato (V) inhibe el aumento transcripcional del ALAS hepática en un modelo de diabetes. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto del vanadato en un modelo de PAI. Se utilizaron ratones machos knockout de la cepa C57bl (20 gr, n=3) deficientes en la enzima PBGD doble heterocigotas (Pbgd^{-/-}). Los animales se dividieron en tres grupos experimentales: controles sin ayunar (C), ayunados (A) y vanadato+ayuno (V+A). Los ratones recibieron V (0,3 mg/ml + 4,7 mg/ml NaCl) en el agua de bebida durante 7, 16, y 21 días. Previo al sacrificio los grupos A y V+A se ayunaron durante 24 hs. Los grupos A y C, recibieron 4,7 mg/ml NaCl en el agua de bebida. Tanto en el grupo A (23,8 \pm 1,0 gr) como el grupo V+A (22,3 \pm 0,6 gr) se observó una pérdida de peso significativa respecto al grupo C (28,9 \pm 0,2 gr). En el grupo A, el ayuno provocó un aumento del 100% ($p < 0,05$) en la actividad enzimática del ALAS (C=0,20 \pm 0,04 U/mg) y de hasta un 200% en el contenido de proteína mitocondrial y una caída de hasta el 30% en la citoplasmática en comparación con el grupo C. En los animales que recibieron V durante 21 días, este compuesto atenuó el aumento de la actividad enzimática (C= 0,23 \pm 0,04 U/mg; V+A=0,31 \pm 0,10 U/mg) y el contenido de proteína en forma significativa llevando al ALAS citoplasmática por debajo del control. Estos datos están en concordancia con resultados previos donde la administración de V previno el aumento del ALAS, y refuerzan la hipótesis de su utilidad como un agente terapéutico para ataques de PAI.

223. (510) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE EXENDINA-4 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES ANOREXÍGENOS

Burqueño, Adriana; Gonzales Mansilla, Noelia; Espinoza, Juan; Sookoian, Silvia; Pirola, Carlos
Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM) -CONICET-UBA

El péptido similar a glucagon tipo I (GLP-1) es un secretagogo de insulina, secretado por las células L del intestino. Se ha demostrado que influye sobre el peso corporal, la ingesta de alimento y la función cardiovascular. Además de ser secretado en algunas áreas cerebrales relacionadas con estas funciones, es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la administración periférica de un agonista del receptor de GLP-1 (exendina-4) produce una potente vasodilatación periférica, y modifica la expresión de genes relacionados a la vía anorexígena de leptina-proopiomelanocortina (POMC). Objetivo: estudiar los efectos de la exendina-4 (ex-4) administrada en forma intracerebroventricular (ICV) sobre la presión arterial (PA), la frecuencia cardíaca (FC) y la expresión de genes de la vía anorexígena mencionada. Materiales y Métodos: utilizamos ratas Wistar macho de 20 semanas (n=18), a las que les colocamos una cánula fija en el tercer ventrículo cerebral (para administrar la ex-4, 10⁻⁵M), canulamos la arteria carótida izquierda (para medir la PA media) y colocamos en forma subcutánea en el lomo 4 cables de cobre (para medir la FC con un electrocardiograma). Al finalizar, se extrajo el diencéfalo para medir la expresión génica mediante qRT-PCR. Resultados: durante los 120 minutos posteriores a la inyección ICV, la FC ($p < 0,0025$, y la PA media ($p < 0,007$) de los animales que recibieron ex-4 fue mayor al grupo control, (n=9 por grupo). También, observamos que la ex-4 disminuyó la expresión del receptor de leptina (isoforma larga: ObRb o Lepr) ($p < 0,05$ n=5). Esta observación confirma resultados previos del laboratorio obtenidos al administrar ex-4 en forma periférica. Conclusión: postulamos que la ex-4 induciría la activación simpática lo que explicaría el aumento de PA y FC, probablemente mediante la estimulación de la vía de POMC.

224. (564) EFECTO DIFERENCIAL DEL ACEITE DE SOJA Y DE UNA GRASA LÁCTEA FUNCIONAL SOBRE LA ACRECIÓN DE TRIGLICÉRIDOS HEPÁTICOS EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS NORMO E HIPERCALÓRICAS

González, Marcela Aida¹; Gerstner, Carolina^{1,2}; Lavandera, Jimena Verónica^{1,2}; Sain, Juliana^{1,2}; Antonacci, Liliana³; Gagliostro, Gerardo³; Bernal, Claudio Adrián^{1,2}
*Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral*¹

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).² Departamento de Producción Animal. Estación Experimental Agropecuaria (EEA)-INTA-Balcarce³

Debido a elevados niveles de ácidos grasos (AG) saturados (AGS), AG trans y colesterol, el consumo excesivo de grasa láctea (GL), aunque controversialmente, ha sido asociado a mayor incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). La GL puede ser modificada naturalmente reduciendo los niveles de AGS e incrementando los de compuestos bioactivos, como los conjugados del Ácido Linoleico (CLA). El objetivo fue investigar el efecto del aceite de soja y dos GL sobre la acreción de TG hepáticos en ratas alimentadas con dietas normo e hipercalóricas. Ratas Wistar macho fueron alimentadas (60 d) a niveles recomendados (7%, p/p) o elevados (30%) de lípidos: aceite de soja (S7 y S30), GL (GL7 y GL30) ó GL funcional (GLF7 y GLF30) caracterizada por altos niveles de CLA y bajos AGS. Se determinó en hígado el perfil de AG (Cromatografía Gaseosa), los niveles de TG (Laurell 1976) y los niveles ARNm (PCR Tiempo Real) de ácido graso sintasa (FAS), carnitina-palmitoil transferasa I (CPT-I) y los factores de transcripción SREBP-1a, SREBP-1c y PPAR α . Los resultados (media \pm SEM, n=6) analizados mediante ANOVA-test de Scheffe (*p<0,05), muestran que elevados niveles de aceite de soja, pero no de GL y GLF incrementaron los niveles de TG hepáticos (mmol/g; S7: 29,12 \pm 5,72; GL7: 23,84 \pm 4,40; GLF7: 22,91 \pm 4,36; S30: 48,14 \pm 8,15*; GL30: 35,32 \pm 8,08 y GLF30: 30,22 \pm 9,46). El incremento en S30 vs S7, estuvo asociado a elevados niveles de ARNm de FAS (50%) y SREBP-1c (100%) y del 18:2, n-6 (50%); sin cambios en PPAR α y CPT-I. No hubo alteraciones en estos parámetros en los grupos GL30 vs GL7, GLF30 vs GLF7. GLF30 vs GL30 presentó mejores relaciones de AG hepáticos, entre otros linoleico/ α -linoléico (-30%) y saturados/insaturados (-24%). Los animales alimentados con dietas hipercalóricas ricas en aceite de soja presentan acumulación de TG hepáticos debido a un aumento de la lipogénesis mediada por SREBP. Asimismo, la GLF presenta un perfil menos pro-inflamatorio y menos aterogénico que la GL.

MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR 1

225. (82) CÉLULAS MADRE AMNIÓTICAS EPITELIALES: EXPRESIÓN DE MARCADORES ESPECÍFICOS DURANTE SU DIFERENCIACIÓN HEPÁTICA

Maymó, Julieta¹; Pérez Pérez, Antonio²; Riedel, Rodrigo¹; Maskin, Bernardo⁴; Jaime, Mariana⁴; Parolini, Ornella³; Sánchez-Margalet, Víctor²; Varone, Cecilia¹
Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA¹ Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España² Centro de Ricerca E. Menni- Fondazione Poliambulanza- Istituto Ospedaliero, Brescia, Italia³ Hospital Nacional Alejandro Posadas⁴

La placenta y las membranas fetales han sido propuestas recientemente como una importante fuente de células madre para la medicina regenerativa. Las células placentarias presentan considerables ventajas respecto a otras células madre como las de médula ósea o las embrionarias. Existe un fácil e ilimitado acceso a los tejidos placentarios y mínimas barreras éticas y legales asociadas con su uso. Las células madre epiteliales amnióticas (hAECs) son aisladas del amnion de la placenta humana a término. Expresan marcadores de células madre embrionarias, poseen características inmunosupresivas y la habilidad de diferenciar a las tres capas germinales. Estas propiedades posicionan a las hAECs como candidatas ideales para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. La falla hepática es una de las mayores causas de mortalidad en el mundo, y si bien el trasplante representa la mejor manera de tratar la enfermedad hepática crónica y aguda, existen varios obstáculos al respecto. Distintos tipos de células madre han sido sugeridas como posibles fuentes alternativas de hepatocitos. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la expresión de marcadores hepáticos específicos durante la diferenciación tardía de las hAECs. La diferenciación se llevó a cabo durante un mes

mediante factores específicos (EGF 10ng/ml + Dexametasona 0,1 μ M). Por microscopía de campo claro, analizamos los cambios en la morfología de las hAECs. Por microscopía de fluorescencia observamos que las hAECs expresan el marcador de células madre embrionarias SSEA-4. Empleando la técnica de qRT-PCR, determinamos un incremento significativo en los genes hepáticos: α -fetoproteína, α 1-AT, albúmina y CYP7A1. Observamos también un aumento en la expresión de albúmina a lo largo de la diferenciación, medida por Western blot. En resumen, los resultados indicarían que las hAECs son capaces de adquirir características hepáticas, permitiendo a futuro disponer de una fuente alternativa de células para la medicina regenerativa del hígado.

226. (166) DERIVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENOQUIMALES A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES UTILIZANDO UN MEDIO BIOCOMPATIBLE A BASE DE PLAQUETAS LISADAS

Luzzani, Carlos¹; Neiman, Gabriel¹; Garate, Ximena¹; Solari, Claudia²; García, Marcela³; Errecalde, Analía³; Guberman, Alejandra²; Romorini, Leonardo¹; Sevlever, Gustavo¹; Miriuka, Santiago¹

Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLENI¹ Laboratorio de Regulación Génica de Células Madre, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA² Cátedra de Citología, Histología y Embriología, Depto. de Ciencias Morfológicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata³

Las células madre mesenquimales (CMM) y las células madre pluripotentes (CMP) presentan un gran futuro en el área de la medicina regenerativa. El suplemento del medio con plaquetas lisadas (PL) demuestra ser muy efectivo para crecer CMM, y el mismo ya ha sido aplicado en investigación clínica. En este trabajo presentamos un nuevo protocolo biocompatible de derivación de CMM a partir de CMP (CMMDP). Utilizando PL como suplemento del medio de cultivo en reemplazo de suero fetal bovino (SFB), logramos obtener a partir de CMP embrionarias y reprogramadas células que presentan morfología mesenquimal, no expresan marcadores de pluripotencia (OCT4, NANOG), y expresan marcadores típicos de CMM (CD90, CD73, CD105 y otros), sin expresar otros marcadores hematopoyéticos. Demostramos la multipotencia de las CMMDP al diferenciarlas a condrocitos, adipocitos y osteoblastos. En ensayos de proliferación de linfocitos estimulados, las CMM-DP de LP demostraron similares capacidades inmunomoduladoras a CMM de cordón umbilical (CMMCU). Estudiamos también la cinética de marcadores de superficie por citometría de flujo y de marcadores de la transición epitelio-mesenquimal mediante qPCR y establecimos que el tiempo de derivación de CMMDP es de aproximadamente 21 días. Comparamos las CMM contra las CMP, fibroblastos y CMMCU midiendo la expresión para proteínas de matriz extracelular, la expresión de marcadores de superficie y el estado de metilación del promotor de OCT4. Observamos que las CMMDP presentan un perfil similar al de CMMCU. Por último, con el objetivo de desarrollar un proceso escalable, medimos la tasa de proliferación de CMMDP derivadas en LP que resulta ser muy superior a utilizar como suplemento SFB. En conclusión, partiendo de una célula adulta (fibroblasto) obtuvimos CMP, y que posteriormente fueron derivadas a CMM en un medio suplementado con PL. Este protocolo demostró ser robusto, económico y biocompatible, presentando entonces, posibles aplicaciones terapéuticas.

227. (168) LOCALIZACIÓN SUBNUCLEAR DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA NSL2 Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE GENES MAESTROS CLAVES EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

Canedo, Lucía¹; Ferreyra Solari, Nazarena¹; Belforte, Fiorella¹; Kobayashi, Ken²; Pérez Castro, Carolina¹

Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBiBA) - CONICET - Partner Institute of the Max Planck Society¹ Agrobiotecnología, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA)-CONICET-UBA²

El complejo multiproteico de acetilación denominado MYST regula la expresión de una amplia variedad de genes que son críticos para el desarrollo embrionario y funciones celulares básicas. Sin embargo, se desconoce la importancia funcional de las distintas subunidades proteicas que lo componen. Mediante el uso de la herramienta bioinformática INSECT, desarrollada por nosotros, identificamos que el subcomplejo NSL2 es el blanco de acción de factores del core transcripcional (Oct4/Sox2) que regulan autorenovación y pluripotencialidad en células madre pluripotentes. En el presente trabajo reportamos que la proteína NSL2 se expresa en células madre pluripotentes y se induce durante la diferenciación embrionaria. Experimentos de silenciamiento indican que NSL2 regula la expresión de las proteínas del core transcripcional y potencialmente su función. Las distintas isoformas murinas reportadas para la proteína NSL2 (NSL2-corta y NSL2-larga) fueron clonadas y expresadas como proteínas de fusión traduccional con proteínas de GFP o RFP para caracterizar la localización subcelular, tanto en células fijadas como *in vivo*, en comparación con otros miembros del complejo MYST. Dentro de esta caracterización encontramos que: 1) ambas isoformas NSL2 localizan en gran parte dentro del núcleo 2) la localización nuclear varía según la isoforma: NSL2-larga localiza en focos subnucleares, mientras que NSL2-corta se localiza con una distribución homogénea dentro del núcleo, 3) los focos subnucleares de NSL2-larga colocarían en su mayoría con tinción de pequeños focos de DAPI a diferentes niveles de expresión de NSL2, a diferencia de la isoforma corta. Concluimos que las proteínas NSL2 se localizan preferentemente en el núcleo, probablemente dentro de MYST que regula la expresión de genes maestros claves en el desarrollo embrionario. Creemos que la localización diferencial de las distintas isoformas estaría relacionada con distintas funciones dentro del complejo.

228. (185) ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN (FT) OCT-4 MEDIANTE CRISPR-DCAS9, UN SISTEMA ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN QUE UTILIZA ARN COMO GUÍA

Giménez, Carla; Pereyra Bonnet, Federico; Argibay, Pablo *Unidad de Reprogramación Celular, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires*

Recientemente, un sistema proto-inmunitario en bacterias denominado CRISPR-Cas ha sido adaptado para servir como herramienta de edición génica (CRISPR-Cas9) o una plataforma de activación de genes (CRISPR-dCas9). CRISPR-dCas9 funciona mediante el uso de un ARN guía para localizar genes por complementariedad, asociado a una endonucleasa deletada (dCas9) unida covalentemente a varios dominios de activación para atraer a la maquinaria de transcripción. El objetivo de este trabajo fue utilizar el sistema CRISPR-dCas9 unido covalentemente con 10 copias del dominio de activación VP16, para activar el FT *Oct-4* en la línea celular 3T3 de ratón. Para ello se clonaron y secuenciaron individualmente 3 fragmentos de ADN complementarios a regiones del promotor de *Oct-4* (2 complementarios a la hebra 5-3 y 1 a la hebra 3-5, todos incluyendo la región PAM NGG y dentro de las -1000 pb del TSS) dentro de un vector dual de expresión que traduce a dCas9 y a 10 dominios de expresión VP16 (CRISPR-dCas9VP160; Addgene; N°48240). Posteriormente se realizó una transfección en células 3T3 (Lipofectamina 2000 según instrucciones del fabricante) con los 3 vectores duales. A los 4d se extrajo el ARN (MicroARN-Kit) y se realizó RT-PCR con primers específicos para detectar la expresión de *Oct-4*. Se utilizaron células P19 como control positivo y células 3T3 con el vector vacío como control negativo. Se midió la eficiencia de transfección usando pCX-EGFP, la cual fue del 40%. Como resultados hallamos expresión de *Oct-4* en ambas repeticiones con el sistema CRISPR-dCas9-VP160. No se observó expresión en el grupo control negativo. Estos resultados demuestran en forma inédita que CRISPR-dCas9-VP160 permite activar eficientemente el factor de transcripción *Oct-4* en la línea 3T3. Las herramientas moleculares que permiten la activación dirigida de genes específicos como CRISPR-dCas9-VP160, serán invaluable herramientas

en estudios de expresión génica, biología del desarrollo y reprogramación celular.

229. (225) EFECTOS DE LA HIPOXIA DURANTE LA REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS A CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS HUMANAS

Questa, María^{1,2}; Neiman, Gabriel^{1,2}; Solari, Claudia²; Romorini, Leonardo¹; Sevrler, Gustavo¹; Guberman, Alejandra²; Miriuka, Santiago¹

Laboratorio de Investigación Aplicada a las Neurociencias (LIAN) - FLENI¹ Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre, Departamento de Química Biológica, Universidad de Buenos Aires²

Las células somáticas humanas pueden ser reprogramadas a Células Madre Pluripotentes Inducidas (CMPi), las cuales pueden diferenciarse a cualquier célula adulta. Esta característica es de gran interés en medicina regenerativa y en el estudio *in vitro* de enfermedades genéticas. En trabajos anteriores hemos generado distintas líneas de CMPi por transducción lentiviral bajo condiciones de normoxia e hipoxia, a partir de fibroblastos humanos. Al finalizar el proceso de reprogramación se compararon las eficiencias de generación de CMPi en las dos condiciones de oxígeno a través del conteo de colonias, para así establecer cuál es el método más efectivo. Las líneas fueron luego validadas y caracterizadas, además de evaluarse la expresión de marcadores de pluripotencia y blancos de hipoxia en cultivo hipóxico crónico o agudo sobre líneas establecidas con al menos 5 pasajes. En el presente trabajo nos interesó profundizar en el estudio de las diferencias encontradas en la eficiencia de reprogramación según el nivel de oxígeno, para lo cual se repitieron los experimentos de reprogramación aumentando el tamaño muestral y estudiando el proceso a través de distintas metodologías. Luego, a fin de dilucidar a qué se debían las diferencias se analizó el proceso de reprogramación por In-Cell Western Blot, se investigó el estado proliferativo de las líneas a través de un método de cuantificación de ácidos nucleicos y un estudio de viabilidad, y se analizó el estado apoptótico de las células a través de citometría de flujo para Anexina V. Los resultados obtenidos indican que la hipoxia aumenta la cantidad de colonias de CMPi *bona fide* generadas; sin embargo, encontramos que la expresión de marcadores de pluripotencia es menor que en normoxia, y el resultado final de un mayor número de células reprogramadas se debe a una mayor tasa de proliferación celular durante el cultivo hipóxico post-reprogramación y no al número inicial de células que sufren una reprogramación nuclear.

230. (275) EL TRASPLANTE INTRAPANCREÁTICO DE CÉLULAS REPROGRAMADAS OFRECE UN SITIO ALTERNATIVO PARA TERAPIAS CELULARES EN UN MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO 1 (DT1)

Argumedo, Nelson Rueda¹; Pereyra-Bonnet, Federico¹; Hyon, Sung H²; Argibay, Pablo¹

Instituto de Ciencias Básica y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires¹ Servicio de Cirugía General, Hospital Italiano de Buenos Aires²

La funcionalidad celular está determinada, entre otros factores, por el microambiente extracelular conocido como "nicho". Al pensar en trasplantes de células reprogramadas tipo-pancreáticas en modelos de terapia celular, el páncreas representa un nicho estratégico para proveer todas las señales extracelulares. Sin embargo el trasplante de células en el páncreas no ha sido ampliamente explorado. Objetivo: comparar el trasplante de fibroblastos de pacientes con DT1 reprogramados hasta células tipo-pancreáticas, en el páncreas (n=8) vs en cápsula renal (n=4) de ratones NUDE con diabetes inducida (Protoc. de reprogramación en Pereyra-Bonnet y col., PlosOne 2014; comité de ética E84). Previo al trasplante por RT-PCR las células reprogramadas expresaron *PDX1*, *NGN3*, *GLUT2*, *PAX4*, *PAX6*, *ISL-1*, *GCG*, *STT* y por qPCR insulina *in vitro*. La tasa de mortalidad postrasplante fue 16,6% y 20% para el páncreas y la cápsula renal respectivamente (P>0,05). A los 30d en ambos grupos no hubo diferencia

significativa ($P > 0,05$) de glucemia o pérdida de peso. Asimismo detectamos por qPCR insulina humana en 1/8 (12.5%) de los ratones trasplantados intrapancreáticamente y en 1/4 (20%) de los ratones trasplantados en cápsula renal. Sin embargo a nivel proteína por Immulite®, solo se detectó insulina humana en el suero de los ratones trasplantados intrapancreáticamente (1/8; 12,5%). Para evaluar la biodistribución, las células trasplantadas en el páncreas se marcaron con CM-Dil. No hubo evidencia de marcación en órganos adyacentes ni difusión celular. Finalmente no encontramos daño pancreático cuando mantuvimos por 3 meses las células trasplantadas en ratones sin diabetizar ($n=7$); adicionalmente hallamos insulina humana en sangre por ELISA en 2/7 (28,5%) de estos ratones. Nuestros resultados sugieren que el trasplante intrapancreático de células reprogramadas en comparación con la cápsula renal, ofrece una alternativa igual de segura pero más eficiente en términos de secreción de insulina.

231. (406) EXPANSIÓN Y CARACTERIZACIÓN EX VIVO DE CÉLULAS LIMBARES. EVALUACIÓN DE SU CRECIMIENTO SOBRE DISTINTAS MATRICES BIOCOMPATIBLES PARA SU USO EN LA REGENERACIÓN DE CÓRNEA.

Hagelin, Karin; Balana, María Eugenia; Leirós, Gustavo José

Fundación Cassará-Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein (ICT Milstein)-CONICET

El epitelio de la córnea se renueva con células troncales ubicadas en el limbo, en la periferia de la córnea. La deficiencia limbar lleva a la conjuntivalización de la córnea, dando una ceguera no tratable por trasplante. La única terapia es la restauración del limbo. Una alternativa es el injerto autólogo. Otra es el trasplante de epitelios generados a partir del limbo por ingeniería de tejidos, que requiere de una cantidad suficiente de células para generar construcciones en matrices biocompatibles, y que éstas se mantengan lo más indiferenciadas posible. Fue objetivo de este trabajo la optimización del cultivo de células de limbo humano y la evaluación de diferentes matrices biocompatibles como soportes de crecimiento para ingeniería de tejidos. Se evaluaron cultivos de queratinocitos generados a partir de explantos de limbo humano con y sin "feeder layer". Por QRT-PCR se analizó la presencia de transcritos de isoformas de p63, como marcadoras de "stemness" y de queratinas asociadas a la diferenciación (CK3 y CK19). Se estableció un Índice de "stemness", $IS = (p63\alpha/p63\beta) / (CK3/CK19)$, para evaluar la calidad de los cultivos establecidos. En presencia de "feeder layer", el IS mostró reducirse con los sucesivos re-explantos hasta en un orden de magnitud en el tercer re-explanto. En ausencia de "feeder layer" se observó un patrón errático del IS en los sucesivos re-explantos. Ensayos de expansión celular sobre membrana amniótica, de nanocelulosa y de colágeno generaron epitelios continuos que serán ensayados en un modelo animal de deficiencia limbar que permita evaluar una correlación entre los IS, el tipo de soporte ensayado y el éxito del trasplante. Estos resultados permiten especular que la expansión de células limbares de explantos sobre "feeder layer" mejora las condiciones de "stemness" y que el uso de un re-explanto temprano sería crucial para fines terapéuticos.

232. (425) EFECTO DE LAS HISTONAS SOBRE LA ACTIVIDAD ANGIOGÉNICA DE CÉLULAS ENDOTELIALES MADURAS Y PROGENITORES ENDOTELIALES

Mena, Hebe Agustina; Schattner, Mirta; Negroto, Soledad Laboratorio de Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM

Las histonas forman parte de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Estas estructuras aumentan en sitios de infección, en el espacio peritumoral y durante la reparación tisular donde la formación de nuevos vasos ocurre activamente a partir de células endoteliales maduras preexistentes (angiogénesis) y de progenitores endoteliales (PE) (vasculogénesis). Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de las histonas sobre ambos procesos, analizando diversas respuestas angiogénicas en células endoteliales maduras de micro (HMEC) y macrovasculatura (HU-

VEC) y en PE como la proliferación (pNPP), viabilidad (anexina), reparación de heridas (daño en la monocapa), tubulogénesis (matrigel) y los mecanismos de señalización (immunoblot). Los resultados se expresan en% de inhibición (%inh), $n=4-6$, $p < 0,05$ vs control. Las histonas H1 y H2A (1-4 μ M) no tuvieron efectos significativos. H2B, H3 y H4 (4 μ M) disminuyeron la proliferación en PE (52 \pm 7, 47 \pm 5, 47 \pm 3%inh), HUVEC (74 \pm 8, 39 \pm 8, 44 \pm 4%inh) y HMEC (97 \pm 5, 26 \pm 5, 35 \pm 6%inh). En PE y HUVEC, este efecto de H2B, H3 y H4 fue debido, en parte, a un aumento en el% de necrosis (PE: 37 \pm 9, 19 \pm 3, 29 \pm 8%, HUVEC: 27 \pm 7, 24 \pm 3, 27 \pm 2%) y apoptosis (PE: 7 \pm 2, 15 \pm 4, 10 \pm 2%, HUVEC: 8 \pm 2, 8 \pm 1, 9 \pm 5%), mientras que en HMEC sólo H2B indujo necrosis (73 \pm 23%). Cuando utilizamos una concentración que no afectó la proliferación y sobrevida (1 μ M), H2B, H3 y H4 redujeron de manera leve pero significativa la reparación de heridas (PE: 14 \pm 3, 19 \pm 5, 19 \pm 5, HUVEC: 23 \pm 4, 21 \pm 4, 27 \pm 2 y HMEC: 21 \pm 2, 18 \pm 1, 21 \pm 4%inh). La tubulogénesis también fue inhibida por H2B, H3 y H4 (1 μ M) en PE (39 \pm 12, 55 \pm 11, 52 \pm 11%inh) y HUVEC (10 \pm 2, 55 \pm 13, 58 \pm 10%inh), mientras que en HMEC sólo H3 tuvo efecto (52 \pm 1%inh). Estos resultados se correlacionaron con los niveles de fosforilación de p38, vía inhibitoria de la formación de túbulos. En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que las histonas H2B, H3 y H4 inhiben tanto la vasculogénesis como la angiogénesis a través, en parte, de la activación de p38.

233. (459) ESTUDIO DE MICRORNAS QUE PARTICIPAN DE LA TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS.

Garate, Ximena; Neiman, Gabriel; Romorini, Leonardo; Sevlever, Gustavo; Miriuka, Santiago FLENI

Durante la cardiogénesis las células pluripotentes van sufriendo distintos cambios hasta obtener las características de mesodermo cardíaco, siendo uno de ellos la transición epitelio mesenquimal (TEM). Se conocen varios microRNAs que participan de dicho proceso en células tumorales. Nuestro objetivo fue analizar si estos microRNAs participan de la TEM durante la diferenciación de células madre embrionarias humanas (CMEh) a mesodermo. Las CMEh (H9) se diferenciaron a un progenitor de mesodermo temprano (PMT) creciéndolas en adhesión durante 3.5 días y estimulándolas con los morfógenos BMP-4, Activina-A, bFGF y VEGF. Este progenitor fue caracterizado por citometría de flujo basándonos en la ausencia de CD326 (Ep-CAM) y la expresión de CD56 (N-CAM), y representa el 10 \pm 3% de la población total al día 3.5. Mediante qRT-PCR determinamos que los niveles de expresión del miR-200c y el miR-205 varían luego de la transición (9,11 \pm 4,80 y 0,14 \pm 0,04 veces de inducción vs. día 0, respectivamente). A su vez, determinamos que en el PMT genes característicos de la TEM como *Vimentina* y los inhibidores de E-cadherina (*ZEB1*, *ZEB2*, *Snai1* y *Snai2*) aumentan sus niveles de expresión y que los de *E-cadherina* disminuyen. Por otro lado, buscamos determinar si la señalización por TGF β participa en la entrada a la TEM, dado que esta vía induce la expresión de diversos factores de transcripción que regulan dicho proceso en células tumorales. Para esto, se diferenciaron células H9 a PMT en presencia o ausencia de los inhibidores de TGF β , Dorsomorfina (2 μ M) y SB431542 (10 μ M), y por citometría de flujo determinamos que al bloquear esta vía el porcentaje de células que sufren la transición disminuye (50% y 99%, respectivamente), al igual que la expresión del miR205, miR200c, *ZEB1*, *ZEB2*, *Snai1*, *Snai2* y *E-cadherina*. Podemos concluir que durante la TEM de CMEh la vía de señalización de TGF β sería necesaria y que el miR205 y el miR200c podrían estar involucrados en la regulación de dicho proceso.

234. (488) OBTENCIÓN DE LÁMINAS DE MIOBLASTOS DIAFRAGMÁTICOS OVINOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS PARA REGENERACIÓN MIOCÁRDICA

Giménez, Carlos Sebastián¹; Ramírez, Rodrigo¹; Olea, Fernanda Daniela¹; Hnatiuk, Anna¹; Rodríguez, Tania M²; Pena, Milagros²; Dewey, Ricardo²; Abraham, Gustavo²; Laguens, Rubén¹; Crotogini Alberto¹

Universidad Favalaro¹ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH)-CONICET-UNSAM² Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA)-CONICET-UNMDP³

Dado que el diafragma se compone de fibras tipo I de gran resistencia al estrés y alto umbral de agotamiento que le permite contraerse unas 20 veces/min durante toda la vida, los mioblastos diafragmáticos (MD) serían una opción más adecuada que los de otros músculos esqueléticos para terapias cardio-regenerativas. Nos propusimos aislar, cultivar y caracterizar MD ovinos, transducirlos con el gen de conexina 43 (*cx43*) para promover la conexión entre células, y crecerlos sobre diferentes andamios ("scaffolds") para su aplicación sobre áreas infartadas en forma de láminas. Métodos: Se obtuvieron biopsias de diafragma ovino que se digirieron con colagenasa. Los MD extraídos se cultivaron sobre un feeder layer de macrófagos (FLM) autólogos activados, se caracterizaron con anticuerpos anti-desmina, α -actina sarcomérica, SERCA-2-ATPasa y Ki-67, y por expresión del gen miogénico *myoD* (RT-qPCR). Los MD se transdujeron con lentivirus portadores del gen de *cx43* y de la proteína verde fluorescente (GFP), previa medición de la eficiencia de transducción (ET) de diversas multiplicidades de infección (MOI). Finalmente, se cultivaron los MD sobre scaffolds de pericardio bovino (PB; n=8), ácido poliláctico (PLLA; n=8), y matriz extracelular de vejiga de cerdo (ECM; n=8), y se midió la confluencia (C) a 4 días por un score de 0 a 5, siendo 0: 0%C, 1: 1-20%C, 2: 21-60%C, 3: 41-60%C, 4: 61-80%C y 5: 81-100%C. Resultados: Los MD crecieron satisfactoriamente sobre el FLM y fueron positivos para los anticuerpos probados y para el gen de *myoD*. Con MOI=100 se logró una ET de 70,8% y expresión evidente de *Cx43*. El score de C fue 0 en PB, 2,6 \pm 1,1 en ECM y 4,75 \pm 0,5 en PLLA, ($p < 0,0001$ vs. PB y ECM; X \pm DS, ANOVA-Bonferroni). Conclusión: Los MD fueron exitosamente aislados, cultivados y transducidos. El andamio de PLLA fue el más apropiado para generar láminas. Estos resultados son el primer paso hacia pruebas de eficacia terapéutica en modelos ovinos de infarto de miocardio.

235. (520) EFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LA REGULACIÓN DE MIR-210 Y LA DIFERENCIACIÓN A MESODERMO CARDÍACO DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS

Romorini, Leonardo; Garate, Ximena; Neiman, Gabriel; Luzzani, Carlos; Scassa, María Elida; Sevlever, Gustavo Emilio; Miriuka, Santiago Gabriel
FLENI

Las células madre pluripotentes embrionarias e inducidas humanas (CMEh y CPIh) poseen gran capacidad de diferenciación *in vitro* y potencialidad para ser usadas en medicina regenerativa. Los primeros estadios de la embriogénesis evolucionan en un ambiente hipóxico. Por esto, nuestro objetivo fue estudiar los efectos de la hipoxia durante la auto-renovación y diferenciación de CMEh y CPIh, poniendo especial énfasis en la regulación de microRNAs y la diferenciación a mesodermo cardíaco. Células H9 (CMEh) y FN2.1 (CPIh) en estado indiferenciado fueron cultivadas en hipoxia (5, 3 y 1% O₂). Utilizando stem loop primers específicos medimos por RT-qPCR los niveles de microRNAs regulables por hipoxia (miR-210, miR-328 y miR-150). Observamos que a medida que disminuyeron los niveles de O₂, aumentaron los niveles de expresión de genes blanco, *vegf* y *bnip-3*, de HIF-1 α (factor de transcripción regulado por hipoxia) y de miR-210. Mediante el agregado de deferroxamina, cloruro de cobalto o DMOG (inhiben la degradación de HIF-1 α) provocamos hipoxia química. Tratamos H9 y FN2.1 con concentraciones crecientes de estos compuestos y, por RT-qPCR, observamos un incremento en los niveles de *bnip-3* y miR-210. Analizamos luego el efecto de la hipoxia (5%O₂) durante la diferenciación de H9 a cardiomiocitos. Los niveles de expresión de *bnip-3* y de miR-210 aumentaron tanto en normoxia como en hipoxia, alcanzándose niveles más elevados en hipoxia. Sin embargo, los marcadores de linaje cardíaco *nkx2.5*, *cTnT* y *myh6* resultaron más bajos en hipoxia. No obstante, no hubo diferencias entre los niveles de expresión de marcadores

tempranos de mesodermo, *brachyury* y *mesp-1*. Determinamos que miR-210 es regulado por hipoxia (física y química) durante la auto-renovación y diferenciación cardíaca de CMEh y CPIh. Más aún, la diferenciación dirigida a mesodermo cardíaco en condiciones sostenidas de hipoxia sería menos efectiva.

236. (645) ESTUDIO COMPARATIVO DE HIDROGELES DE FIBRINA PROVENIENTES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y SANGRE ADULTA

Preisegger, Matías Adán¹; Bertolio, Marcela S.¹; Rodríguez, Tania M.¹; Lamas, Paula A.¹; Díaz, Valeria²; Perone, Marcelo J.³; Velasco Zamora, Jorge⁴; Dewey, Ricardo A.¹ Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva – CONICET-Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Chascomús¹ Hospital Municipal San Vicente de Paul, Chascomús, Argentina² Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA)-CONICET-Partner Institute of the Max Planck Society³ Instituto Médico CER, Quilmes, Argentina⁴

Los hidrogeles de matriz extracelular (ECM) se han venido utilizando desde hace varios años como vectores de *delivery* celular para la regeneración de tejidos. Estos son polímeros hidrofílicos producidos a partir de componentes orgánicos o inorgánicos compuestos por más del 90% de agua. Este grupo de materiales proveen un sustrato análogo de ECM dentro o sobre el cual pueden adherirse y proliferar células de cultivos primarios, ya que brindan un medio excelente que se asemeja al medio ambiente acuoso dentro de los tejidos nativos. Se ha observado que las moléculas presentes en el plasma sanguíneo generan una matriz de hidrogel auto formante y mecánicamente estable compuesto de fibrina, que ha sido utilizada para el mantenimiento del fenotipo y expansión celular por varios pasajes de fibroblastos dérmicos primarios, condrocitos articulares y células madre. Estos hidrogeles involucraron la utilización de plasma derivado de sangre del mismo huésped adulto (PSA). El plasma de sangre de cordón umbilical (PSCU) es descartado antes de la criopreservación de SCU. Si bien tanto el PSA como el PSCU forman hidrogel, es poco conocido el perfil de moléculas que ambos contienen. En este estudio investigamos las propiedades de ambos hidrogeles de fibrina mediante el análisis de 80 citoquinas utilizando arreglos de anticuerpos. Observamos que ambos hidrogeles contienen niveles altos, moderados y bajos de angiogenina, CxCL7 y TGF- β 2, respectivamente. Además, MIP-1 β , MIF, CCL18, PIGF, PDGF-BB pudieron ser detectadas sólo en el hidrogel de PSCU en bajos niveles y IGFBP-1, en niveles moderado/alto. Por otra parte RANTES, IGFBP-2, TIMP-1 y TMP-2 se encuentran aumentadas significativamente en PSCU con respecto a PSA. Estos resultados indican que los hidrogeles de PSCU poseen características diferentes a los de PSA y que podrían ser utilizados de modo diferencial y más efectivo para el mantenimiento de cultivos celulares primarios y para ciertas aplicaciones de medicina regenerativa.

237. (673) EL FACTOR INHIBITORIO DE LEUCEMIA EJERCE UN EFECTO ANTIAPOPTÓTICO SOBRE CÉLULAS CARDÍACAS DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS

Blüguermann, Carolina; Neiman, Gabriel; Scassa, María E; Romorini, Leonardo; Miriuka, Santiago
FLENI

El aislamiento de las células madre embrionarias humanas (CMEh) marcó el comienzo de una era de oportunidades para la investigación y el desarrollo de terapias regenerativas. A pesar de los avances logrados en los protocolos de diferenciación de CMEh a cardiomiocitos (CM), éstos aun presentan limitaciones con respecto a la cantidad y pureza de CM obtenidos. Trabajos recientes han demostrado que la activación de la vía de transducción de señales mediada por la glicoproteína gp130 promueve la supervivencia de CM en respuesta a estrés. En el presente trabajo hemos evaluado el efecto del tratamiento con el factor inhibitorio de leucemia (LIF), activador de la vía de gp130, en la viabilidad de CM derivados de CMEh. Para llevar a cabo este objetivo,

empleamos un protocolo de diferenciación cardíaca que incluye el uso de un medio de composición definida y el agregado en ventanas temporales acotadas de BMP-4 (10 ng/ml), Activina A (3 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), IWR-1 (10 μM) y VEGF (5 ng/ml). Mediante el uso de una línea de CMEh (H9-cTnT), donde la expresión de la proteína verde fluorescente y del gen que confiere resistencia a zeocina se hallan reguladas por el promotor de la cardio troponina T, pudimos observar en la población resistente al antibiótico (GFP⁺); que el agregado de LIF (100 ng/ml) al día 8 del proceso de diferenciación permite aumentar significativamente el número de CM generados. Realizando ensayos de viabilidad celular (XTT), fragmentación del ADN (tunel y cuantificación de oligómeros por ELISA) e inmunoreactividad de las proteínas Bcl_{XL} y Bax (Western blot) determinamos que LIF ejercería un efecto antiapoptótico sobre la población de CMEh expuesta a un protocolo de diferenciación cardíaca. Éste efecto sería efectivo sobre progenitores a partir del día 8 de diferenciación y no en precursores más tempranos. En conclusión, el LIF aumenta la supervivencia de los CM derivados de CMEh, particularmente durante las etapas finales de su diferenciación.

238. (718) EL RECEPTOR DEL FACTOR DE MOTILIDAD AUTOCRINA (AMFR) EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES HACIA EL HEPATOCARCINOMA: COMPARACIÓN DE CÉLULAS OBTENIDAS DE CORDÓN UMBILICAL Y DE MÉDULA ÓSEA.

Bayo, Juan¹; Fiore, Esteban¹; Aquino, Jorge B.⁴; Malvicini, Mariana^{1,4}; Rizzo, Manglio¹; Peixoto, Estanislao¹; Alaniz, Laura^{1,4}; Piccioni, Flavia¹; Bolontrade, Marcela^{2,4}; Podhajcer, Osvaldo^{2,4}; Mazzolini, Guillermo^{1,3,4}; García, Mariana G.^{1,4} Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral¹ Laboratorio de Terapia Celular y Molecular, Fundación Instituto Leloir² Unidad de Hígado, Hospital Universitario Austral, Universidad Austral³ CONICET⁴

El hepatocarcinoma (HCC), tumor primario de hígado, es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo. Su mortalidad e incidencia se encuentran en incremento, y los tratamientos con intenciones curativas sólo son aplicables en estadios tempranos de la enfermedad. En este contexto emerge la terapia celular como alternativa promisoría. Las células estromales mesenquimales (MSCs) poseen la capacidad de migrar en respuesta a citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Previamente hemos descrito que las MSCs migran hacia factores producidos por el HCC y particularmente hacia el factor de motilidad autocrina (AMF). Si bien en la mayoría de los reportes utilizan MSCs obtenidas de médula ósea (MO), recientemente se han aislado MSCs a partir del cordón umbilical, con la ventaja de utilizar procedimientos no invasivos. El objetivo de este trabajo fue comparar *in vitro* e *in vivo* la capacidad de migración de MSCs-MO y las obtenidas de la fracción perivascular del cordón umbilical (HUCPVCs) hacia el HCC, analizando los mecanismos involucrados. Se evaluó la migración *in vitro* en cámara de Boyden y la migración *in vivo* mediante sistema de imágenes *in vivo* de las MSCs teñidas con colorantes fluorescentes (In vivo Imaging, Xenogen). Observamos que las HUCPVCs presentaron mayor migración *in vitro* e *in vivo* que MSC-MO hacia el HCC (**p<0,001 y *p<0,05, respectivamente). Mediante RT-PCR en tiempo real se observó mayor expresión en HUCPVCs en comparación con MSC-MO del receptor de AMF (AMFR) y de los genes de la vía AMF-AMFR (caveolina 1 y 2, y metaloproteinasa 3) (**p<0,001). Las HUCPVCs presentaron mayor migración *in vitro* hacia el AMF recombinante que las MSC-MO (*p<0,05) y la inhibición de este factor en el medio condicionado de HCC disminuyó la migración de las HUCPVCs en mayor medida que las MSC-MO (*p<0,05). En conclusión, las HUCPVCs presentan mayor migración hacia el HCC, en parte por una mayor expresión de AMFR, sugiriendo una ventaja en la utilización de estas células en comparación con las MSC-MO para el transporte de genes terapéuticos.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 2

239. (569) MITOFUSINA 2 PARTICIPA EN LA SÍNTESIS DE ALDOSTERONA ESTIMULADA POR ANGIOTENSINA II EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES H295R.

Poderoso, Cecilia; Mele, Pablo; Castillo, Ana Fernanda; Helfenberger, Katia E.; Podestá, Ernesto J. Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

En células productoras de esteroides, la mitocondria es central en la esteroidogénesis y en el transporte de colesterol inducido hormonalmente desde la membrana mitocondrial externa a la interna, paso limitante de la vía. Este paso está regulado por la proteína StAR, entre otras, y diferentes enzimas se localizan en la mitocondria y retículo endoplásmico para producir la hormona esteroide final. Hemos demostrado, en células de Leydig MA-10, que la estimulación hormonal promueve la fusión de mitocondrias necesaria para la esteroidogénesis mediante la actividad de PKA. En este sistema, hemos descrito que la presencia de Mitofusina 2 (Mfn2), una proteína central en la fusión, es necesaria para la localización mitocondrial de StAR. El objetivo principal del presente trabajo es estudiar el rol de la fusión mitocondrial en la regulación de la síntesis de aldosterona por Angiotensina II (AngII) y por AMPc en células adrenocorticales H295R. La AngII promueve la activación por fosforilación de ERK en la mitocondria en forma transitoria, en línea con nuestros resultados con AMPc en células MA-10. Hemos observado en células H295R, un aumento en la fusión mitocondrial luego de la estimulación con 8Br-AMPc, un análogo permeable del AMPc. Existe un incremento dependiente del tiempo en la expresión de Mfn2 luego de la estimulación con AngII y 8Br-AMPc. Más aún, la disminución en la expresión de Mfn2 mediante la técnica del siRNA es suficiente para disminuir la síntesis de esteroides estimulada por ambas vías de transducción (Sin siRNA-Mfn2: AngII: 0,48±0,10; 8Br-AMPc: 0,70±0,13; con siRNA-Mfn2: AngII: 0,29±0,07; 8Br-AMPc: 0,50±0,10; ng/ml de aldosterona. P<0,05). Demostramos que Mfn2 es necesaria en la regulación de los niveles mitocondriales de StAR luego de la estimulación por AngII y 8Br-AMPc. Estos resultados resaltan la importancia de la reorganización mitocondrial mediada por diferentes vías de transducción de señales en diversas células esteroidogénicas.

240. (577) PARTICIPACIÓN DE CIP4 EN LA ADQUISICIÓN DEL FENOTIPO MIGRATORIO EN CÉLULAS EPITELIALES.

Hidalgo, Florencia^{1,3}; Tonucci, Facundo¹; Ferretti, Anabela¹; Vena, Rodrigo²; Favre, Cristian^{1,3}; Larocca, María Cecilia^{1,3} Instituto de Fisiología Experimental¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario² Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario³

Diversas situaciones fisiopatológicas inducen la conversión de la polaridad epitelial en la antero-posterior necesaria para la migración direccionada. Eventos tempranos de esta transición son el movimiento del núcleo hacia el polo posterior de la célula y la orientación de los centrosomas (Ct) y el aparato de Golgi (AG) hacia el polo anterior. AKAP350 es una proteína de andamiaje localizada en AG y Ct. Recientemente describimos que AKAP350 centrosomal participa en la obtención de la polaridad migratoria en células de origen epitelial. AKAP350 interacciona con la proteína efectora de cdc42 CIP4, que integra el rearme del citoesqueleto durante la formación de estructuras de membrana polarizadas. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de CIP4 en la adquisición de la polaridad migratoria en células de origen epitelial. Inicialmente, caracterizamos la localización centrosomal de CIP4. Luego, generamos células HepG2 con expresión disminuida de AKAP350 (A350KD), y de CIP4 (C4KD) por RNA de interferencia. Analizamos la obtención de la polaridad migratoria, mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia de ensayos de "wound-healing". La disminución en la expresión de ambas proteínas indujo una pérdida de la polarización del AG y de los

Ct (% GA polarizado: controles(C):72%±10, A350KD:22%±10*, C4KD:11%±5*. % Ct polarizado: C:65%±6, A350KD:28%±5*, C4KD:14%±3*). Utilizando estos ensayos, determinamos la distancia (D) del centroide de los núcleos (N) y de los Ct al frente de migración respecto a la del centroide de la célula. Observamos que el "knock down" de AKAP350 y de CIP4 indujo una prevención en la relocalización anterior de los centrosomas (D Ct: C:-4±1 A350KD:-18±1,9* C4KD:-24±1,5*), pero no en la posterior de los núcleos (D N: C:-9 ±1 A350KD:-13±1 C4KD:-10±0,6). De este modo, confirmamos el rol de AKAP350 en la obtención del fenotipo migratorio y caracterizamos la participación de su proteína de interacción CIP4, en este proceso. (*p<0,05)

241. (578) EL CANAL DE CLORURO CFTR Y SU REGULACIÓN POR LA PROTEÍNA XSHROOM1 EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS

Palma, Alejandra; Galizia, Luciano; Marino, Gabriela; Kotsias, Basilio
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

xShroom1 es una proteína asociada al citoesqueleto, factor importante en la regulación del canal de cloruro CFTR. Nuestro objetivo fue estudiar la manera en que ocurre esta regulación. Registramos corrientes activadas por AMPc (-0,40 ± 0,14 µA, n=13) en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con CFTR, aplicando pulsos de voltaje desde -160 a +40 mV. Estas corrientes fueron bloqueadas con el inhibidor DPC (-0,020 ± 0,007 µA, n=4, p<0,01). Por biotinylation, detectamos las bandas esperadas para CFTR (~160 KDa), confirmando su expresión en la membrana plasmática. Examinamos si xShroom1 afecta las corrientes de CFTR. En los ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisense contra xShroom1, aumentó la corriente (-0,95 ± 0,52 µA, n=8) respecto a los valores en los ovocitos controles coinyectados con el *sense* de xShroom1 (-0,19 ± 0,12 µA, n=10, p<0,01). Para investigar el mecanismo, tratamos los ovocitos con MG132 (inhibidor del proteosoma), lo cual no produjo que las corrientes de CFTR vuelvan a los valores controles observados en ausencia del *antisense* de xShroom1 (*Sense* xShroom1: -0,17 ± 0,03 µA; *Antisense* xShroom1: -0,34 ± 0,06 µA, n=3, p<0,05). El bloqueo de xShroom1 produjo un aumento en la vida media del CFTR de 0,74 ± 0,18 hs a 2,49 ± 0,16 hs (n=3; p<0,01). Los ovocitos coinyectados con el *antisense* de xShroom1 fueron incubados con el inhibidor del lisosoma, cloroquina, lo que previno el efecto de xShroom1 (*Sense* xShroom1: - 0,24 ± 0,03 µA, *Antisense* xShroom1: -0,23 ± 0,04 µA). Concluimos que la regulación entre CFTR y xShroom1 no ocurriría a través de un mayor transporte del canal a la membrana. Los experimentos con MG132 sugieren que el proteosoma no se encuentra involucrado en el efecto de xShroom1 sobre CFTR. Para determinar si la vía lisosomal era la vía de degradación, el tratamiento con cloroquina previno el efecto producido por la inhibición de xShroom1, sugiriendo que la degradación por el lisosoma contribuye al efecto de xShroom1 sobre el CFTR.

242. (601) PARTICIPACIÓN DE LAS QUINASAS AMPK Y PKA EN LA MODULACIÓN DEL CICLO Y LA MUERTE CELULAR EN CÉLULAS DERIVADAS DE HEPATOCARCINOMA ANTE FALTA DE GLUCOSA

Ferretti, Anabela C; Tonucci, Facundo; Hidalgo, Florencia; Ojeda, Mara; Larocca, María C; Favre, Cristián
Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET

La glucólisis es la principal fuente de energía de las células tumorales, siendo el crecimiento de las mismas altamente dependientes de glucosa. Las quinasas PKA y AMPK intervienen en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis en respuesta a distintas señales metabólicas y de crecimiento. Dependiendo de la situación y del tipo celular, ambas pueden tener roles duales. Previamente demostramos que la ausencia de glucosa produce una pérdida progresiva de la viabilidad en células HepG2, asociada a la inducción de muerte apoptótica; y un aumento en los niveles de las proteínas claves en la regulación del ciclo celular, p53 y p21. Por otro lado, también observamos que tanto la activación de PKA

como de AMPK inducen muerte apoptótica en dichas células. En el presente estudio evaluamos la interconexión entre estas vías de señalización durante la restricción de glucosa. Células HepG2 se incubaron distintos tiempos en presencia (C) y ausencia de glucosa (Glc0) y se analizó la activación de PKA y AMPK. Ambas quinasas se activaron significativamente a partir de las 2 h de ausencia de glucosa. Estudios citométricos revelaron que luego de 36 h la falta de glucosa ó el activador de AMPK, AICAR, provocaron un aumento en la población de células en la fase G₀/G₁ del ciclo celular (Glc0: 73,2±2,6%*; AICAR: 66,9±1,4%*; AICAR glc0: 72,2±0,4%* vs C: 55,7±2,7%). Por otro lado, la activación de PKA con dbAMPc previno en más de un 50% el arresto en G₀/G₁ inducido por AICAR. A la vez, la activación de PKA disminuyó los niveles de AMPK activada (Thr172-P), mientras que la inhibición de PKA potenció la activación de AMPK. Mediante estudios de inmunoprecipitación demostramos que PKA fosforila a AMPK. Nuestros resultados sugieren que, mediante fosforilación directa, PKA es capaz de regular negativamente la activación de AMPK durante la restricción de glucosa en células HepG2. Se discutirán los estudios genéticos con los que tratamos de confirmar este mecanismo. * p<0,05 vs. C.

243. (603) LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES REQUIERE LA ACTIVACIÓN DE P38 MAPK

Rubio, María E¹; Franco, Diana Lorena²; Pabelo, Laura Carolina¹; Zwirner, Norberto W²; Coso, Omar A³; Costas, Mónica A¹

Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM)-CONICET¹ Laboratorio de Fisiopatología de la Inmunidad Innata, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET² Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³

Los Glucocorticoides (GC) son esenciales durante la respuesta anti-inflamatoria inducida por citoquinas. El Receptor de glucocorticoides (GR) es blanco de fosforilación, lo cual regula su actividad transcripcional. Demostramos previamente que los GC y la citoquina inflamatoria TNF activan fuertemente a p38MAPK, la cual fosforila al GR y al coactivador TIF2. El objetivo de este trabajo fue investigar el rol de p38 en la función reguladora de citoquinas sobre GR. Para analizar el efecto de p38 sobre la actividad transcripcional de GR, células embrionarias de riñón humano (HEK293) fueron transfectadas con un plásmido reportero para GR (GRE-Luc) y estimuladas con Dexametasona (D 500nM) o D+T (T 0,02ng/ml). El estímulo simultáneo incrementa la respuesta de GR respecto Dex (7,3±0,2 vs 4,8±0,7 p<0,001). El inhibidor de p38 (SB203580 10µM), inhibe la actividad de GR, pero el efecto de T+D respecto de Dex se sigue observando (3,2±0,7 vs 1,5±0,6 p<0,001). La actividad de GR requiere de coactivadores, entre ellos TIF2, su sobreexpresión potencia el efecto de Dex y también de D+T (27,6±1,9 y 38,4±4,3, respectivamente), pero la adición de SB bloquea totalmente el efecto de TIF2 sobre la actividad de GR (D+SB 3,0±0,8 y T+D+SB 5,5±1,5). Para estudiar si la fosforilación de TIF2 puede afectar la actividad de GR, la serina 1323 potencial blanco de fosforilación fue mutada por una alanina, inactivando el sitio de fosforilación. Las células transfectadas con esta construcción estimuladas con Dex se comportan de manera similar a las que no sobreexpresan el coactivador. Por lo tanto, la activación de p38 constituye un paso crítico que regula la sensibilidad a GC. Estos resultados contribuyen a entender mejor los mecanismos moleculares de homeostasis que impiden una inflamación excesiva y podrían constituir una forma de prevenir el daño tisular.

244. (617) INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MCAM DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS 3T3-L1

Gabrielli, Matías¹; Martíni, Claudia Noemí¹; Romero, Damián Gastón²; Vila, María Del Carmen¹

Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹ Department of Biochemistry, University of Mississippi Medical Center²

Dada la incidencia de la obesidad en la población, se pretenden contribuir a dilucidar los eventos moleculares que participan en la diferenciación de células precursoras a adipocitos. En este trabajo se utilizan los fibroblastos 3T3-L1 que se diferencian por agregado de una mezcla que contiene insulina, dexametasona (DEX) y metilisobutilxantina (MIX). Nos interesa identificar nuevos genes importantes en la adipogénesis. El gen MCAM (melanoma cell adhesion molecule) codifica una proteína transmembrana que pertenece a la familia de proteínas de adhesión celular, las cuales juegan un rol importante en la interacción entre las células y su entorno. Originalmente se lo identificó como un marcador asociado a melanomas, sin embargo últimamente se ha descripto su participación en procesos tales como desarrollo y organogénesis, transducción de señales y diferenciación de células madre, entre otros. En un análisis por microarray hemos encontrado que la expresión del gen MCAM aparece significativamente aumentada por tratamiento de los fibroblastos 3T3-L1 con la mezcla de diferenciación, resultados que confirmamos por qRT-PCR. Además, se encontró que MCAM es inducido cuando se produce diferenciación sea por tratamiento con la mezcla de diferenciación o con MIX+DEX que induce un porcentaje menor de diferenciación. Ni los componentes individuales de la mezcla de diferenciación ni aquellas mezclas binarias que no producen diferenciación, inducen este gen. El análisis cinético muestra que el ARNm del gen maestro de la diferenciación PPAR gamma y el de un gen activado por éste, perilipina-1, aumentan después de 1 y 2 días de inducida la diferenciación, respectivamente, mientras MCAM aumenta a los 3 días. Además pioglitazona, un activador de PPAR gamma, aumenta el contenido del ARNm de MCAM. Estos resultados sugieren que MCAM estaría activado río abajo de PPAR gamma durante la diferenciación. Se continuará investigando la regulación y el requerimiento de este gen en la adipogénesis.

245. (625) EFECTOS DE NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES EN LA PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y MIGRACIÓN DE OSTEOBLASTOS

Laiuppa, Juan Andrés; Santillán, Graciela
Departamento Biología, Bioquímica y Farmacia - Universidad Nacional del Sur

La proliferación, diferenciación y migración de osteoblastos son procesos clave en la remodelación normal del hueso y en la reparación o consolidación de lesiones óseas. Los nucleótidos (ATP, UTP) pueden ser liberados desde células óseas, al medio extracelular. Estos nucleótidos, o sus metabolitos, desencadenan diversas respuestas al unirse a receptores P2 de la membrana plasmática, ya sea P2Y (metabotrópicos) o P2X (ionotrópicos). En este trabajo, se estudió el efecto de algunos nucleótidos sobre la proliferación, diferenciación y migración de osteoblastos. Para ello utilizamos cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata neonata y la línea celular MC3T3 (osteoblastos murinos). La proliferación se evaluó con citometría de flujo, por tinción con Ioduro de Propidio (IP). Observamos que ATPyS 10 μ M estimuló la división de las células óseas ($p < 0,001$), mientras que el inhibidor de PI3K (Ly294002) lo frenó ($p < 0,001$). Además, éste último también contrarrestó el aumento inducido por ATPyS 10 μ M ($p < 0,025$). Para estudiar la diferenciación osteoblástica, se analizó la actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FAL). Para ello, las células se incubaron en medio osteogénico (alfa-MEM 1% SFB, ácido ascórbico 300 μ M y beta-glicerofosfato 10 nM), con CaCl₂ 4 mM, en presencia y ausencia de los nucleótidos. El tratamiento con UTP 10 μ M ($p < 0,005$) o UDP 100 μ M ($p < 0,005$), durante 6 días, incrementó la actividad de FAL respecto del control. Por último, se analizó la migración celular mediante "ensayo de la herida". El tratamiento con ATPyS 10 μ M provocó una desaceleración (de un 48%) en la velocidad de migración, entre las 20 y las 48 hs de tratamiento. Los resultados obtenidos sugieren que la proliferación, diferenciación y migración de osteoblastos pueden ser reguladas por estos nucleótidos, mostrando a los receptores purinérgicos como posibles blancos farmacológicos para el tratamiento de patologías óseas.

246. (647) RELACIÓN ENTRE EL CANAL REGULADOR DE LA FIBROSIS QUÍSTICA (CFTR) Y EL CANAL EPITELIAL DE SODIO (ENaC), Y LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS BEWO DE TROFOBLASTO HUMANO

Marino, Gabriela I; Palma, Alejandra G; Kotsias, Basilio A
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

El canal epitelial de sodio sensible al amiloride (ENaC) y el canal de cloruro CFTR están presentes y son funcionales en la placenta humana y en la línea celular BeWo derivada de trofoblasto humano. En numerosos epitelios, el ENaC presenta una compleja regulación por el CFTR. Nuestro objetivo fue estudiar la interacción funcional entre ENaC y CFTR y sus efectos sobre la migración en estas células. Utilizamos técnicas electrofisiológicas (*patch clamp*, configuración célula entera) y de biología molecular. Al evaluar la estimulación y bloqueo del CFTR sobre la actividad del ENaC, comprobamos un aumento de las corrientes sensibles al amiloride (-8.0 pA/pF a -140 mV) con forskolina (20 μ M, 3 min), un activador de la adenilato ciclasa. Estas corrientes se inhibieron con el inhibidor específico de CFTR, tiazolidona CFTR_{inh}-172 (2 μ M): -5.5 pA/pF (a -140 mV) ($p < 0,05$, $n=3$). La forskolina aumentó la expresión de la forma proteolizada de la proteína α -ENaC (30-35 KDa) con respecto al control, y este incremento no se observó cuando se inhibió específicamente al CFTR ($n=3$). Mediante inmunoprecipitación encontramos en células sin tratamiento, que el ENaC se asocia a CFTR y detectamos únicamente la banda correspondiente a la forma proteolizada de α -ENaC en los inmunoprecipitados con anti-CFTR. Evaluamos la capacidad migratoria de las células realizando una herida en las monocapas y midiendo el porcentaje cicatrizado a las 6 h. Las células tratadas con CFTR_{inh}-172, en presencia de 100 μ M de AMPc y 100 nM de aldosterona cubrieron una menor superficie de las heridas ($\sim 11\%$), comparado con las células en ausencia del inhibidor ($\sim 39\%$). El mismo efecto se observó al tratar las células con amiloride ($\sim 16\%$) ($p < 0,05$, $n=4$). Ensayos de proliferación celular indican que la migración es el principal factor involucrado en este fenómeno. Concluimos que las células BeWo presentan una relación regulatoria del canal CFTR con el ENaC implicada en el proceso migratorio del trofoblasto.

247. (654) EFECTOS DEL ANÁLOGO DEL ACIDO COLESTENOICO (27-NOR- Δ 24- β -OH-5-COLESTENOICO) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR X DE HIGADO (LXR)

Navalesi, Daniela; Grinman, Diego; Dansey, María Virginia; Pecci, Adalí
Instituto de Fisiología, Biología molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-UBA-CONICET

Los Receptores X de Hígado (LXR α y β) son factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares activados por oxisteroles. Están involucrados en el control de funciones fisiológicas como el metabolismo lipídico y la proliferación y apoptosis. En la glándula mamaria, los LXRs no sólo regulan la síntesis y secreción de lípidos de la leche durante la lactancia sino que tienen efectos antiproliferativos y proapoptóticos sobre las células epiteliales. Existen numerosas evidencias que vinculan estos efectos con la actividad de LXR como modulador de la homeostasis lipídica. Nuestro objetivo fue analizar la acción del compuesto 27-nor- Δ 24- β -OH-5-colestenoico (27-nor-Col), un nuevo ligando análogo del ácido colestenoico, sobre la expresión de genes involucrados en el transporte reverso de colesterol y síntesis de triglicéridos en líneas celulares mamarias normales (HC11) y tumorales (T47D). Ambos tipos celulares expresan las dos isoformas de LXR. Además, en células T47D el agonista comercial de LXR GW3965 incubado durante 18 hs indujo la expresión de SREBP1 (factor de transcripción activado por esteroides) 3,7 \pm 0,7 veces, ABCA1 (transportador de colesterol) 52 \pm 14 veces, ApoE (apolipoproteína E) 2,1 \pm 0,5 veces y FAS (sintasa de ácidos grasos) en 2,2 \pm 0,2 veces mientras que la co-incubación con el 27-nor-Col antagonizó la inducción de FAS mediada por GW3965. Más aún, el 27-nor-Col *per se* inhibió la expresión de FAS 0,6 \pm 0,2 veces respecto del control, estimuló la expresión de ApoE (2,0 \pm 0,2) y ABCA1 (3,7 \pm 1,7) y no modificó la expresión de

SREBP1. Paralelamente, en células HC11 27-nor-Col también se comportó como un antagonista y agonista inverso cuando fue incubado con GW o sólo, respectivamente, sobre la expresión de FAS y de ABCA1. De acuerdo con estos resultados este nuevo ligando presentaría un efecto diferencial en la regulación del flujo de colesterol y la síntesis de triglicéridos en células epiteliales mamarias normales y tumorales.

248. (662) MÉTODOS FOSFOPROTEÓMICOS PARA DETERMINAR ACTIVIDADES QUINASA Y NUEVOS SUSTRATOS CELULARES EN FRACCIONES CITOPLÁSMICAS DE MACRÓFAGOS HUMANOS THP-1 UTILIZANDO PÉPTIDOS SUSTRATOS Y PROTEÍNAS ENDÓGENAS

Asensio, Cristian Jorge Alejandro^{1,2}; García, Rodolfo C.²
Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET¹ ICGEB, TRIESTE, ITALIA²

La fosfoproteómica mostró gran crecimiento en 20 años pero es aun necesario desarrollar técnicas. Sus objetivos son caracterizar nuevos sustratos celulares de quinasas definiendo redes de interacción quinasa-sustrato y consecuencias fisiopatológicas de las fosforilaciones. Utilizamos fracciones citoplásmicas (citósol/membranas) de la línea de macrófagos humanos THP1 para estudiar sus actividades quinasas en células infectadas con bacterias o no. Buscamos determinar actividades quinasas diferenciales entre tratamientos. Hipotéticamente también utilizar las quinasas endógenas para detectar radioactivamente proteínas citoplásmicas fosforilables y expresadas diferencialmente entre tratamientos. Optimizamos las condiciones de fosforilación *in vitro* (iv) de fracciones sin agregar quinasas exógenas. Determinamos las actividades quinasas endógenas utilizando péptidos exógenos por un lado y sustratos endógenos por otro. Exploramos diferentes condiciones de fosforilación: buffer, pH, iones, sales, lípidos, inhibidores, fracciones puras o combinadas, y tipo de nucleótido marcado en Pgama (ATP/GTP). Para una misma muestra celular los patrones de proteínas fosforilables *iv* difirieron significativamente según la condición maximizando probabilidades de detectar nuevos sustratos. También comparamos la marcación con ³²P de proteínas endógenas debida a fosforilación con la debida a nucleotidilación (incorporación del Palfa desde un nucleótido) una PTM poco explorada en humanos. La infección alteró niveles de algunas proteínas fosforilables *iv*. Entre ellas, la nucleolina citosólica disminuida por la infección fue fosforilable por CK2 como otros reportaron, validando nuestros ensayos. La vimentina incrementada por la infección fue fosforilable por PKCs (como otros reportaron). Por otro lado, caracterizamos NUEVOS sustratos: a) una nueva forma citosólica de Bip inducida tardíamente por infecciones y fosforilable por PKCs; b) otro sustrato de CK2 inducido por infección,

249. (678) GALECTINA-1 ACTIVA LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR: ROL EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

Bacigalupo, María Lorena¹; Manzi, Malena¹; Espelt, María Victoria¹; Carabias, Pablo¹; Elola, María Teresa¹; Rabinovich, Gabriel Adrián²; Wolfenstein-Todel, Carlota¹; Troncoso, María Fernanda¹
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 que une β -galactósidos cuya expresión se encuentra aumentada en el carcinoma hepatocelular (CHC). En trabajos previos, demostramos que la sobreexpresión de Gal1 en células de CHC humano, HepG2, promueve el crecimiento tumoral, la presencia de metástasis en nódulos drenantes al tumor e induce la transición epitelio mesénquima (TEM), evento clave en la diseminación de las células tumorales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de la vía Wnt/ β -catenina, frecuentemente alterada en el CHC, en la inducción de la TEM mediada por Gal1. Las células HepG2

poseen una mutación heterocigota en el gen de β cat (delección del dominio regulatorio), que resulta en la coexpresión de las isoformas silvestre y truncada. Las células que sobreexpresan Gal1 (HepG2Gal1) expresan un 70 \pm 8% de la isoforma silvestre respecto al control (p<0,05 Western blot, WB), mientras que no se observan diferencias en la forma truncada. Las células HepG2Gal1 exhiben mayor acumulación nuclear de β cat (microscopia confocal), mayor actividad transcripcional de β cat/TCF (p<0,05, ensayos con plásmidos reporteros TOP/FOP), y mayores niveles de expresión de los principales blancos de la vía Wnt, ciclinaD1 y c-myc (122 \pm 2% y 139 \pm 9%, respectivamente p<0,05 WB). Akt fosforila a β cat en el residuo Ser⁵⁵² promoviendo la translocación nuclear de la misma; las células HepG2Gal1 presentan mayores niveles de p β cat^{S552} (150 \pm 24% p<0,05 WB). La vía de PI3K/PDK1 fosforila y activa a Akt; las células HepG2Gal1 muestran mayores niveles de pAkt^{T308} (188 \pm 20% p<0,05 WB). Analizamos la expresión del marcador epitelial Ecad en presencia de Wortmanina (inhibidor de PI3K); esto previno completamente la disminución de Ecad observada en las células HepG2Gal1 en ausencia del inhibidor (108 \pm 5 vs 50 \pm 5 WB). Concluimos que la sobreexpresión de Gal1 induce la TEM en las células HepG2 a través de un mecanismo que involucra la activación de la vía Wnt y la fosforilación de Akt dependiente de PI3K.

250. (699) MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT EN CÉLULAS INTESTINALES TUMORALES EXPUESTAS AL ANÁLOGO TUMORAL DE LA HORMONA PARATIROIDEA

Martín, María Julia; Wies Mancini, Victoria; Calvo, Natalia; Russo De Boland, Ana; Gentili, Claudia
Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR)-Universidad Nacional del Sur

El análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) está presente en el feto, en la mayoría de los tejidos adultos y en diversos tumores. Su expresión se correlaciona con la gravedad del carcinoma de colon y en ciertas líneas celulares intestinales su sobreexpresión aumenta la proliferación celular. Previamente demostramos que el tratamiento con PTHrP exógeno (10⁻⁸ M) estimula la proliferación en la línea celular Caco-2 derivada de adenocarcinoma de colon humano a través de la activación de las vías de señalización de las ERK1/2, p38 MAPK y PI3K/Akt. En el presente trabajo se profundizó el estudio de los mecanismos moleculares que modulan la activación por PTHrP de la vía PI3K/Akt en estas células intestinales tumorales. Se observó, que el tratamiento hormonal activaría PI3K clase IA mediante la fosforilación y consecuente inactivación de la subunidad regulatoria/inhibidora de PI3K (p85 α / β). La hormona además fosforila el residuo Tyr-416 y desfosforila el residuo Tyr-530 de Src, eventos clave en la activación de esta tirosina quinasa. El inhibidor específico de Src, PP1, revierte la fosforilación de Akt inducida por PTHrP, sugiriendo que la hormona modularía la vía de señalización de PI3K/Akt mediante la activación de la tirosina quinasa Src. Es sabido que Akt activado puede fosforilar varias proteínas "blanco" incluyendo β -catenina, que es una molécula que favorece la expresión de genes relevantes para la progresión del cáncer colorrectal. Nuestros resultados revelan que PTHrP induce la fosforilación del residuo Ser 675 de β -catenina y su ubicación nuclear. El entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la acción proliferativa de PTHrP en las células de adenocarcinoma de colon humano podría ser de potencial interés en medicina para generar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del cáncer.

251. (781) REGULACIÓN Y ROL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN KLF6 EN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA Y PROGRESIÓN TUMORAL

Trucco, Lucas^{1,2}; Nicola, Juan Pablo^{1,2}; Bocco, José Luis^{1,2}
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET¹ Depto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba²

KLF6 es un miembro de la familia de factores tipo-Krüppel cuya pérdida de función debido a delección, mutaciones o alte-

ración del splicing alternativo, ha sido asociada al desarrollo de cáncer. Previamente demostramos que la expresión de KLF6 es inducida por una variante oncogénica de Ras (H-Ras^{G12V}) de manera dependiente de la actividad de las MAP kinasas JNK, y que KLF6 ectópico es capaz de disminuir la proliferación celular, revertir el fenotipo transformado y reducir el crecimiento tumoral in vivo. En este trabajo, evaluamos el efecto del silenciamiento de KLF6 sobre la transformación celular y tumorigénesis. La disminución de la expresión de KLF6 en células NIH3T3 mediante la utilización de RNA de interferencia, les confirió la capacidad de crecer de manera independiente de factores de crecimiento del suero y permitió la formación de focos de transformación al ser cultivadas a alta densidad. Asimismo, estas células generaron tumores cuando fueron xenotransplantadas en ratones nude, mientras que las células control fueron incapaces de crecer in vivo. Estos resultados se correlacionaron con una disminución significativa de los niveles de expresión del inhibidor de CDK, p21. Por otra parte, la inducción de KLF6 mediada por H-Ras^{G12V}, resultó ser dispensable para el establecimiento del fenotipo maligno dependiente de este oncogén, determinado por ensayos de formación de colonias en soft agar y el desarrollo de tumores en ratones inmunodeficientes. Adicionalmente, demostramos que la expresión de KLF6 produce un arresto del ciclo celular, el cual es suprimido por la depleción de p21. A su vez, esta respuesta citostática se encontró asociada a una resistencia a la apoptosis causada por drogas quimioterapéuticas que producen daño al DNA. En conclusión, estos hallazgos indican que KLF6 cumple un rol preponderante dentro de los mecanismos de supresión tumoral, y que la inhibición de su función representa un evento temprano durante la progresión neoplásica.

252. 793) LOS EFECTOS DEL ESTRÉS MECÁNICO SOBRE CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS SON INDEPENDIENTES DE SU ADHESIÓN A UNA MATRIZ RICA EN COLÁGENO

Santamans, Avelén M.; Solá, García Martín; Blengini, María Laura; Coso, Omar A.; Kordon, Edith C.
Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

El desarrollo de la glándula mamaria es un proceso complejo. Del embarazo a la lactancia, el crecimiento lobulillo-alveolar es seguido por la diferenciación completa del epitelio mamario y la producción y secreción de leche. Al destete se produce en las células epiteliales el disparo de cascadas de señalización que inducen la muerte celular. Al menos parte de este súbito cambio se debe al estrés mecánico resultante de la acumulación de leche. Experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que el estiramiento ejercido en cultivo sobre la línea celular mamaria HC11 indujo la expresión de c-fos y citoquinas inflamatorias como LIF, estando ambos eventos asociados a la involución mamaria post-parto. En esos estudios, ya reportados, crecimos y analizamos las células sobre una membrana de siliconas cubierta con colágeno I. El objetivo de este trabajo fue determinar si la presencia de esta proteína era necesaria para generar la respuesta biológica. En este caso se utilizaron membranas de silicona comerciales que permiten la visualización de las células con microscopía confocal. Las mismas fueron cortadas, tratadas con lavandina para disminuir su hidrofobicidad, autoclavadas y colocadas en placas p60. Se las cubrió con una solución de poli-Lysine Sigma 1% (diluída 1/50) y encima se sembraron células HC11. A las 24 horas las membranas con las células adheridas se colocaron en el dispositivo de estiramiento. Se aplicó un estímulo correspondiente a un incremento del 20% radial por 30 min y 1 h. Luego se extrajo ARN y se analizaron los niveles de expresión de LIF y c-fos por qRT-PCR. Encontramos que, de manera similar a lo previamente reportado, luego de 1 h se visualiza un importante aumento en los niveles de ARNm de LIF, mientras que para c-fos el mayor incremento se observa luego de 30 min de aplicado el estímulo. Estos resultados indican que la presencia de colágeno no es necesaria para la inducción de la expresión de los mencionados genes.

253. (797) LA HORMONA ACTH PROMUEVE LA INTERACCIÓN ENTRE PAXILINA Y PTP-PEST, UNA TIROSINA FOSFATASA REGULADA POR FOSFORILACIÓN POR PKA

Gorostizaga, Alejandra^{1,2}; Acquier, Andrea B^{1,2,3}; Mori Sequeiros García, María M^{1,2}; Méndez, Carlos Fernando^{1,2,3}; Paz, Cristina^{1,2}
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²

Hemos descripto que ACTH incrementa la actividad de proteína tirosina fosfatasa (PTPs) en el citosol de *zona fasciculata* (ZF) de adrenal de rata y que promueve la activación de una PTP de 115 kDa que identificamos como PTP-PEST. Además demostramos que ACTH promueve la fosforilación de PTP-PEST mediada por PKA y su consecuente activación. Se conoce además que en células adrenocorticales de la línea Y1 la estimulación con ACTH u 8Br-AMPC produce un cambio en la morfología celular conocido como *rounding-up*, que está asociado a la desfosforilación en tirosina de paxilina, una proteína de citoesqueleto. Dado que paxilina es sustrato de PTP-PEST en varios sistemas, nuestro objetivo fue analizar la posible interacción entre paxilina y esa fosfatasa en ZF de adrenal de rata y en células Y1. Con este fin se realizó la inmunoprecipitación de paxilina con un anticuerpo específico a partir de las proteínas citosólicas de ZF de adrenales de ratas, controles o tratadas con ACTH durante 15 minutos. Los inmunoprecipitados (IP) se analizaron por SDS-PAGE en geles de actividad de tirosina fosfatasa. En las muestras provenientes de ratas tratadas con ACTH, se detectó una banda de actividad correspondiente a una proteína de 115 kDa que no se detectó en las muestras provenientes de ratas controles. El análisis por Western blot de otra alícuota de los IP mostró niveles similares de paxilina en las muestras de ratas controles y estimuladas. Por microscopía confocal, utilizando anticuerpos anti-paxilina y anti PTP-PEST, se observó que en células Y1 la estimulación promueve la colocalización de estas dos proteínas, además del cambio en la morfología. Concluimos que ACTH promueve la interacción de PTP-PEST con paxilina, lo cual sugiere que esa fosfatasa contribuye –al menos en parte– en la desfosforilación de paxilina. PTP-PEST podría participar en la dinámica mitocondrial inducida por hormonas esteroidogénicas y en la regulación de la síntesis de esteroides.

254. (806) ERK1/2 PARTICIPA EN LA INDUCCIÓN DE NUR77 POR AMPC EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10: MODULACIÓN POR LA FOSFATASA MKP-1

Mori Sequeiros García, María De Las Mercedes¹; Gorostizaga, Alejandra B¹; Acquier, Andrea B^{1,2}; González-Calvar, Silvia³; Méndez, Carlos F^{1,2}; Paz, Cristina¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires² Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET³

MKP-1 es una MAPK fosfatasa que desfosforila a ERK1/2 y a otros miembros de la familia de MAPK. En células de Leydig MA-10, la activación del receptor de LH induce el aumento de MKP-1 por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales. El incremento de MKP-1 reduce el efecto de hCG/AMPC sobre la expresión de StAR y la esteroidogénesis. Nur77 es un factor necesario para la transcripción de StAR. Aquí analizamos el rol de ERK1/2 en la regulación de la expresión de Nur77 en células MA-10 y el impacto de las modificaciones post-traduccionales de MKP-1 en dicha regulación. Mediante RT-PCR en tiempo real determinamos que los niveles del ARNm de Nur77 aumentan 20 veces respecto al control (C) a los 30 min de estimulación con 8Br-AMPC 0,5 mM (E) (C=1,1 ± 0,1; E=19 ± 3,3, p<0,01), efecto que se reduce en presencia de PD98059, un inhibidor de la quinasa río arriba de ERK1/2. Por otro lado, analizamos la vida media de la quimera flag-MKP-1 *wild type* (WT) y de sus formas mutadas en sitios de fosforilación específicos para ERK1/2. Mediante

Western blot y experimentos de *pulse and chase*, determinamos que flag-MKP-1-S296A-S323A tiene una vida media mayor que la quimera WT (>120 min vs. 120 min), mientras que flag-MKP-1-S359A-S364A tiene una vida media menor (45 min). Esto sugiere que la fosforilación en los sitios S359 y S364 promueve la estabilidad de MKP-1, mientras que la fosforilación en S296 y S323 promueve su degradación. En línea con estos resultados la expresión de flag-MKP-1-S296A-S323A redujo el efecto del AMPc sobre Nur77, mientras que la forma inestable flag-MKP-1-S359A-S364A no tuvo efecto. Se concluye que la inducción de Nur77 requiere la participación de ERK1/2 y que la estabilidad de MKP-1 es controlada por fosforilación en múltiples sitios lo cual impacta en la inducción de Nur77 por AMPc.

255. (821) ROL DEL COACTIVADOR RAC3 EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

Panelo, Laura C; Fernández Larrosa, Pablo N; Costas, Mónica A; Rubio, María F
Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM)-CONICET

RAC3 pertenece a la familia p160 de coactivadores de receptores de hormonas esteroides (SRC) y se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de tumor. Esta desregulación en sus niveles favorece la proliferación celular y la transformación celular. En este trabajo estudiamos el rol de RAC3 durante la diferenciación celular a adipocitos. Para ello se utilizó la línea fibroblástica murina L929 y la diferenciación se estimuló con 0,1 µg/ml insulina, 1 µM dexametasona, 0,1 mM Indometacina y 0,5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (DI3). Observamos que durante la diferenciación las células sufren una disminución en la tasa de proliferación y un arresto celular, por lo tanto se evaluó la tasa de división celular luego de 24 hs de incubación con DI3 y se observó una disminución en la tasa proliferativa con respecto a las células sin diferenciar (114%±5 vs 246%±24) y mediante tinción con Oil Red O, que marca específicamente las vesículas lipídicas, se determinó el grado de diferenciación observándose que a las 24 hs el 40% de las células tenían marca positiva para el colorante. Para estudiar si RAC3 tiene algún rol durante la adipogénesis, se generaron clones estables de células L929 que expresan un ARN de interferencia específico para el RAC3 murino (siRNA-RAC3) o el control que tiene los mismos nucleótidos colocados al azar (*scrambled*). Al evaluar la proliferación de los clones con el siRNA se vio una disminución con respecto a las células sin transfectar (141%±7 vs 246%±24), sin observarse diferencias entre las células sin transfectar y las que expresan el *scrambled*. Al tratar las células siRNA-RAC3 con el cóctel no se vieron cambios en la tasa proliferativa (126%±6 vs 141%±7) mientras que la tinción con Oil Red O indicó que a las 24 hs el 80% de las células era positiva para el colorante. Se concluye que la disminución de RAC3 estaría contribuyendo a la diferenciación celular adipocítica.

GENÉTICA 2

256. (466) DOS NUEVOS CASOS DE PORFIRIA VARIEGATA INFANTIL. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS.

Melito, Viviana Alicia^{1,2}; Cerbino, Gabriela Nora¹; Granata, Bárbara Xoana¹; Caballero, Fabiana Alejandra¹; Batlle, Alcira¹; Parera, Victoria Estela¹; Rossetti, María Victoria^{1,2}
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET¹ Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²

La Porfiria Variegata (PV) es una Porfiria mixta producida por fallas en la protoporfirino gen oxidasa (PPOX) y se hereda en forma autosómica dominante. Se manifiesta después de la pubertad con pocos casos descriptos en niños. Los síntomas incluyen ataques neuroabdominales y/o lesiones cutáneas. En Argentina la incidencia es de 1:500.000, con un solo caso heterocigota infantil. El objetivo fue estudiar una niña con manifestación cutánea grave desde los 3 meses (P1) y un niño con manifestación aguda desde el nacimiento y cutánea desde el año (P2) para obtener el diag-

nóstico diferencial, detectar la mutación responsable y realizar el diagnóstico presintomático familiar. Estudios bioquímicos: ácido delta-aminolevulínico (ALA), porfobilinógeno (PBG) y porfirinas urinarias (PTO), porfirinas fecales (PTMF) e Índice de porfirinas plasmáticas (IPP). Estudios genéticos: amplificación y secuenciación automática de regiones promotoras, codificantes y uniones intrón/exón del gen que codifica para la PPOX. En P1 ALA, PBG y PTO fueron normales. PTMF: 247 µg/g seco (VN< 130 µg/g seco) con patrón de excreción típico y el IPP: 7,93 a 627nm (VN<1,30 a 619nm) confirmaron el diagnóstico de PV. Se detectó una nueva mutación C>T en el exón 6 cuya expresión indicó que era la responsable de la patología. En P2 ALA=3,3mg/24h (VN< 4,0 mg/24h); PBG=13,6mg/24h (VN< 2,0 mg/24h), PTO=3504µg/24h (VN< 250 µg/24h) y PTMF: 455 µg/g seco y patrón de excreción de porfirinas característico de PV. Se detectó la mutación c.1043insT. Todos los casos de PV infantil descriptos son doble heterocigotas. P1 y P2 con una sola mutación serían casos heterocigotas con manifestación temprana. Dado que en la PV no se encontró una relación fenotipo/genotipo, el desencadenamiento a tan corta edad se debería a algún agente porfirinogénico como el fenobarbital administrado a P2 por convulsiones o al tratamiento prolongado con antibióticos recibido por la madre de P1 durante el embarazo.

257. (480) CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN UNA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA OVÁRICO MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRIGIDA DE 739 REGIONES PROPENSAS A ALTERACIONES

Sendoya, Juan M.¹; Oliver, Javier¹; Vicente, Nathalie²; Merino, Gabriela³; Chirico, Daniela¹; Rotondaro, Cecilia¹; Fernández, Elmer A.³; Podhajcer, Osvaldo L.¹; Llera, Andrea S.¹
Laboratorio de Terapia Molecular y Celular, Fundación Instituto Leloir¹ Universidad Argentina de la Empresa² Grupo de Minería de Datos en Biociencias, Universidad Católica de Córdoba³

El advenimiento de las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) ha permitido acelerar los tiempos de la investigación en Genómica y disminuir sus costos. Gracias a estos nuevos métodos hoy es posible realizar caracterizaciones exhaustivas de los distintos tipos de cáncer, ilustrando su heterogeneidad y evolución y brindando herramientas objetivas para guiar el tratamiento oncológico. En el presente trabajo se abordó el diseño, optimización y estandarización de un flujo experimental y de análisis de datos para la secuenciación dirigida de 739 regiones genómicas susceptibles a mutaciones (*hotspots*), distribuidas en 46 oncogenes/ genes supresores de tumores asociados a distintos tipos de cáncer. A partir de DNA genómico de SK-OV-3 (línea de adenocarcinoma de ovario) y mediante una PCR multiplexada de rendimiento optimizado en el laboratorio, se construyeron bibliotecas de DNA con los *hotspots* de interés amplificados. Dichas bibliotecas fueron secuenciadas en un secuenciador PGM. Los datos de secuencias obtenidos se sometieron a controles de calidad utilizando herramientas informáticas novedosas desarrolladas en nuestro grupo, y se procedió a la búsqueda de variantes (*variant calling*) con el software Torrent Variant Caller. Las variantes halladas se sometieron a un proceso de anotación exhaustivo para evaluar su significado biológico. Como resultado se obtuvieron 4 variantes de alta confiabilidad (p=0,00001), incluyendo 4 Variaciones de Nucleótido Único (SNVs) en los genes PIK3CA, KDR, FBXW7 y FLT3 que serían relevantes en la biología de SK-OV-3, con posible impacto en la susceptibilidad a tratamientos dirigidos. La realización de esta prueba de concepto nos ha permitido diseñar una metodología de trabajo con procedimientos y herramientas de análisis novedosas, y transferible al análisis de muestras humanas, que permite identificar en forma confiable y reproducible mutaciones con potencial relevancia biológica y clínica.

258. (486) EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL CLUSTER SOX^C EN PACIENTES CON LINFOMA DE CÉLULAS DE MANTO

Roisman, Alejandro¹; Metrebian, Fernanda²; Narbaitz, Marina²; Slavutsky, Irma¹

Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET¹ División Patología, Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHEMA), Academia Nacional de Medicina²

El Linfoma de Células de Manto (LCM) es una neoplasia agresiva con una supervivencia media de 5-7 años. Los marcadores pronósticos disponibles resultan insuficientes para definir formas indolentes o progresivas de la enfermedad. El cluster SOX³C³ se encuentra constituido por los genes *SOX4*, *SOX11* y *SOX12*, involucrados en el desarrollo embrionario. *SOX11* está aberrantemente expresado en LCM existiendo escasa información sobre los restantes miembros del cluster. En este estudio se analizó la expresión de los genes SOX³C³ mediante PCR en tiempo real en 35 pacientes con LCM (15 varones; edad media: 56 años, rango 34-71 años). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Se observó heterogeneidad en los niveles de expresión estableciéndose los puntos de corte mediante la utilización de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic): 0,055, 0,035 y 0,01 para *SOX11*, *SOX12* y *SOX4*, respectivamente. Se observó sobreexpresión de *SOX11* en el 87% de los LCM, de *SOX12* en el 74,3% y de *SOX4* en el 71,5% de los pacientes. La expresión de *SOX11* (1,8±0,62) fue significativamente mayor que la de *SOX4* (0,45±0,09) (p=0,038), observándose una correlación inversa entre ambos (p<0,0001), siendo *SOX4* undetectable en pacientes con altos niveles de *SOX11*. No se hallaron diferencias entre los niveles de transcrito de *SOX11* y *SOX12* (1,5±0,4). Los casos con aumento de expresión de *SOX11* y *SOX12* mostraron porcentajes significativamente mayores de células positivas para el marcador de proliferación celular Ki67 (42% y 39,2%) respecto de aquellos con baja expresión (18% y 17,2%) (p=0,017 y p=0,02, respectivamente); *SOX4* mostró una relación inversa con Ki67 (p=0,05). La asociación de *SOX11* y *SOX12* con Ki67 sustenta la posible relación de ambos genes con progresión de la enfermedad. La expresión diferencial de *SOX4*, único componente del cluster SOX³C³ asociado al desarrollo de linfocitos B, sugiere distintos mecanismos de regulación respecto de *SOX11* y *SOX12* en LCM.

259. (512) EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN MAR DEL PLATA.

Torres, María Celeste¹; D'Amico, Claudia²; Civetta, Elida³; Barbini, Luciana¹

Universidad Nacional de Mar del Plata¹ Centro de Especialidades Médicas Ambulatorias (CEMA)² Hospital Interzonal General de Agudos "Dr. Oscar Allende"³

El virus de la hepatitis B (HBV) causa enfermedades hepáticas agudas y crónicas y se clasifica en diferentes genotipos, asociados a la progresión de la infección. El objetivo de este trabajo fue realizar una descripción de la epidemiología molecular y una caracterización genómica del HBV circulante en Mar del Plata. Para ello, se estudiaron 56 pacientes con infección por HBV. Se estudiaron las secuencias del gen S y la región entre el gen X, promotor basal del core (BCP) y precore (PC). Se determinó la presencia de mutaciones de relevancia clínica. Del análisis filogenético del gen S, se obtuvo la siguiente prevalencia de genotipos (gts): 80% F1b, 9% A2, 7% D3 y 2% D1. Una muestra resultó una recombinante (F4/D2). Además, se encontraron mutaciones asociadas a la historia natural de la infección. Un 20% gt F1b, un 2% A2, un 2% D1 y un 2% D3, presentaron las sustituciones A1762T y G1764A en el BCP, asociadas a la disminución en la expresión de HBeAg. Una muestra gt D3 presentó la sustitución G1896A en el PC, confirmando el fenotipo HBeAg negativo. Un 13% (2 F1b, 3 D3 y 1 A2) presentó mutaciones en el inmunodeterminante "a" del HBeAg, asociado a los anticuerpos neutralizantes y la protección por la vacunación. En el dominio RT de la polimerasa viral se encuentran las mutaciones que confieren resistencia a los antivirales y las mismas se hallaron en un 52% de las muestras estudiadas (16 F1b, 4 A2, 3 D3 y 1 D1). En conclusión, la alta prevalencia de gt F1b resulta característica de Mar del Plata. Este gt autóctono de Latinoamérica, sería responsable de los nuevos casos de hepatitis aguda por HBV y estaría desplazando a los gt

del "viejo mundo" (A y D), presentes desde antes en la ciudad. Los virus circulantes en la ciudad también presentan mutaciones de relevancia clínica a ser consideradas. Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán optimizar las estrategias de diagnóstico, prevención y tratamiento, acordes a las variantes virales de circulación local.

260. (589) IMPACTO FUNCIONAL EN EL SPLICING DE LA NUEVA MUTACIÓN g.IVS17-1G>C EN EL GEN DE DUOX2 HUMANA RESPONSABLE DE DEFECTO DE ORGANIFICACIÓN DE YODO.

Belforte, Fiorella S.^{1,2}; Osorio-Larroche, Carolina^{1,2}; Citterio, Cintia E.^{1,2}; Miras, Mirta³; Targovnik, Héctor M.^{1,2}; Rivolta, Carina M.^{1,2}

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM) CONICET-UBA, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² Servicio de Endocrinología, Hospital de Niños Santísima Trinidad, Córdoba.³

Los defectos de organificación de yodo (IOD) representan el 10% de los casos de hipotiroidismo congénito de alta prevalencia (1/2000), siendo los principales genes afectados el de Tiroperoxidasa (TPO) y Dual Oxidasa2 (DUOX2). En el presente trabajo se propuso evaluar mutaciones en regiones consenso de *splicing* en el gen de DUOX2. Mediante rastreo por PCR-SSCP y posterior secuenciación del gen en una población de 40 pacientes con IOD, se identificó un compuesto heterocigota para dos nuevas mutaciones: g.IVS17-1g>c(intrón 17) y p.A1088fs1100(exón 24). Se evaluó bioinformáticamente el impacto de la sustitución puntual en la región consenso de *splicing* mediante el programa ESEfinder y se caracterizó funcionalmente mediante ensayo de minigenes. Para ello se amplificó el exón 18 de DUOX2 y sus regiones intrónicas flanqueantes a partir de ADN genómico del paciente, clonando el producto en pGEMT de manera de separar los alelos salvaje (WT) y mutante. Dichos alelos fueron identificados por secuenciación y sub-clonados en el vector pSPL3. Células Hela fueron transfectadas, evaluando por RT-PCR los fragmentos obtenidos a partir del pSPL3 recombinante WT y del mutante. La secuenciación de dichos fragmentos evidenció la pérdida de reconocimiento del sitio consenso de *splicing* en presencia de la mutación, la activación de un sitio crítico 3' aceptor en el intrón 17 que incorpora 14 bases intrónicas a la región codificante del exón 18 produciéndose así un corrimiento en el marco de lectura con un codón de terminación prematuro en el codón 807 de la proteína. Asimismo se observaron fenómenos de "exon skipping" y activación de sitio crítico 5' dador en el exón 18. En conclusión se caracterizó un nuevo compuesto heterocigota responsable de IOD, identificando por primera vez sitios críticos de *splicing* en el gen de DUOX2. El empleo de técnicas de biología molecular constituye una valiosa herramienta para la comprensión de la fisiopatología molecular de este tipo de defectos tiroideos.

261. (626) ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES TGFB1 E IL6 EN PACIENTES CON APLASIA MEDULAR ADQUIRIDA

Bestach, Yesica S.¹; Palau Nagore, Virginia¹; Cocca, Andrea²; Riccheri, Cecilia³; González, Jaqueline⁴; Bolesina, Moira⁵; Sieza, Yamila⁶; Rivas, Mara⁷; Larripa, Irene¹; Belli, Carolina¹

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹ Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez², Hospital Nacional "Prof. A. Posadas"³ Hospital General de Agudos "Carlos G. Durand"⁴ Hospital "J.M. Ramos Mejía"⁵ Hospital Interzonal General de Agudos "Gral. San Martín", La Plata⁶ Hospital Universitario Austral⁷

La Aplasia Medular adquirida (AA) se caracteriza por presentar hipocelularidad medular y citopenias periféricas. En esta patología se evidencia una disregulación inmune involucrando: un aumento de las respuestas pro-inflamatorias Th helper 1 (Th1) y Th17, y una disminución de células T regulatorias (Treg). Previamente hemos

descripto que polimorfismos en los genes *TNF* e *IFNG*, citoquinas típicas de la respuesta Th1, se asocian con características clínicas en la AA. TGF- β 1 puede inducir tanto la diferenciación de células Treg como de células Th17, en este último caso, en presencia de IL-6. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar polimorfismos involucrados en la expresión diferencial de los genes *TGFB1* e *IL6*, los cuales podrían estar relacionados con susceptibilidad hacia una respuesta inmune alterada en AA. Se analizaron, mediante PCR-alelo específica, los polimorfismos +869 T/C del gen *TGFB1* en 46 pacientes con AA y -174 G/C del gen *IL6* en 39 de ellos. Como población control se estudiaron 106 individuos sanos. Las frecuencias genotípicas halladas para los polimorfismos estudiados no mostraron diferencias significativas al comparar pacientes con AA vs controles (*TGFB1*: $p=0,544$, e *IL6*: $p=0,298$). Si bien, hasta el momento, no se observó asociación con parámetros clínicos con respecto al polimorfismo de IL-6, la presencia del genotipo relacionado con baja expresión de TGF- β 1 (C/C) se asoció con menores niveles de hemoglobina al diagnóstico (6,2 vs 8,1 g/dL; $p=0,020$). Nuestros resultados sugieren que los polimorfismos estudiados en los genes *TGFB1* e *IL6* no estarían relacionados con susceptibilidad a AA en nuestra población. Sin embargo, los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis en la cual la presencia de variantes polimórficas que influyen en la regulación de la expresión de citoquinas podría asociarse con la severidad de la enfermedad.

262. (639) ASOCIACIÓN DE LONGITUD TELOMÉRICA CON ALTERACIONES CITOGENÉTICAS Y CITOMOLECULARES EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Dos Santos, Patricia Carolina; Panero, Julieta; Palau Nagore, Virginia; Slavutsky, Irma
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas que protegen los extremos de los cromosomas eucarióticos, manteniendo su estabilidad e integridad. El acortamiento telomérico ha sido asociado al desarrollo de diferentes neoplasias. En este trabajo se efectuó el análisis de la longitud telomérica (LT) en 94 pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) (37 mujeres; edad media: 68 años, rango: 36-89 años; estadios RAI: 0: 28%; I-II: 56%; III-IV: 16%) y su correlación con las características citogenéticas. Se efectuó extracción de ADN de sangre periférica de los pacientes y de 64 controles normales apareados por edad. Se analizó la LT absoluta mediante PCR en tiempo real y se obtuvo el valor de LT interpolada (kb). Se efectuó estudio citogenético con bandeado G y FISH con sondas específicas. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. La distribución de los pacientes acorde a los grupos de riesgo citogenético fue: 23 casos con del13q14 como única alteración (24,5%), 10 con trisomía 12 (10,6%), 20 con del11q22/del17p13 (21,3%), 16 sin alteraciones (SA) (17%), y 25 con anomalías estructurales (AE) (26,6%). Se observó acortamiento telomérico significativo en los pacientes (6,88 \pm 0,57kb) respecto de controles (7,17 \pm 0,49kb) ($p=0,0036$). Los casos con del11q/17p mostraron la menor LT (6,53 \pm 0,56kb) presentando diferencias significativas respecto de aquellos con del13q14 (7,06 \pm 0,48kb) ($p=0,001$), SA (7,12 \pm 0,67kb) ($p=0,006$) y AE (6,95 \pm 0,56kb) ($p=0,007$). La distribución del tamaño telomérico en los diferentes grupos mostró asociación de telómeros cortos con el grupo de alto riesgo (del11q/17p) con diferencias significativas respecto de los casos con del13q14 ($p=0,012$), asociada a buen pronóstico. Nuestros resultados sustentan la relación de telómeros cortos disfuncionales con las anomalías citogenéticas de pronóstico adverso en LLC, asociadas a inestabilidad genómica, siendo su estudio de importancia en la caracterización biológica de la patología.

263. (657) LONGITUD TELOMÉRICA Y PROTEÍNAS REGULADORAS NEGATIVAS EN LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO

Panero, Julieta¹; Roisman, Alejandro¹; Santana-Lemos, Bárbara²; Calado, Rodrigo²; Slavutsky, Irma¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹ Department of Internal

Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil²

El complejo protector de los telómeros se encuentra conformado por seis proteínas (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1 y RAP1) que interactúan entre sí para proteger los extremos cromosómicos de ser reconocidos como ADN dañado y evitar la elongación de los mismos por parte de la telomerasa. En este trabajo se evaluaron los perfiles de expresión de los componentes del complejo protector y la expresión de telomerasa (*hTERT*) en 30 pacientes con linfoma de células del manto (LCM) (8 mujeres; edad media: 64 años; rango: 27-88 años), cuatro de ellos de morfología blastoide. La caracterización de LCM se completó con el análisis del factor de transcripción SOX11. Se efectuó extracción de ADN y ARN de pacientes y controles. Se evaluó expresión génica y longitud telomérica (LT) mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. El análisis de SOX11 mostró una media de expresión de 4,8 \pm 1,2; con mayores niveles de transcripto en los casos con morfología blastoide (6,65 \pm 5,2), compatible con la agresividad de este subtipo. La media de LT de los pacientes (7,43 \pm 0,27kb) fue significativamente menor que la de los controles (8,34 \pm 0,18kb) ($p=0,024$). Las medias de expresión de los genes teloméricos fueron: TRF1 (0,56 \pm 0,09), TRF2 (0,31 \pm 0,03), POT1 (0,47 \pm 0,05), TIN2 (3,66 \pm 0,4), TPP1 (1,25 \pm 0,17), RPA1 (1,03 \pm 0,15), DKC1 (0,13 \pm 0,01), hTERT (1,80 \pm 0,49). Los perfiles de expresión de genes del complejo protector indicaron una tendencia a mayores niveles de transcripto de TRF2 (0,35 \pm 0,10) y hTERT (2,15 \pm 0,79) en pacientes con telómeros más cortos que la media de LT, respecto de los casos con telómeros más largos (TRF2: 0,24 \pm 0,04 y hTERT: 1,02 \pm 0,33). No se observó asociación entre la expresión de SOX11, hTERT y LT. A nuestro conocimiento, estos datos constituyen la primera evaluación de los genes del complejo protector de los telómeros en LCM, mostrando una modificación global de los mismos que contribuiría al desarrollo neoplásico.

264. (682) TDP1 PARTICIPA EN LA REPARACIÓN DE LAS LESIONES GENÓMICAS GENERADAS POR ETOPÓSIDO EN CÉLULAS HUMANAS

Verón, Gustavo Luis; Palmitelli, Micaela; Cieza, Ignacio; González-Cid, Marcela; De Campos Nebel, Marcelo
Laboratorio de Mutagénesis, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina

La ADN Topoisomerasa II (Top2), enzima esencial para el metabolismo del ADN, es envenenada por agentes de amplio uso clínico como Etopósido (ETO). ETO estabiliza los complejos de clivaje Top2-ADN llevando a la formación de rupturas de doble cadena (DSB) persistentes en el ADN, que pueden ser reparadas por reunión de extremos no homólogos dependiente (C-NHEJ) o no (A-NHEJ) de DNA-PKcs. La enzima tirosil-ADN-fosfodiesterasa 1 (TDP1) remueve grupos fosfotirosilos de extremos 3' y 5' del ADN, e interacciona con factores de respuesta al daño genómico. Nuestro objetivo fue determinar si TDP1 afecta la señalización al daño por DSB inducidas por ETO y la reparación de las mismas. Se generaron líneas celulares humanas silenciadas en TDP1 (HeLa TDP1kd) y controles no silenciadas (HeLa NS) mediante secuencias shRNAmir. La señalización al daño se analizó por citometría de flujo y western blot. La eficiencia de reparación se estudió por la inducción de aberraciones cromosómicas en metafases y la formación de micronúcleos (MN) en células interfásicas. Los resultados mostraron que en respuesta a ETO (10 μ g/ml, 2hs), los niveles de expresión de pS1981ATM, pS2056DNA-PKcs, pS428ATR, γ H2AX y pT68CHK2 no difieren entre ambas líneas celulares. Sin embargo, la activación de pS296CHK1 está aumentada en la línea TDP1kd ($p<0,05$). Además, ETO incrementa las rupturas cromosómicas en TDP1kd ($p<0,05$) en comparación a NS. Estos datos se correlacionan con un aumento de células MN presentando señales γ H2AX ($p<0,05$). El pretratamiento con NU7026 10 μ M (inhibidor de DNA-PKcs) combinado al tratamiento con ETO en la línea TDP1kd, muestra niveles incrementados de rupturas cromosómicas y figuras de intercambio respecto al tratamiento simple con ETO, o al combinado en NS ($p<0,05$).

Nuestros resultados indican que la ausencia de TDP1 afecta la señalización al daño inducido por ETO, tras la aparición de γ H2AX, y que altera la eficiencia de reparación de las DSB por participar de la vía C-NHEJ y A-NHEJ.

265. (710) PRIMERA DESCRIPCIÓN DE VARIANTES EN LOS GENES RLDL Y APOB PRESENTES EN UNA MUESTRA DE PACIENTES DE ARGENTINA CON HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.

Bañares, Virginia^{1,5}; Araujo, María Beatriz^{2,5}; Gerardo Elikir⁶; Pucci, Martín³; Corral, Pablo^{4,5}; Schreier, Laura^{3,5}
Centro Nacional de Genética Médica (CENAGEM), ANLIS' Servicio de Nutrición. Hospital de Pediatría Garrahan² Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³ Facultad de Medicina, Universidad FASTA, Mar del Plata.⁴ -Argentina- Red Iberoamericana de Hipercolesterolemia Familiar.⁵

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) se origina por mutaciones en el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (RLDL) y en el sitio de unión al receptor por parte del ligando, la apoproteína B (APOB) principalmente. Funcionalmente, el clearance de las LDL en plasma se ve disminuido, aumentan los niveles de colesterol de LDL y se favorece el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular prematura. En el gen RLDL hay unas 1000 variantes patogénicas descritas, mientras que en APOB hay mutaciones más comunes. Objetivo: estudiar las mutaciones R3527Q y H3543Y en el gen APOB y describir variantes genéticas en el gen LDLR en un grupo de pacientes argentinos con diagnóstico clínico de HF. Muestra: pacientes de ambos géneros con HF score ≥ 6 (OMS, MED-PED Holanda), 20/26 casos índices. Métodos: secuenciación directa de los exones del gen LDLR. APOB, PCR-RFLP de los loci H3543Y y R3527Q, con introducción de sitio de corte para Msp I en este último. Análisis bioinformático de las variantes con SIFT y Polyphen2. Resultados: El 70% de los casos índices fueron mujeres, todos recibían medicación, el valor medio de col-LDL sin medicación en adultos con clínica heterocigota fue 308 ± 57 mg/dl y 330 ± 72 en niños, en homocigotas fue 670 en adulto y 555 ± 49 en niños. En 12/20 casos (60%) se identificaron variantes dañinas, 11/12 (91,7%) en el gen LDLR y 1 (8,3%) en APOB, la R3527Q. Se observaron 17 variantes genéticas en el gen LDLR: 7 corresponden a snp comunes, 2 variantes raras sinónimas descritas y 8 variantes asociadas con la HF. Entre estas últimas, 3 no descritas en otras poblaciones, con predicción bioinformática dañina. En 5/20 casos se observó la variante c.2043C>A, *libanesa*. De los 4 casos índice con fenotipo severo (homocigota), 1 resultó homocigota, 1 heterocigota compuesto, 1 con una sola variante identificada en las zonas analizadas. Conclusiones, la variante libanesa podría ser un importante contribuyente de la HF en la población Argentina.

266. (719) IDENTIFICACIÓN DE DELECCIONES ATÍPICAS Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA EN NIÑOS CON SÍNDROME DE PRADER-WILLI (SPW)

Foncuberta, María Eugenia; Torrado, María Del Valle; Aráoz, Hilda Verónica; Baialardo, Edgardo; Obregon, María Gabriela; Chertkoff, Lilien
Hospital de Pediatría Garrahan

El SPW es una enfermedad multisistémica causada por la ausencia de expresión de genes paternos de la región 15q11.2-q13, originada por tres mecanismos principales: delección *de novo* en el cromosoma de origen paterno (70%), disomía uniparental materna (25%) y defectos de impronta (2%). Las delecciones se subdividen en dos tipos, 1 y 2, según el punto de ruptura involucrado (BP1-BP3 y BP2-BP3). Un grupo minoritario de pacientes presenta delecciones atípicas. Objetivos: describir la frecuencia de subtipos de delección en niños con SPW, compararlos con otras poblaciones y evaluar diferencias fenotípicas en los niños con delecciones atípicas. Metodología: 122 pacientes con SPW por delección fueron estudiados por MLPA (kits MS-M028 y P211). En los niños con delecciones atípicas se realizó una revisión retrospectiva de las historias clínicas que incluyó el registro de:

características prenatales y neonatales, adquisición de pautas madurativas, evaluación cognitiva y conducta adaptativa y otros hallazgos clínicos de relevancia. Resultados: de los 122 pacientes, 53 (43,4%) presentaron delección tipo 1, 61 (50%) delección tipo 2 y 8 (6,5%) delecciones atípicas, 2 de ellas delecciones del centro de impronta (CI). La frecuencia de los subtipos de delección halladas en este estudio no difiere de las reportadas en otras cohortes de pacientes con SPW ($p > 0,05$). El mayor porcentaje de delecciones atípicas (7/8) presentó un tamaño menor a las delecciones tipo 1 y las características clínicas de los pacientes no difirieron, hasta el momento, del fenotipo clásico de esta enfermedad. La delección atípica con punto de ruptura distal a BP3 presentó una evolución más grave asociada a la falta de adquisición de algunas pautas madurativas y severos trastornos del lenguaje. Conclusión: el reconocimiento de delecciones del CI permitió realizar un asesoramiento genético más adecuado y la caracterización de delecciones atípicas podría ser de utilidad para dilucidar la función de alguno de los genes involucrados en el SPW.

267. (731) EL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN SMN2 Y LA DELECCIÓN DEL GEN NAIP COMO MODIFICADORES DEL FENOTIPO EN PACIENTES CON ATROFIA MUSCULAR ESPINAL

Gravina, Luis Pablo¹; Medrano, María Sofía¹; Monges, Soledad¹; Moresco, Angélica¹; Mozzoni, Julieta¹; Aráoz, Hilda Verónica¹; Tizzano, Eduardo²; Chertkoff, Lilien¹
Hospital de Pediatría Garrahan¹ Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona²

Introducción: La Atrofia Muscular Espinal (AME) es una enfermedad neuromuscular de herencia autosómica recesiva que se clasifica en tres subtipos pediátricos (AME I, II y III). Independientemente del fenotipo clínico, el 95% de los pacientes presenta delección homocigota del gen *SMN1* (*SMNtel*). La gran variabilidad fenotípica observada en los pacientes con AME llevó a la búsqueda de genes modificadores, como el gen *SMN2* (*SMNcen*) y el gen *NAIP*. Objetivo: Determinar la influencia del número de copias del gen *SMN2* y de la delección del gen *NAIP* en el fenotipo de pacientes con AME. Pacientes y Métodos: Se estudiaron 144 pacientes AME con delección homocigota del gen *SMN1* (56 AME tipo I, 58 tipo II y 30 tipo III). En cada paciente se determinó el número de copias de los genes *SMN1*, *SMN2* y *NAIP* mediante MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*). Resultados: El número de copias del gen *SMN2* varió según el subtipo clínico; los AME tipo I presentaron sólo 2 copias, mientras que los tipos II y III mostraron, en su mayoría, entre 3 y 4 copias de *SMN2*. Sólo en el grupo AME tipo III se observaron pacientes con 4 copias de *SMN2*. Con respecto al gen *NAIP*, su ausencia fue más frecuente en los AME tipo I (73,2%), mientras que en los tipos II y III el gen estuvo presente en más del 87% de los pacientes. Conclusiones: Se encontró una correlación significativa entre el número de copias del gen *SMN2* y el fenotipo clínico de AME, siendo éste más leve cuanto mayor es el número de copias de *SMN2*. Se observó una fuerte asociación entre ausencia del gen *NAIP* y el fenotipo más severo de AME. La presencia de un diferente número de copias de *SMN2* para un mismo fenotipo, y que el gen *NAIP* estuvo presente en fenotipos severos, sugieren la existencia de otros factores modificadores que aún se desconocen.

268. (733) ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO TP53 215C>G CON INESTABILIDAD GENÓMICA EN ENFERMEDAD CELÍACA

Fundia, Ariela¹; Weich, Natalia¹; La Motta, Graciela²; Crivelli, Adriana²; Larripa, Irene¹; Slavutsky, Irma¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹ Hospital Interzonal de Agudos "General San Martín", La Plata²

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía autoinmune inflamatoria con predisposición a desarrollar cáncer, el cual se asocia a la adquisición de inestabilidad genómica (IG). Los polimorfismos genéticos pueden modificar la actividad proteica generando la acumulación de lesiones en el ADN, IG y cáncer.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los polimorfismos en genes implicados en el transporte de carcinógenos (*ABCB1/MDR1*) y el control del ciclo celular (*TP53*) en EC a fin de establecer su relación con la IG determinada previamente mediante el estudio de longitud telomérica y microsatélites. Se estudiaron 20 pacientes (14 mujeres/6 varones; edad media: 35,2 años, rango: 21-66 años) y 69 controles sanos con una distribución de edad y sexo comparable a los pacientes. Los polimorfismos *TP53* c.215C>G y *ABCB1* c.3435C>T se estudiaron por PCR alelo específica y PCR-RFLP, respectivamente. Las frecuencias alélicas y genotípicas de *ABCB1* y *TP53* no mostraron diferencias significativas entre pacientes y controles. La distribución de los genotipos de ambos genes en función del valor medio de longitud telomérica de estos pacientes no mostró diferencias significativas entre los individuos portadores de genotipos *wild type* y variantes. La comparación con el patrón de IG definido por microsatélites demostró que los diferentes genotipos de *ABCB1* se asocian con el fenotipo estable. Al evaluar *TP53* se estableció que la mayoría de los pacientes (85%) con genotipo *wild type* CC presentó fenotipo estable mientras que los portadores de genotipos variantes CG/GG (67%) exhibieron IG ($p=0,045$). Estos resultados indican que el gen *ABCB1* no está involucrado en el desarrollo de IG en esta patología. Por otro lado, la variación polimórfica en *TP53* mostró una asociación significativa con el fenotipo inestable, sugiriendo que este gen podría ser un marcador tumoral involucrado en la susceptibilidad a inestabilidad genómica y desarrollo de cáncer en EC.

269. (758) CORRELACIÓN CLÍNICO ETIOLÓGICA EN NIÑOS CON SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Foncuberta, María Eugenia; Aráoz, Hilda Verónica; Caino, Silvia; Abraldes, Karina; Chertkoff, Lilien; Torrado, María Del Valle
Hospital de Pediatría Garrahan

Introducción: El Síndrome de Prader-Willi (SPW) es una enfermedad multisistémica compleja causada por la pérdida de expresión de genes de origen paterno ubicados en la región crítica 15q11q13. La ausencia de expresión de estos genes puede producirse por: deleción en el cromosoma 15 paterno (deleciones tipo 1 y tipo 2), disomía uniparental materna (DUPm) y defectos de impronta. Hasta el momento existe poca información acerca de las diferencias fenotípicas entre los pacientes con deleción 1 y 2. Objetivo: evaluar diferencias fenotípicas entre los distintos grupos etiológicos. Metodología: 164 pacientes con SPW (79/85 F/M) fueron diagnosticados por test de metilación (Southern Blot). Los subtipos etiológicos fueron establecidos mediante la técnica MLPA y análisis de microsatélites. Para el estudio de correlación genotipo-fenotipo se evaluaron en forma retrospectiva las variables presentes en los criterios de Holm, medidas antropométricas (peso, talla, talla sentada, perímetro cefálico e índice de masa corporal) y presencia de convulsiones. Se evaluó cociente intelectual y conducta adaptativa según pruebas de Wechsler y Vineland. Test estadísticos: ANOVA, χ^2 , Fisher, Kruskal-Wallis. Resultados: la hipopigmentación estuvo presente con mayor frecuencia en el grupo deleciónado ($p<0,0001$); no se observaron diferencias entre los subtipos de deleción. La presencia de convulsiones fue más frecuente en los pacientes con deleción tipo 2 ($p=0,02$). La media del perímetro cefálico expresado en z score fue menor en el grupo con deleción tipo 1 ($p=0,002$) y se observó un mayor IMC en niños mayores de tres años con deleción tipo 2 ($p=0,03$). Conclusiones: este estudio provee nuevos datos acerca de las diferencias fenotípicas entre los diferentes subtipos etiológicos en niños con SPW. El seguimiento continuo de estos pacientes y la evaluación de nuevas variables clínicas permitirán reconocer si existen otras diferencias fenotípicas entre estos subtipos etiológicos.

270. (774) DESCRIPCIÓN DE UNA MUTACIÓN DE NOVO COMO CAUSA DE DIABETES TIPO MODY 2.

López, Ariel P¹; De Dios, Alejandro¹; Sidera, Rocío¹; Serale, Camila¹; Pérez, María S²; Chiesa, Ignacio²; Frechtel, Gustavo¹
¹División Genética, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires¹ Medicina Genómica, Laboratorio MANLAB²

La diabetes tipo MODY2 es una forma monogénica de diabetes con herencia autosómica dominante que se produce por mutaciones en el gen de la enzima glucoquinasa que determinan una disminución de la actividad de la enzima con el consiguiente desarrollo de la patología. Se han descrito más de 600 mutaciones en ese gen, sin embargo un escaso número de ellas son de novo. El objetivo fue analizar la presencia de mutaciones en el gen GCK en una paciente con características clínicas de MODY, pero sin antecedentes familiares de la patología. Dentro de un estudio más amplio de 20 pacientes con clínica de MODY2 se estudió a una paciente con una presentación clínica compatible con MODY y a sus familiares de primer grado, los que no presentaban antecedentes clínicos de la enfermedad. Se purificó ADN de muestras de sangre por el sistema MagNA Pure seguido de PCR con primers específicos y secuenciación de las regiones codificantes del gen GCK. Las secuencias fueron analizadas utilizando ChromasPro y BLAST. La paternidad fue analizada con el Kit AmpFLSTR Identifier. En 10 de los 20 pacientes estudiados con clínica compatible con MODY, se encontraron mutaciones. Entre aquellos se encontraba la paciente en la que se encontró la mutación c.895G>C (G299R), la cual no fue detectada ni en los padres ni en su hermana. Los resultados obtenidos por el método Identifier permitieron descartar un caso de falsa paternidad y maternidad. Estos resultados muestran que la mutación fue generada de novo a nivel gametogénico. Este caso demuestra la importancia de realizar el análisis genético en pacientes con signos clínicos de diabetes MODY pero sin antecedentes familiares de la patología, a pesar que según los algoritmos de referencia, diferentes entidades recomiendan su realización sólo en pacientes con antecedentes familiares de patología autosómica dominante. Según nuestros datos es probable que la presencia de mutaciones de novo sea más frecuente de lo reportado previamente.

271. (818) INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN MBL2 SOBRE EL PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD EN NIÑOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

Gravina, Luis Pablo; Crespo, Carolina; Giugno, Hilda; Mangano, Andrea; Sen, Luisa; Castaños, Claudio; Chertkoff, Lilien
Hospital de Pediatría Garrahan

Introducción: En Fibrosis Quística (FQ), el curso de la enfermedad pulmonar es muy variable, aún entre pacientes con las mismas mutaciones en el gen *CFTR*, lo que sugiere la influencia de otros factores sobre el pronóstico de la enfermedad. La lectina de unión a manosa (MBL), una proteína del sistema inmune innato que se acumula en el pulmón durante la inflamación aguda, ha sido propuesta como un factor modulador en FQ, ya que las infecciones pulmonares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en esta enfermedad. Objetivo: Investigar la influencia de variantes del gen *MBL2* sobre la severidad, la edad de adquisición de *Pseudomonas aeruginosa* y la sobrevida en pacientes fibroquísticos. Pacientes y Métodos: Se estudiaron 106 pacientes fibroquísticos con dos mutaciones severas en el gen *CFTR*. Las variantes estructurales y del promotor del gen *MBL2* se analizaron mediante PCR-RFLP. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo al genotipo en MBL suficientes (MBL-S) y MBL insuficientes (MBL-I). El fenotipo clínico fue definido como leve, moderado y severo de acuerdo al score de Shwachman. Se recopilaron mediciones de FEV₁, y se registraron edades al primer cultivo positivo de *P. aeruginosa* y de fallecimiento. Resultados: Los pacientes MBL-I tuvieron un riesgo 3,5 veces mayor que los MBL-S de presentar un fenotipo severo (IC95%: 1,2-10,3, $p=0,03$). En el grupo MBL-I se observó una edad de colonización con *P. aeruginosa* más temprana que en el MBL-S ($p=0,03$). No se encontraron diferencias significativas en la función pulmonar (FEV₁) ni en la sobrevida entre ambos grupos. Conclusiones: En este grupo de pacientes, la insuficiencia de MBL estuvo asociada con un mal pronóstico. Se observó la influencia de los genotipos *MBL2* en la severidad de la enfermedad de una manera similar a la descrita en países desarrollados de América del Norte y Europa. Estos resultados, resaltan el rol del gen *MBL2* como un factor modulador en Fibrosis Quística, el cual determina el curso de la enfermedad independientemente de las condiciones socioeconómicas.

NEUROCIENCIAS 2

272. (227) EFECTOS DIFERENCIALES ENTRE LA PROGESTERONA Y UN PROGESTÍNICO SINTÉTICO SOBRE LA NEUROINFLAMACIÓN EN EL RATÓN WOBBLER, MODELO DE ENFERMEDAD DE MOTONEURONA

Gargiulo-Monachelli, Gisella M^{1,2}; Meyer, María¹; Garay, Laura^{1,4}; Lima, Analía¹; Roig, Paulina¹; De Nicola, Alejandro Federico^{1,4}; González Deniselle, María Claudia^{1,3}
Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Servicio de Neurología, Hospital General de Agudos Dr. J.A. Fernández² Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³ Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁴

Progesterona (PROG) y el progestínico sintético noretindrona (NOR) atenuaron la patología neuronal e incrementaron la oligodendroglia CC1+ en la médula cervical (MC) del ratón Wobbler (WR). Sin embargo, NOR redujo marcadamente la astrogliosis GFAP+ y empeoró la atrofia muscular en WR a diferencia de PROG que mejoró la atrofia muscular y disminuyó levemente GFAP. Objetivo: Estudiar efectos de PROG y NOR sobre mediadores inflamatorios en MC de WR. Grupos experimentales: control (CTL), WR, WR+PROG (pellet de 20 mg s.c.) y WR+NOR (pellet 1mg s.c.) x 18 días. Se cuantificaron número y morfología de células Iba1+área x inmunofluorescencia. Se determinó el ARNm para CD11b, marcador de microglía, el factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), el receptor tipo Toll TLR4, NFkB y su inhibidor IKB. Análisis estadístico: Chi-cuadrado o ANOVA/ Newman-Keuls. Demostramos microgliosis Iba1+ en WR vs CTL que disminuyó en WR+PROG y WR+NOR (media ± SEM células+/mm²: CTL: 37,34±5,5, p<0,001; WR+PROG: 57,67±4,9, p<0,001; WR+NOR: 62,22±5,9, p<0,01 vs WR: 111,23±16,7). El 100% de células Iba1+ en WR mostró ≥2 prolongaciones, los CTL ≥2 prolongaciones: 87,5% y <2: 12,5%; WR+PROG: distribución similar a CTL, mientras que WR+NOR: 75% con <2 prolongaciones (p<0,0001). El ARNm para CD11b, TNFalfa, TLR4 y NFkB aumentó en WR vs CTL (p<0,05), mientras para Ikb disminuyó (p<0,001 vs CTL). PROG redujo el ARNm para CD11b, TLR4 y NFkB en WR (p<0,05, p<0,01, p<0,05 vs WR) y aumentó Ikb (p<0,001). NOR sólo moduló NFkB e Ikb en menor grado que PROG (p<0,05 vs WR). La reducción en el número de prolongaciones microgliales con NOR podría asociarse a un fenotipo microglial reactivo o fagocítico, ya que no tuvo efecto sobre algunos de los mediadores inflamatorios estudiados. Los efectos neuroprotectores diferenciales de PROG en WR podrían depender, en parte, a su metabolización a derivados reducidos, a los cuales no se metaboliza NOR (dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona).

273. (231) MODULACIÓN DEL PROCESO APOPTÓTICO GLANDULAR POR ANTICUERPOS ANTI-M3 SÉRICOS DE PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN

Reina, Silvia; Enri Borda
Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires

El Síndrome de Sjögren (SS) es un trastorno autoinmunitario crónico que se caracteriza por una infiltración linfoplasmocitaria de las glándulas exócrinas con destrucción epitelial, provocando un síndrome seco definido por sequedad oral (xerostomía) y ocular (xeroftalmía). Existen dos formas clínico-patológicas de SS: Síndrome de Sjögren primario (SSp) y una forma asociada (SSa) a otras enfermedades del tejido conectivo. En el suero de los pacientes con SSp está presente un autoanticuerpo anti-receptor mAChR M₃ (media ± ETM: SSp: 0,751±0,01; control: 0,125±0,01). La activación de la cascada de la vía intrínseca de la apoptosis, con la participación de la caspasa-9 (densidad óptica (DO)/mg prot.: basal: 0,14±0,01; SSp: 0,27±0,02; pilocarpina: 0,023±0,02; n=6 en cada caso) y caspasa-3 (DO/mg prot.: basal: 0,4±0,01; SSp: 1,2±0,11; pilocarpina: 0,9±0,01; n=6 en cada caso) en la glándula salival aislada de la rata por los autoanticuerpos anti-receptor mAChR M₃ y la pilocarpina con incremento del anti-

intracelular por aumento del flujo del mismo (verapamilo 1x10⁻⁵ M+SSp: 0,15±0,01, n=5), serían los efectores responsables de este fenómeno-apoptótico-receptor dependiente (J104129+SSp: 0,19±0,01, n=5). Por otro lado, el autoanticuerpo anti-receptor mAChR M₃ y la pilocarpina son capaces de provocar una inhibición de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD: basal: 2,5 Uml±0,02, SSp: 1,2 Uml±0,01, n=7) y de la catalasa (CAT: basal: 810 μM±50, SSp: 600 μM±45, n=7), mostrando así la presencia de productos reactivos del oxígeno en la acción del autoanticuerpo y de pilocarpina en la glándula submandibular de la rata por activación del mAChR M₃ ya que el J104129 (1x10⁻⁶ M inhibidor específico M₃) bloquea dicho acción. El péptido sintético M₃ (1x10⁻⁵ M) tiene la capacidad de absorber el "efecto muscarínico simul del autoanticuerpo anti-receptor mAChR M₃" dando así una muestra de especificidad farmacológica. Con estos hallazgos demostramos un mecanismo plausible donde los receptores colinérgicos del subtipo M₃ presentes en las glándulas salivales de pacientes con SS, dispararían el proceso apoptótico glandular, provocando una disfuncionalidad parasimpática glandular en los pacientes con SS.

274. (235) GHRELINA ACTIVA LAS NEURONAS CRF DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR HIPOTALÁMICO A TRAVÉS DE UN CIRCUITO LOCAL QUE INVOLUCRARÍA LA INHIBICIÓN DEL TONO GABAÉRGICO LOCAL.

Cabral, Agustina¹; Castrogiovanni, Daniel¹; Frassa, María Victoria¹; Reynaldo, Mirta¹; Portiansky, Enrique²; Perelló, Mario¹
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular¹ Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata²

La ghrelina es una hormona producida por el estomago implicada en el control del apetito y la regulación de diversas funciones neuroendocrinas. Entre estas funciones se destaca el potente rol de ghrelina sobre las neuronas productoras de factor liberador de corticotrofina (CRF) del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) y la consecuente activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. El circuito neuronal a través del cual ghrelina activa las neuronas CRF del NPV es actualmente desconocido. Dado que las neuronas CRF del NPV son fuertemente reguladas por el tono GABAérgico, el objetivo de este trabajo fue estudiar la hipótesis que ghrelina activa las neuronas CRF mediante la inhibición del tono GABAérgico local y para ello se utilizaron ratones macho adultos C57BL/6J. Nuestros resultados indicaron que el 88,1±5,7% de los terminales sinápticos presentes en el NPV que expresan el marcador de neuronas GABAérgicas GAD67 unen un análogo fluorescente de ghrelina sugiriendo que el receptor de ghrelina se expresa en dichos terminales. Por otro lado, el pre-tratamiento de los ratones con un agonista selectivo del receptor GABA_A, muscimol (500 ng/ratón), administrado directamente en el NPV inhibió significativamente la expresión del marcador de activación neuronal, c-Fos, inducida por ghrelina (0,6 nmol/ratón) en las neuronas CRF. Mediante la evaluación de la secreción basal y estimulada de [3H]GABA en explantes del NPV en ausencia o presencia de ghrelina, pudimos demostrar que la ghrelina inhibe la secreción de GABA inducida por cloruro de potasio (1,11±0,09 vs. 1,35±0,05 veces de estímulo en explantes expuestos o no a ghrelina 100 nM, respectivamente). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la ghrelina activa las neuronas CRF del NPV mediante la disminución del tono GABAérgico local.

275. (246) EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SP1 PROMUEVE LA DESREGULACIÓN DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL Y LA MUERTE CELULAR DE NEURONAS MOTORAS PORTADORAS DE LA MUTANTE FAMILIAR SOD1G93A RELACIONADA A LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Alaimo, Agustina¹; Gorojod, Roxana Mayra¹; Uchitel, Osvaldo Daniel²; Kotler, Mónica Lidia¹
Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET¹ Depto. de Fisiología,

*Biología Molecular y Celular (FBMC), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET.*²

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) se define por la degeneración progresiva de neuronas motoras. Dentro de las variantes hereditarias, el 20% está asociado a mutaciones en el gen de la SOD1. Pese a la cantidad de mecanismos patogénicos propuestos aún no se ha identificado la vía por la cual la SOD1 interviene en la injuria de las neuronas motoras. El factor Sp1 es un elemento regulador del gen SOD1. Su función fue reportada en varios procesos neurodegenerativos e inflamatorios; sin embargo, no se conoce su rol en la ELA. En nuestros estudios empleamos neuronas motoras murinas de médula espinal hibridadas con células de neuroblastoma (NSC-34) portadoras de la SOD1 humana salvaje o mutante (G93A). Mediante inmunocitoquímica se observó un incremento del 248±4% ($p < 0,001$) en la intensidad media de Sp1 en células SOD1 G93A⁺. Además, el análisis western blot de las fracciones nucleares y el coeficiente de Pearson demostraron un aumento de Sp1 en el núcleo. Para esclarecer el rol de Sp1 en presencia de la SOD1 mutante se empleó un plásmido de expresión y un siRNA específico. El silenciamiento de Sp1 disminuyó un 18±6% ($p < 0,01$) la citotoxicidad producida por la SOD1G93A, mientras que su sobre-expresión exacerbó un 20±2% ($p < 0,01$) dicho efecto (ensayo de MTT). Aún más, la reducción de Sp1 previno un 26±2% la aparición de núcleos apoptóticos en células SOD1 mutantes. Dado que las células SOD1G93A⁺ exhiben desregulación de la dinámica mitocondrial nos planteamos identificar el impacto de Sp1 sobre la maquinaria de fisión y fusión. Mediante análisis morfométrico se detectó una disminución (27±7%; $p < 0,05$) en la fisión de las redes mitocondriales en células mutantes por efecto del silenciamiento de Sp1. Además, esta estrategia genética previno el clivaje de la proteína de fusión mitocondrial y anti-apoptótica Opa1. Nuestros resultados señalan a Sp1 como un posible responsable de la patología de la ELA indicando la importancia de profundizar el estudio de su modulación.

276. (286) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE SUBUNIDADES DEL RNMDA EN RATAS DE GENOTIPO SALVAJE Y TRANSGÉNICAS MODELO DE ALZHEIMER LUEGO DE UN APRENDIZAJE ESPACIAL

Cercato, Magalí Cecilia; Baez, María Verónica; Aguirre, Alejandra; Vázquez, Cecilia; Kornisiuk, Edgar; Frecha, Cecilia; Jerusalinsky, Diana
Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E De Robertis"

El receptor N-metil-D-aspartato (RNMDA) está involucrado en memoria y aprendizaje, en procesos de plasticidad sináptica tanto fisiológicos como patológicos (por ej. la Enfermedad de Alzheimer (EA)). El RNMDA es un heterotetramero compuesto por 2 subunidades obligatorias GluN1 y 2 regulatorias, que en hipocampo y corteza cerebral de adultos son principalmente GluN2A y B. La habituación a un campo abierto (CA) o la inducción de LTP en hipocampo producen un incremento transitorio de la expresión de GluN1 y 2A a los 70 min, que no se observa 24 hs después. En la EA está afectada la adquisición/expresión de nuevas memorias, por este motivo, investigamos si el aumento reportado en la expresión de las subunidades GluN1 y 2A del RNMDA de hipocampo, luego de habituación a un CA, tenía lugar en ratas transgénicas (*tg*) modelo de EA (McGill-APP1) de un año en las cuales se demostró déficit cognitivo espacial. Para esto se entrenaron ratas *tg* y de genotipo salvajes (*wt*) de 1 año en un paradigma de habituación a un CA que genera memoria de corta (STM) y de larga duración (LTM). Durante la primera sesión (*tr*) no se observaron cambios significativos en el comportamiento entre ratas *wt* y *tg*. Al ser testeadas 1 hora post *tr* ambos grupos expresaron STM, sin embargo, las ratas *tg* no expresaron LTM al ser testeadas 24 hs post *tr*. El análisis por WB de homogenatos de hipocampo extraídos inmediatamente y 70 min post *tr*, mostró que no existen cambios significativos en el nivel de las subunidades del RNMDA en las ratas *tg*, el que sí fue observado en las ratas

wt. Estos resultados sugieren que el aumento transitorio de las subunidades del RNMDA estaría relacionado directamente con la aparición/mantenimiento de una traza de LTM en el hipocampo, el cual se ve afectado en aquellos animales incapaces de formar/ expresar este tipo de memorias.

277. (300) TANICITOS HIPOTALÁMICOS: POSIBLES MODULADORES DE LA ACCESIBILIDAD DE GHRELINA AL CEREBRO

Frassa, María Victoria¹; Fernández, Gimena¹; De Francesco, P. Nicolás¹; Cabral, Agustina¹; Castrogiovanni, Daniel¹; Portiansky, Enrique L.²; Perello, Mario¹
Laboratorio de Neurofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)¹ Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata²

La ghrelina es una hormona peptídica sintetizada principalmente a nivel gástrico que actúa en el cerebro regulando importantes funciones tales como la ingesta de alimento, estrés, y homeostasis de la glucosa, entre otros. Dosis pequeñas de ghrelina administrada periféricamente activan principalmente neuronas del núcleo arcuato hipotalámico, mientras que dosis mayores permiten que la hormona ingrese a zonas hipotalámicas periventriculares más dorsales, sugiriendo el pasaje de ghrelina desde la periferia hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR). Sin embargo, los mecanismos que controlan el ingreso de la ghrelina al cerebro son actualmente desconocidos. Los tanicitos son células ependimarias modificadas que forman un epitelio unicelular en la superficie del tercer ventrículo del cerebro y constituyen una barrera entre la sangre y el LCR. Estudios recientes mostraron que pueden modular el acceso de señales metabólicas, como la leptina, desde la sangre a los núcleos hipotalámicos. En este trabajo investigamos la hipótesis de que los tanicitos serían capaces de incorporar ghrelina tanto periférica como del LCR. Para ello se inyectaron ratones y ratas intra-cerebro-ventricularmente con un análogo fluorescente de esta hormona (F-ghrelina) y se registró su localización en áreas hipotalámicas. También desarrollamos un modelo *in vitro* de cultivo primario enriquecido en tanicitos. Nuestros resultados muestran que los tanicitos hipotalámicos son capaces de incorporar ghrelina desde el LCR hacia el parénquima hipotalámico. En el sistema *in vitro* pudieron observarse células inmunoreactivas para vimentina con morfología compatible con la de tanicitos, las cuales lograron incorporar F-ghrelina adicionada al medio de cultivo. En conclusión, proponemos que los tanicitos serían un elemento clave en el mecanismo de entrada de ghrelina al cerebro, actuando como punto de control fisiológico de sus acciones en el hipotálamo.

278 (304) LA EXPOSICIÓN AGUDA AL ETANOL REDUCE LA EXPRESIÓN DE LA PRINCIPAL ENZIMA DE SÍNTESIS DE ENDOCANNABINOIDES (NAPE-PLD) EN LA LÍNEA CELULAR MICROGLIAL BV2

Correa, Fernando
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)

Se ha asociado al consumo de etanol con un incremento en la reactividad microglial. Así, en necropsias de pacientes alcohólicos se ha observado un mayor número de células microgliales reactivas, marcador de un proceso neuroinflamatorio en curso. La microglía juega un papel central en la respuesta inmune innata del SNC y su respuesta desregulada contribuye a exacerbar o prolongar en el tiempo la inflamación en el SNC. El sistema endocannabinoide es considerado un participante clave en la modulación de la respuesta microglial y alteraciones en el mismo podrían impactar sobre el proceso de activación microglial. La N-acilfosfatidiletanolamina-fosfolipasa D (NAPE-PLD) es la principal enzima de síntesis de anandamida y contribuye a mantener el tono endógeno de este endocannabinoide. Se ha observado que ratones NAPE-PLD *knock-out* son incapaces de montar una respuesta inflamatoria normal. Por ello, nuestro objetivo fue estudiar el efecto del etanol sobre la expresión de NAPE-PLD así como los posibles mecanismos moleculares involucrados. Como primera aproximación, determinamos el efecto de la exposición aguda al

etanol sobre la expresión proteica y de ARNm de NAPE-PLD, observándose una disminución en la expresión de esta enzima en ambos casos ($p < 0,05$). Esta disminución se mantuvo 48 h después de la exposición al etanol, sugiriendo una posible participación de mecanismos epigenéticos en dicha regulación. A fin de evaluar los mecanismos moleculares involucrados en este efecto, estudiamos la posible participación de ERK1/2 MAPK y CREB, observándose que ambas vías son activadas por la exposición a etanol y que ambas contribuyen a la modulación de la expresión del ARNm de NAPE-PLD inducida por etanol ($p < 0,05$ en ambos casos). En conclusión, el etanol reduce la expresión microglial de NAPE-PLD mediante la activación de ERK1/2 MAPK y de CREB.

279. (346) EN LA BÚSQUEDA DE MARCADORES BIOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD DEPRESIVA

Bassi, Sabrina¹; Quiroz, Nicolás²; Faccioli, José³; Besada, Cristina⁴; García Mónaco, Ricardo⁴; Finkelsztein, Carlos⁵; Argibay, Pablo^{1,2}

*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental- Hospital Italiano de Buenos Aires*¹ *LBAL-Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental- Hospital Italiano de Buenos Aires*² *Servicio de Psiquiatría- Hospital Italiano de Buenos Aires*³ *Diagnóstico por Imágenes- Hospital Italiano de Buenos Aires*⁴

La depresión mayor es un desorden mental severo, normalmente crónico y recurrente. Encontrar biomarcadores podría mejorar el diagnóstico y la eficacia terapéutica. Estudios previos han reportado una disminución en la expresión de la proteína precursora del Péptido Neuroestimulante Colinérgico Hipocampal (HCNP-pp) a nivel de ARNm y de proteína en el hipocampo de ratas sujetas a estrés. Por otra parte, en pacientes con depresión se ha observado una disminución del volumen hipocampal. En base a estos resultados, el objetivo del trabajo fue estudiar los niveles de expresión de ARNm de HCNP-pp (por PCR en tiempo real) en linfocitos de sangre periférica (PBMCs) de pacientes depresivos mayores (antes ($n=16$) y después ($n=13$) del tratamiento) y controles sanos ($n=38$) y la volumetría (por resonancia magnética nuclear) de las estructuras subcorticales en pacientes ($n=12$) y controles ($n=8$). Se halló un aumento significativo de los niveles de ARNm de HCNP-pp en pacientes con respecto a los controles ($p=0,0003$), sin cambios luego del tratamiento antidepressivo. Los niveles de HCNP-pp no se correlacionaron con la severidad del trastorno, la respuesta terapéutica o la tasa de remisión. Por otra parte observamos una disminución en el volumen del núcleo accumbens (Nac) izquierdo en los pacientes y tratados con respecto a los controles ($p < 0,05$). El aumento de HCNP-pp coincide con resultados de otro grupo, que muestran que una sobreexpresión de HCNP/HCNP-pp en el hipocampo desde la vida temprana en ratones transgénicos, genera un comportamiento tipo depresivo en la vida adulta. Por otra parte, una disminución del Nac izquierdo fue detectada en un estudio preliminar en cerebros post mortem de pacientes con trastornos del ánimo con respecto a controles. El nivel de expresión de HCNP-pp y el volumen del Nac podrían utilizarse como marcadores biológicos en el diagnóstico de la enfermedad depresiva, una vez validados estos resultados en un número mayor de pacientes y controles.

280. 368) ALTERACIONES CEREBELARES A LOS 120 DÍAS EN RATAS QUE SUFRIERON ASFIXIA PERINATAL

Campanille, Verónica; Saraceno, Gustavo Ezequiel; Logica Tornatore, Tamara; Kolliker- Fres, Rodolfo; Capani, Francisco; Castilla, Rocío

Instituto de Investigaciones Cardiológicas Prof. Dr. Alberto C. Taquini (ININCA)- CONICET-UBA

La asfisia perinatal (AP) (incidencia 1-5000 nacidos vivos) es una complicación obstétrica asociada a una alta tasa de morbimortalidad. El cerebelo es vulnerable a la hipoxia en recién nacidos por su rápido crecimiento en este período y puede dar lugar a alteraciones de sus funciones, incluyendo el control del motor y cognitivo y procesos afectivos. El conocimiento de los mecanismos involucrados en las alteraciones causadas por la AP permitirá

diseñar terapias preventivas o paliativas de esta condición. Utilizando un modelo de AP murino previamente caracterizamos las alteraciones hipocampales; sin embargo, el cerebelo no ha sido estudiado. Por tal motivo estudiamos las alteraciones morfológicas de los cerebelos (10-12 por grupo) de ratas adultas (120 días) que sufrieron AP. Se analizaron los lóbulos cerebelares de secciones sagitales por inmunohistoquímica. Observamos que el número total de células de Purkinje se mantuvo en los animales AP, pero que presentaban mayor porcentaje de células con tinción anormal para Calbindina así como por tinción con Azul de Toluidina. En ambos casos se observa una configuración espacial desorganizada de la capa de células de Purkinje con aglomerado de las mismas en diversas regiones. A nivel de la capa molecular, se detectó un aumento del espesor de la misma en los animales asfícticos así como una edematización de las dendritas reflejadas en el incremento del porcentaje del área reactiva MAP2+, marcador de dendritas. Con respecto a la capa granular se observó un aumento de la misma en los animales AP. Tanto en esta capa como en la molecular se observó un incremento de la gliosis reactiva (astrocitos y glia de Bergmann respectivamente) en cerebelos de animales AP determinada por un aumento del porcentaje del área GFAP+. Dicho aumento fue corroborado por Western-Blot. Estos hallazgos podrían estar relacionados o interferir en las alteraciones observadas en la conducta y en el aprendizaje de personas que sufrieron AP.

281. (403) ALTERACIONES DE LA VASCULATURA Y DISRUPCIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN EL HIPOCAMPO DE UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Pomilio, Carlos Javier; Vinuesa, María Ángeles; Pava, Patricio; Beauquis, Juan; Saravia, Flavia

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)- CONICET

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal forma de demencia en la adultez y se encuentra entre las mayores causas de muerte. Una de sus características es la presencia de placas amiloides (PA), fundamentalmente en corteza cerebral e hipocampo. Numerosos estudios sugieren que la vasculatura cerebral juega un rol fundamental en el desarrollo de la patología. Nuestro objetivo fue estudiar alteraciones vasculares en el hipocampo del ratón PDAPP-J20 (J20), que modeliza la EA al portar el gen humano de la Proteína Precursora de Amiloide con mutaciones específicas de la forma familiar. A través de marcación de la vasculatura con lectina fluorescente en cortes de cerebro, se analizó la densidad y complejidad vascular del hipocampo en las regiones stratum radiatum (SR) e hilio (H). En este sentido, los animales J20 viejos tienen una reducción del 33,8% de la densidad vascular en H respecto del grupo control ($p < 0,05$). Se cuantificaron alteraciones morfológicas vasculares -como angostamientos de la luz o repliegues de la pared vascular- que aumentan con la edad en ambas regiones ($p < 0,05$). Estos eventos se encuentran más frecuentemente en H y a una edad en la cuál no hay PA pero sí niveles detectables de péptidos amiloides solubles. Además, los ratones J20 viejos presentan comprometida la integridad de la barrera hematoencefálica, evidenciado por un aumento de 1,5 veces el extravasado de fluoresceína de sodio ($p < 0,05$) y menor inmunomarcación de la proteína de unión estrecha occludina. Estos resultados demuestran la participación de la vasculatura en la patología, con compromiso de su estructura e integridad y, en línea con otros resultados de nuestro laboratorio, indicarían subareas más vulnerables. Actualmente trabajamos en la detección de alteraciones tempranas, principalmente en la funcionalidad vascular. Para ello se ha puesto a punto un protocolo que permite enriquecer una muestra en microvasculatura cerebral, para posteriormente realizar tratamientos *in vitro*.

282. (434) EL MANGANESO INDUCE MUERTE CELULAR Y ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES MURINAS BV2

Porte Alcon, Soledad; Miglietta, Esteban Alberto; Gorojod, Roxana Mayra; Alaimo, Agustina; Kotler, Mónica Lidia

Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nanoncología, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET

La exposición crónica a niveles elevados de manganeso (Mn) produce el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa denominada Manganismo, cuya sintomatología y vías de señales son similares a la enfermedad de Parkinson Idiopático. Si bien las células gliales cumplen una amplia variedad de funciones que regulan la homeostasis tisular, la neurodegeneración inducida por varios tóxicos experimentales y ambientales involucra la activa participación de la astrogliá y de la microgliá. En particular, la microgliá puede activarse produciendo factores citotóxicos y pro-inflamatorios. En este trabajo se empleó la línea microglial murina BV2 con el fin de analizar los posibles efectos citotóxicos inducidos por exposición a Mn. Las células expuestas a diferentes concentraciones de $MnCl_2$ durante 24 hs presentaron una disminución en la viabilidad (Ensayo de MTT) de manera dosis dependiente, que resultó ser del 50% para 250 μM ($p < 0,001$), concentración que fue seleccionada para continuar los estudios. Mediante análisis de la morfología nuclear (Tinción con Hoechst 33258) se detectó un aumento en la cantidad de núcleos condensados ($p = 0,006$) y fragmentados ($p = 0,01$) indicativo de la ocurrencia de muerte celular apoptótica. La exposición a Mn indujo un aumento en los niveles de expresión de los productos clivados de PARP-1 (Western Blot) de 3,2, 5,4 y 1,5 veces para las formas de 53, 35 y 24 kDa respectivamente, en concordancia con la disminución en los niveles de la pro-forma de 116 kDa (0,4 veces). Para analizar la activación microglial se estudió la producción y liberación al medio de cultivo de óxido nítrico (Reacción de Griess). La exposición a Mn, aumentó significativamente la concentración de Nitrito ($p = 0,03$). En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el Mn induciría muerte celular apoptótica y activación de las células BV2. A futuro se investigará la relación entre ambos procesos y el rol que cumplen en la neurodegeneración inducida por Mn.

283. (440) NUEVO MÉTODO DE VISUALIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DEL TRACTO AXONAL CÓRTICO ESPINAL A PARTIR DE TEJIDO ENTERO TRANSPARENTADO UTILIZANDO MICROSCOPIA DE EXCITACIÓN DE 1-FOTÓN
Quinta, Ramiro; Pasquini, Laura; Pasquini, Juana
 Depto. de Química Biológica, Instituto de Química y Físico Química Biológica, Universidad de Buenos Aires

El principal tracto axonal involucrado en la actividad locomotora de los mamíferos se conoce con el nombre de Tracto Córtico Espinal (TCE), cuyos axones se extienden desde la corteza motora (neurona motora superior), atravesando el cerebro hacia el Tallo cerebral (entrecruzamiento axonal), para finalmente alcanzar las diferentes regiones de la médula espinal, contactando (vía interneuronas) con las motoneuronas inferiores. Todo este proceso desencadena el movimiento voluntario. Asimismo, la visualización del TCE es esencial para poder estudiar procesos patológicos como los que se dan en lesiones traumáticas de médula espinal o en esclerosis múltiple, en cuyos casos la integridad estructural de los axones está afectada. Al día de hoy, la mayoría de estos estudios involucran un tratamiento de corte histológico sobre el tejido en cuestión (cerebro, tallo cerebral y médula espinal), presentando el problema de localizar en forma específica las zonas donde el TCE es predominante. Para sortear esta limitación se usó una novedosa técnica que permite transformar el tejido entero en uno totalmente transparente, y de esa manera poder observarlo directamente al microscopio identificando las zonas de interés sin ningún tipo de micro-corte. Sin embargo, la principal desventaja de este procedimiento es la adquisición de las imágenes, ya que se necesita equipamiento costoso y no convencional como lo es la microscopía de excitación de 2-fotones. En este trabajo desarrollamos una nueva metodología en la que marcando el TCE con FluoroRuby en la corteza motora y luego realizando la técnica de transparentado sobre todo el tejido (cerebro y médula espinal); se logró adquirir imágenes del TCE en la profundidad del tejido intacto, seguida de

su reconstrucción tridimensional utilizando microscopía confocal de 1-fotón; logrando una alta calidad de resolución igualando o superando las conseguidas utilizando microscopía de excitación de 2-fotones. La metodología presentada en este trabajo es una poderosa herramienta para desarrollar estudios en patologías donde la integridad del TCE está involucrada.

284. (464) NEUROINFLAMACIÓN EN HIPOCAMPO Y ALTERACIONES CONDUCTUALES ASOCIADOS A LA INGESTA DE DIETA ALTA EN GRASA EN RATONES C57BL/6.
Vinuesa, María Angeles^{1,2}; Pomilio, Carlos Javier^{1,2}; Pavía, Patricio^{1,2}; Menafrá, Martín³; Brites, Fernando³; Bonaventura, María Marta¹; Lux, Victoria¹; Beauquis, Juan^{1,2}; Saravia, Flavia Eugenia^{1,2}
 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires² Depto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³

La diabetes tipo 2 y la obesidad son enfermedades metabólicas de alta incidencia, factores de riesgo para procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (AD). Su impacto sobre el sistema nervioso central y la conducta es muy relevante aunque poco conocido. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la dieta alta en grasa (HFD) sobre el hipocampo y su relación con conductas dependientes de esta estructura y otras. Luego de 5 meses de exposición de ratones C57BL/6 a HFD corroboramos aumento de peso, resistencia a insulina, hipercolesterolemia y lípidos en hepatocitos respecto al grupo de dieta normal (DN). Abordamos la inflamación utilizando el marcador de microgliá Iba 1 y encontramos en el hilio del giro dentado de ratones HFD una mayor densidad de células ($4,03 \pm 0,16$ vs $5,71 \pm 0,19$ células $iba1+ / 600000 \mu m^3$), con incremento del área del soma, este último parámetro también en *st radiatum* con respecto a DN, indicando promoción de una respuesta inflamatoria por la dieta. Se evidenció una disminución en la capacidad neurogénica del giro dentado por detección de neuronas doublecortin en el grupo HFD. Estos ratones fallaron en la prueba de construcción de nido y mostraron mayor ansiedad en el laberinto elevado en cruz. El test de suspensión de la cola indicó que la HFD aumenta el comportamiento asociado a depresión. Además, el desempeño en la prueba de reconocimiento de localización novedosa de un objeto y en el laberinto en Y fue más pobre en el grupo HFD, sugiriendo impedimento de la memoria espacial a corto y mediano plazo ($p < 0,05$ en todas las pruebas). Nuestros datos indican que la exposición a HFD en el período juvenil se asocia con un incremento de la neuroinflamación y una disminución de la neurogénesis en el hipocampo así como un mayor impedimento cognitivo, conducta ansiosa y asociada a depresión, alteraciones también presentes en patologías neurodegenerativas como AD. Esto motiva fuertemente estudiar la interrelación entre ambas patologías.

285. (511) DESCONEXIÓN FUNCIONAL DE LA VÍA DIRECTA EN ESTADIOS ASINTOMÁTICOS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON
Escande, Mariela Verónica¹; Taravini, Irene²; Belforte Juan Emilio¹; Murer, Mario Gustavo¹
 Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFI-BIO), Grupo de Neurociencia de Sistemas, Facultad de Medicina, UBA-CONICET¹ Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-UBA-CONICET²

Está ampliamente aceptado que un desbalance entre las vías directa e indirecta subyace a la aparición de síntomas en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, no se ha estudiado si los cambios de actividad observados en las neuronas espinosas medianas que dan origen a las vías directa (dMSNs) e indirecta (iMSNs) correlacionan con la aparición de los síntomas, con la severidad de los mismos o con el grado de denervación dopaminérgica. Nos proponemos caracterizar la ganancia de las conexiones córtico-estriatales en distintos estadios de depleción dopaminérgica. Mediante estereotaxia, inyectamos la toxina 6-OHDA en ratones

adultos BAC *Drd1a*-tdTomato. Luego de la cirugía realizamos tests conductuales y mediante un análisis multivariado se clasificó a los sujetos como asintomáticos o sintomáticos. Posteriormente llevamos a cabo registros juxtacelulares in vivo de las MSNs en los que evaluamos la respuesta de corta latencia, evocada en estas células, al estimular eléctricamente la corteza motora. En ratones controles, las dMSNs presentan un menor umbral de respuesta (Mann Whitney $p < 0,001$) y una mayor tasa de respuesta que las iMSNs (ANOVA medidas repetidas $p < 0,0001$). Encontramos que las dMSNs presentan una marcada desconexión funcional incluso en ratones asintomáticos. Además, los cambios observados en las dMSNs correlacionan linealmente con el grado de depleción dopaminérgica ($r = 0,73$ $p < 0,001$) y con parámetros conductuales como la acinesia de la pata anterior ($r = 0,79$ $p < 0,0001$). La hiperactividad de las iMSNs así como la clasificación de los ratones como sintomáticos ocurren cuando la lesión dopaminérgica es muy extensa. Nuestros datos sugieren que en la situación control, la conectividad cortico-estriatal favorece las señales GO (vía directa) sobre las no-GO (vía indirecta). A medida que la denervación dopaminérgica progresa, las señales GO se desconectan gradualmente. Sin embargo, el diagnóstico clínico sólo se consigue cuando las señales no-GO también se afectan.

286. (526) PAPEL DE HMGB-1 EN LA GLIOSIS REACTIVA Y LA NEUROINFLAMACIÓN LUEGO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

Lukin, Jerónimo; Rosciszewski, Gerardo; Cadena, Vanesa; Villarreal, Alejandro; Murta, Verónica; Ramos, Alberto Javier

Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. E. De Robertis (IBC/N), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La isquemia cerebral produce la liberación de DAMPs (*Damage Associated Molecular Pattern proteins*) hacia el espacio extracelular, capaces de activar la inmunidad innata. HMGB-1 es un DAMP liberado en forma de gradiente desde el core isquémico y se propone que interacciona con receptores reconocimiento de patrones RAGE y Toll-like 2-4 (TLR2-4). En este trabajo evaluamos la presencia de TLR2-4 en la penumbra y el core isquémico en un modelo de isquemia por devascularización cortical (CD) en ratas Wistar donde describimos previamente el aumento de la expresión de RAGE (Villarreal et al., *J. Neurochem.* 2014). *In vitro*, determinamos los efectos de HMGB-1 en los tipos celulares presentes en la zona isquémica y estudiamos la interacción entre astrocitos y microglía expuestos a HMGB-1. Para ello utilizamos cultivos celulares puros o mixtos y empleamos medios condicionados. La isquemia indujo un aumento en la expresión de TLR2-4, inicialmente presente en células infiltrantes (BINC) en el core isquémico y luego se evidenció en neuronas y astrocitos de la penumbra isquémica (3 y 7 días post-lesión). *In vitro*, la exposición a HMGB-1 mejoró la sobrevivencia neuronal (50ng/ml) mientras que dosis mayores (500-5000ng/ml) produjeron pérdida de prolongaciones neuronales y astrogliosis reactiva. Sobre la microglía, HMGB-1 indujo cambios hacia la morfología ameboide reactiva. En ambos tipos gliales HMGB-1 produjo activación de NFκB. La exposición a medio condicionado por astrocitos expuestos a HMGB-1 indujo en la microglía un aumento en la expresión de TREM-2 y CD206 y una disminución en la expresión de iNOS. Nuestros resultados muestran que HMGB-1 tiene efectos diferentes y dosis dependientes sobre neuronas, astrocitos y microglía. Adicionalmente, los astrocitos expuestos a HMGB-1 parecen inducir en microglía el fenotipo M2 antiinflamatorio. *In vivo*, se evidencia que HMGB-1 podría actuar a través de los receptores de reconocimiento de patrones expresados en la penumbra isquémica. Subsidios: ANPCYT PICT, UBACYT, PIP CONICET

287. (532) EFECTO ANTIOXIDANTE DE ALFA-MSH EN CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS

Ramírez, Delia; Carniglia, Lila; Saba, Julieta; Durand, Daniela; Caruso, Carla; Lasaga, Mercedes
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los procesos inflamatorios en el sistema nervioso central (SNC) contribuyen en gran medida al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y el estrés oxidativo ha sido implicado en la pérdida de neuronas en la progresión de dichas enfermedades. Los astrocitos son las células con mayor capacidad antioxidante del SNC y proveen a las neuronas de los precursores de glutatión (GSH), principal compuesto antioxidante a nivel cerebral. Las melanocortinas son neuropéptidos con acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras. Previamente demostramos que la hormona alfa melanocito estimulante (alfa-MSH) ejerce una acción antiinflamatoria a través de los receptores MC4 en astrocitos. Dada la importancia de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas focalizadas en la regulación de los mecanismos antioxidantes, decidimos evaluar el efecto antioxidante de las melanocortinas en astrocitos utilizando NDP-MSH, un análogo sintético de alfa-MSH. Para ello, realizamos cultivos primarios de astrocitos de rata que fueron incubados por 24 h con NDP-MSH 0,1 μM y evaluamos los niveles intra y extracelulares de GSH a través de la sonda fluorescente monoclorobimano. NDP-MSH no modificó los niveles intracelulares de GSH, en tanto que aumentó sus niveles extracelulares en un 21,2% ($p < 0,001$). Además determinamos la actividad de gamma-glutamato-cisteína ligasa (gamma-GCL), enzima limitante en la síntesis de GSH, mediante un ensayo de fluorescencia. Observamos un incremento del 44,5% de la actividad de la enzima ($p < 0,001$) luego del tratamiento con NDP-MSH. También se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) mediante la técnica de auto oxidación de adrenalina. En este caso NDP-MSH indujo un aumento del 52,7% de la actividad de dicha enzima ($p < 0,05$). En resumen, NDP-MSH ejercería un efecto antioxidante modulando la actividad de gamma-GCL y SOD, y estimulando la liberación de GSH, contribuyendo de esta forma al efecto neuroprotector de las melanocortinas.

288. (533) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE SUBUNIDADES DEL RNMDA Y FORMACIÓN DE UNA NUEVA MEMORIA.

Vázquez, Cecilia A; Cercato, Magalí; Kornisiuk, Edgar; Snitcofsky, Marina; Baez*, María Verónica; Jerusalinsky*, Diana

Instituto de Biología Celular (IBC)-CONICET

El receptor N-metil-D-aspartato (RNMDA) es relevante a los procesos de plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje. El RNMDA es un heterotetrámero compuesto por 2 subunidades GluN1 (obligatorias) y 2 variables. En hipocampo y corteza cerebral de roedores adultos estas subunidades son mayoritariamente GluN2A y B. Recientemente, fue sugerido que la generación de una traza de memoria de larga duración (LTM) crearía un aumento en la relación GluN2A/ GluN2B en las sinapsis involucradas. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la habituación a un campo abierto (CA) genera un aumento transitorio de la expresión de las subunidades GluN1 y 2A 70 minutos post-habituación, el cual no es observado en animales que no pueden adquirir este aprendizaje. Para evaluar si se trataba de un mecanismo conservado a lo largo del desarrollo, ratas Wistar de distintas edades (P22 a 1 año) fueron sometidas a habituación al CA por 5 minutos (*tr*) y evaluadas 24hs después (*te*). El análisis de los parámetros exploratorios demostró que las ratas de todas las edades evaluadas habituaron al CA. El análisis por WB de las subunidades del RNMDA de hipocampo de los animales eutanasiados inmediatamente o 70' pos-*tr*, o pos-*te*, mostró que en todas las edades analizadas se observa un aumento de las subunidades GluN1 y 2A únicamente a los 70' pos-*tr*. A su vez, el análisis de las subunidades del RNMDA en otras estructuras reveló que a los 70 minutos pos-*tr* sólo hay aumento de GluN1 y 2A en el hipocampo, mientras que 70 minutos pos-*te* se evidencia un aumento de las mismas subunidades únicamente en la corteza pre-frontal (CPF). En consecuencia, proponemos que el aumento de GluN1 y 2A en el hipocampo sería un mecanismo por el cual se marcarían las sinapsis involucradas en la adquisición/mantenimiento de una LTM, a la vez que el aumento en la CPF sería consecuencia de la reactivación de la misma.

289. (540) DISMINUCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO EN PLASMA SANGUÍNEO INDUCIDA POR LA INYECCIÓN DE CAPSAICINA EN TERMINACIONES TRIGEMINALES CRANEOFACIALES

Balceda, Ariel Gerónimo Armando¹; Baez, María^{1,3}; Buonanotte, Federico²; Buonanotte, Carla²; Tarán, Mariana¹; Scribano-Parada, María^{1,2}; Blencio, Sergio¹; Saadi, Nabil¹; Moya, Mónica¹

Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba¹ Servicio de Neurología, Hospital de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba² Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Humana (IICSHUM)-UNLaR³

Se cree actualmente que el incremento de la expresión citoquinas y proteínas proinflamatorias, en meninges y tronco cerebral en migraña, debido a sensibilización trigeminal, estaría asociado a estrés oxidativo vascular sistémico y por ello a los eventos cerebrovasculares observados en migrañosos como accidentes cerebrovasculares. Según observaciones de otros autores, óxido nítrico (NO) podría tener un papel clave como mediador de esa asociación y por ende en el desarrollo de las enfermedades vasculares asociadas. La importancia de ello radicaría en nuevos enfoques terapéuticos de la migraña y sus comorbilidades. El objetivo fue analizar en un modelo experimental de migraña las modificaciones del NO en sangre periférica mediante la activación del trigémino con capsaicina. Se utilizaron 12 ratas machos Wistar en 2 grupos de 6: Control (A) y Activación trigeminal (B). La activación trigeminal se realizó bajo anestesia mediante 1 inyección de capsaicina 10 μ M en terminaciones trigeminales de la región de las cejas 2 horas antes de la obtención del plasma. La determinación NO (mM) se realizó mediante la reacción de Griess y se cuantificó por espectrofotometría. Los resultados se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks modificado y el análisis de la varianza (ANAVA). Se estableció una $p < 0,05$ para todos los casos. En (B), NO disminuyó significativamente (17,82 mM \pm 4,89) vs. control (A) (24,27 mM \pm 4,40) ($p < 0,01$). En migraña experimental, la activación trigeminal, mediante la inyección de capsaicina, disminuye la biodisponibilidad de NO en sangre periférica.

290. (567) ROL DEL CANAL KV1.3 EN LA EXCITABILIDAD DE LAS INTERNEURONAS COLINÉRGICAS ESTRIATALES

Tubert, Cecilia; Sánchez, Gonzalo; Rela, Lorena; Murer, Mario Gustavo

Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO), Grupo de Neurociencia de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CONICET

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo causado por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. La acetilcolina (ACh) y la dopamina (DA) son los principales moduladores de la función corticoestriatal. La ACh es liberada por interneuronas colinérgicas (ICE) que tienen actividad tónica dependiente de mecanismos intrínsecos. Resultados recientes propios muestran que las ICE se encuentran hiperactivas en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson (Sánchez y col. J Neurosci 2011). Proponemos que existen mecanismos de membrana dependientes de voltaje que regulan la excitabilidad intrínseca de las ICE y su actividad tónica, que son modulados por DA y que están alterados en animales parkinsonianos. Utilizamos ratones que expresan la proteína fluorescente *tdTomato* en las ICE (ChAT-Cre;rt). Registramos las ICE en rodajas de cerebro mediante la técnica de *patch clamp* en la configuración *whole-cell* para estudiar la excitabilidad intrínseca y sus corrientes subyacentes, y en *cell attached* para estudiar su actividad espontánea. Demostramos que la margatoxina (MgTx), un bloqueante de canales Kv con selectividad por el Kv1.3 aumenta la descarga de las ICE frente a la inyección de corriente (control: 7,167 \pm 1,302 PAs/s; MgTx: 13,33 \pm 1,116 PAs/s; $p < 0,001$). Logramos aislar y caracterizar la corriente sensible a MgTx, y encontramos un $V_{act} = -38 \pm 7$ mV y un $V_{50} = -3 \pm 8$ mV. La frecuencia de disparos espontáneos de las ICE aumentó 74% en presencia de MgTx ($p = 0,0455$). Además demostramos mediante inmunohistofluorescencia en secciones

de tejido y PCR en ICE obtenidas por microdissección láser la presencia del canal Kv1.3 en las ICE. Otros antagonistas de canales Kv no afectaron a las ICE. Nuestros datos demuestran que el canal Kv1.3 juega un rol importante en la fisiología de las ICE y que podrían constituir un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

ONCOLOGÍA 2

291. (317) CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA HUMANO T47D-MR CON RESISTENCIA ADQUIRIDA A ANTIPROGESTÁGENOS. PARTICIPACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR.

Rodríguez, María Jimena; Riggio, Marina; Polo, María Laura; May, María; Perrone, María Cecilia; Lanari, Claudia; Novaro, Virginia

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

La resistencia a la terapia endócrina es responsable de que un alto porcentaje de pacientes con tumores de mama que expresan receptores hormonales recaigan a la enfermedad luego del tratamiento (resistencia *de novo* o constitutiva). Por ello, nos interesa estudiar los procesos biológicos involucrados en el fenómeno de resistencia endócrina. Se ha demostrado que la activación de vías como la de PI3K/Akt/mTOR y de MAPK ERK1/2 están involucradas en la resistencia adquirida a la terapia antiestrogénica. En este trabajo, investigamos si dichas vías están también involucradas en la adquisición de resistencia a antiprogéstágenos, ya que éstos se han planteado como una terapia endócrina adicional a la de los antiestrogénos para el cáncer de mama. Por presión selectiva con el antiprogéstágeno Mifepristona (MFP), a partir de la línea celular T47D-wt (wild type), generamos una línea resistente a MFP denominada T47D-MR que crece en una concentración de 100 nM del antagonista, siendo esta concentración letal para las células T47D-wt. La inoculación de las células T47D-MR en ratones NOD/SCID generó tumores refractarios al tratamiento con MFP. La histología de los tumores T47D-MR no presenta los signos de regresión característicos de los tumores T47D-wt tratados con MFP. Estos signos son: disminución de la masa y viabilidad tumoral, aumento en la vascularización, depósito de mucinas y tejido fibroso extracelular. La caracterización *in vitro* mostró que en comparación con la línea T47D-wt, la línea T47D-MR presenta un estado basal sobreactivado ($p < 0,01$) de las proteínas Akt y S6, mientras la activación de ERK1/2 y los niveles del receptor de progesterona se encuentran disminuidos ($p < 0,01$). Esta variante celular nos permitirá analizar los procesos involucrados en el desarrollo de la resistencia a la terapia con antiprogéstágenos en el cáncer de mama, y estudiar el efecto regulatorio de la vía PI3K/Akt sobre los mismos.

292. (318) CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA-MOLECULAR DEL CÁNCER COLORECTAL

Redal, María Ana; Ramírez, Carolina; González, María Laura; Vincent, Jimena; Santino, Juan Pablo; Vaccaro, Carlos
Hospital Italiano de Buenos Aires

El cáncer colorrectal (CCR) es una afección altamente prevalente en el país, estimándose más de 10.000 nuevos casos/año. Para reducir su incidencia y mortalidad es fundamental conocer los factores genéticos y ambientales de riesgo. Ambos han sido bien caracterizados en otras poblaciones no latinas y se establecieron las recomendaciones de prevención. Las características epidemiológicas y moleculares del CCR en nuestra población puedan diferir de las poblaciones sobre las que se fundamentan las actuales recomendaciones. Objetivos: 1. Clasificar clínicamente los pacientes con CCR en base a los antecedentes familiares. 2. Caracterizar el CCR de acuerdo a los 5 microsátelites del panel de Bethesda. 3. Caracterizar las variantes de los genes MLH1 y MSH2, según algoritmo de trabajo. Resultados: Participaron 232 ptes, 55% varones. Las formas esporádicas, familiares, hereditarias

fueron de 89,7%, 7,1% y 3,2% respectivamente. La media de edad de presentación fue 65,7 años (DS 14,4). Un 12,3% presentó antecedentes familiares de CCR, cumpliendo criterios de Amsterdam un 3,2%. De 151 casos estudiados se detectó microsatélites inestables en 23,8% (36/151). 17 casos tuvieron indicación de secuenciación genética, 10 correspondieron a formas esporádicas. De los 8 secuenciados se detectó una mutación patogénica y una probablemente patogénica. Conclusiones: Se identificó un 7,2% de pacientes con indicación de estudio genético que no hubieran sido identificados en base a la clasificación clínica. Esto sustenta la posición sobre el uso universal de la caracterización molecular independientemente de la forma clínica. Así mismo, en los casos con formas hereditarias, el estudio genético permitió identificar 2 casos compatibles con formas clínicas: familiar tipo X y Lynch. Estos subtipo de cánceres hereditarios, tendrían diferente riesgo que las formas clásicas de síndrome de Lynch por lo que su identificación podría cambiar las recomendaciones de prevención y tratamiento.

- 293. (319) INDUCCIÓN DE APOPTOSIS Y RADIOSENSIBILIZACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA POR SOBREEXPRESIÓN DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES RHOB**
Notcovich, Cintia¹; Sánchez Crespo, Rodrigo²; Molinari, Beatriz^{1,3}; Duran, Hebe^{1,2,3}
 Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)¹ Universidad Nacional de San Martín²; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³.

La proteína RhoB está vinculada a la apoptosis inducida por el daño al ADN. En una amplia variedad de tumores los niveles de RhoB disminuyen con el progreso tumoral, siendo un gen supresor de tumores por su efecto antiproliferativo y proapoptótico. Considerando la resistencia intrínseca del melanoma, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la sobreexpresión de RhoB produce radiosensibilización de células derivadas de este tipo tumoral. Se transfectoron establemente 3 líneas celulares de melanoma humano (A375, SB2 y MELJ) de distinta radiosensibilidad intrínseca, con una construcción de RhoB, con una mutante de RhoB constitutivamente activa V14, o con plásmido vacío como control. En las células transfectadas con RhoB o V14 se demostró aumento de esta proteína por *western blot* ($p < 0,05$). Por ensayo de MTT se observó una disminución significativa en la proliferación de los clones derivados de A375 y MELJ respecto del control, mientras que para SB2 no se observaron diferencias significativas. El análisis del clivaje de PARP por *western blot* demostró un aumento significativo en la apoptosis basal de las líneas que sobreexpresan RhoB y V14 respecto del control ($p < 0,05$). Por último, a fin de evaluar si el aumento de RhoB provocó sensibilización de las células transfectadas, éstas se irradiaron con rayos gamma y se realizaron curvas de supervivencia ajustadas al modelo lineal-cuadrático. Para las líneas derivadas de A375 y SB2 se observó radiosensibilización, determinada por el aumento del parámetro α y la disminución (ambos significativos $p < 0,05$) del factor de supervivencia a 2 Gy. El análisis de la línea MELJ sólo mostró sensibilización para V14. En conclusión, el aumento en los niveles de RhoB en líneas celulares de melanoma conduce, no sólo a una disminución de la proliferación y aumento de la apoptosis basal, sino también a una radiosensibilización. Así, la modulación de RhoB constituiría una herramienta para la sensibilización del melanoma radioresistente.

- 294. (327) UTILIZACIÓN DE UN GEL TERMOSENSIBLE PARA LA LIBERACIÓN INTRATUMORAL DE PACLITAXEL EN DOS MODELOS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO**
Rico, María José^{1,3}; Mengatto, Luciano^{2,3}; Rozados, Viviana R¹; Poeso, Juan I²; Roggero, Eduardo A¹; Luna, Julio²; Scharovsky, O Graciela¹
 Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹; Laboratorio de Química Fina, Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC-CONICET), Universidad Nacional del Litoral². Contribuyeron igualmente³

El Paclitaxel es un agente antitumoral usado en el tratamiento de tumores sólidos. Los hidrogeles son polímeros entrecruzados en forma de red tridimensional que en contacto con el agua forman materiales blandos y elásticos. Evaluamos el efecto antitumoral, la toxicidad y la supervivencia de un tratamiento por vía intratumoral (i.t.) con un gel termosensible que contiene paclitaxel en ratones BALB/c y CBi inoculados vía s.c. con los adenocarcinomas de mama M-234p y M-406, respectivamente. Cuando el tumor alcanzó un volumen de 80 mm³ (día 0) los animales se distribuyeron en 4 grupos (n=7-8/grupo) que recibieron: T (Testigo) 0,2 ml/día de solución salina i.p. días 0 al 3; P (Pacli) 10 mg/kg/día de Pacli i.p. días 0 al 3; G (Gel) 50 μ L de un gel termosensible vía i.t. en el día 0; G+P 50 μ L de un gel termosensible conteniendo 0,97 mg/mL de Pacli vía i.t. en el día 0. En los dos modelos estudiados no se observó toxicidad, evaluada mediante la evolución del peso corporal y los caracteres clínicos. En el modelo M-234p, el volumen tumoral mostró diferencias entre grupos (ANOVA $P = 0,0125$), siendo G y G+P los grupos con menor volumen tumoral. G+P fue el único grupo que presentó una regresión tumoral (1/6; 17%) y mostró el infiltrado peritumoral más intenso. Asimismo, presentó la mayor supervivencia (mediana: 19 semanas), seguida por la de los grupos G (17,5 semanas) y T y P (15 semanas). En el modelo M-406 no se observaron diferencias en el volumen tumoral, ni en los infiltrados peri e intratumoral. Sin embargo, el análisis de la curva de supervivencia fue muy significativo ($P < 0,0001$), siendo GP el grupo que presentó mayor supervivencia. Se concluye que la liberación i.t. de Pacli desde el Gel tiene efecto antitumoral, aumentando la supervivencia de los animales con tratamiento combinado G+P; no presenta toxicidad evidente; G+P resulta efectivo en el modelo M-234p. Las características del tratamiento y los efectos obtenidos sugieren una futura transición a la clínica.

- 295. (328) MENADIONA INCREMENTA EL EFECTO ANTI-PROLIFERATIVO DE CALCITRIOL A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES**
Guizzardi, Solange N; Rodríguez, Valeria A; Tolosa De Talamoni, Nori G; Picotto, Gabriela
 Catedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba

El calcitriol es un potente agente antiproliferativo y promotor de diferenciación celular. Por otro lado, se ha demostrado que Menadiona (MEN), aumenta la sensibilidad de las células neoplásicas a los tratamientos. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del calcitriol y MEN sobre la proliferación de las células de cáncer de mama y evaluar los posibles mecanismos involucrados. Las células de cáncer de mama MCF-7 fueron tratadas con calcitriol 100 nM, MEN 2-10 μ M o con ambas drogas o vehículo (etanol) a diferentes tiempos. La proliferación celular se determinó por la técnica de violeta cristal. El potencial de membrana mitocondrial, la movilización intracelular de calcio y el ciclo celular se evaluaron por citometría de flujo. Se evaluó la formación de organelas vesiculares ácidas (OVAs) por microscopía de fluorescencia. El análisis estadístico se realizó por ANOVA/Bonferroni. Tanto calcitriol como MEN inhibieron la proliferación de las células MCF-7 en forma dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento. El uso de calcitriol combinado con MEN produjo potenciación del efecto antiproliferativo. A las 96 horas, tanto el calcitriol como el tratamiento combinado indujeron arresto del ciclo celular en la fase G₂/G₁. Además se registraron cambios rápidos en la concentración intracelular de calcio y se incrementó la permeabilidad mitocondrial. El aumento de la formación de OVAs sugiere la activación de un proceso de muerte celular. En conclusión, MEN incrementaría el efecto antiproliferativo del calcitriol sobre las células MCF-7 mediante un aumento del estrés oxidativo, modulación del calcio intracelular e inducción de autofagia.

- 296. (329) INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES (GR) Y DE PROGESTÁGENOS (PR) EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS**
Ogara, M. Florencia¹; Soronellas, Daniel²; Nacht, Silvina²; Pecci, Adalí¹; Vicent, Guillermo²

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina¹; Centro de Regulación Genómica (CRG), Barcelona, España²

Los receptores de glucocorticoides (GR) y de progestágenos (PR) comparten características estructurales y de reconocimiento de secuencias similares. Sin embargo, la respuesta biológica resultante de sendos receptores es específica, ejerciendo en muchos casos funciones opuestas en el control de la proliferación, diferenciación y muerte celular, aún en células donde ambos se expresan. En vista de estas observaciones, el objetivo del trabajo fue el de identificar los sitios de unión del PR y del GR en células epiteliales mamarias tumorales humanas T47D-A1/2 derivadas de T47D-wt (que no expresa GR). Las células fueron tratadas durante 1 h con el progestágeno R5020 y/o el glucocorticoide Dexametasona (Dex). Se identificaron, mediante técnicas de secuenciación masiva (ChIP-seqs), 24753 sitios de unión a PR en respuesta a R5020 y 16833 sitios los que unieron GR luego del tratamiento con Dex. Interesantemente, la mayoría de los sitios de unión de ambos receptores se localizan en regiones intragénicas distales de los promotores. Del total de sitios de unión a PR, el 51% son exclusivos de dicho receptor; mientras que del total de sitios de unión a GR, el 27% son exclusivos del mismo, siendo 12229 los sitios con potencial de ser regulados por ambos receptores en forma simultánea. A fin de conocer si la presencia del GR influye sobre la función del PR, se analizó la expresión de genes con sitios de unión compartida. Se observó que la inducción dependiente de R5020 de algunos de estos genes (i.e. SNAI1, CD44, CCDN1, EGF y DUSP1) es mayor en la línea T47D-wt comparada con la T47D-A1/2; mientras que la represión del gen ELF5 mediada por R5020 es menor. Estos resultados correlacionan con la disminución de la proliferación y la desdiferenciación celular mediada por R5020 observada en las células que co-expresan GR. Estos resultados permiten suponer que en células tumorales mamarias la presencia de GR interfiere sobre el proceso de proliferación celular dependiente de PR.

297. (331) ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES ONCO-HEMATOLÓGICAS Y EL TABAQUISMO, HÁBITOS DIETARIOS Y DELECIÓN DE LOS GENES METABOLIZANTES DE XENOBIÓTICOS GSTT1 Y GSTM1
Cerliani, María Belén¹; Gili, Juan A.²; Orlando, Sergio³; Taus, Rosana³; Dalmaroni, Julieta³; Pérez, Mariel³; Klein, Graciela³; Saba, Silvia³; Richard, Silvina¹
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-CONICET, La Plata¹; Laboratorio de Epidemiología Genética, Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC)-CEMIC-CONICET²; Servicio de Hematología y Hemoterapia, UTMO Hospital Prof. Dr. Rodolfo Rossi, La Plata³.

Los polimorfismos en los genes metabolizantes de xenobióticos y los niveles de exposición a sus sustratos, podrían impactar en la susceptibilidad al cáncer. Los genes glutatión S-transferasa M1 y T1 están involucrados en la detoxificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y especies reactivas de oxígeno; son polimórficos (presentan delección) y la ausencia de enzima (genotipo nulo) se asoció a cáncer de pulmón, mama y gastrointestinales, entre otros. Por otra parte, el estilo de vida y los hábitos dietarios constituyen factores de riesgo adicionales. Se conoce poco de los factores de riesgo que desarrollan enfermedades onco-hematológicas, excepto ciertas alteraciones genéticas y exposiciones ambientales. El objetivo de este trabajo fue analizar la asociación entre las enfermedades onco-hematológicas y los polimorfismos en GSTT1/GSTM1, hábitos dietarios y tabaquismo. Para ello, se diseñó un estudio caso-control, con 270 casos y 106 controles, de entre 16 y 89 años. Brevemente, se tomaron muestras de sangre y se les realizó una encuesta a los pacientes que concurren al Servicio de Hematología y Hemoterapia del Htal. Prof. Dr. Rossi (La Plata), previo consentimiento informado. Los genotipos nulos para GSTs se determinaron mediante PCR multiplex y visualización en gel de agarosa, y los análisis estadísticos se realizaron

con STATA 11.1. Respecto del tabaquismo, los ex-fumadores mostraron un aumento en el riesgo de enfermedad (OR=1,72, IC 95% 1,03-2,86, p=0,03). Entre los factores dietarios, el consumo de carnes asadas 3 o más veces/mes se asoció a mayor riesgo de enfermedad (OR=1,95, IC 95% 1,2-3, p<0,01), al igual que el consumo diario de café (OR=2,03, IC 95% 1,14-3,56, p<0,01). No se encontró asociación entre las patologías y el consumo de alcohol o de conservas (enlatados), ni con la delección de GSTM1 o GSTT1. Futuros análisis con un mayor tamaño muestral darán mejores estimaciones del riesgo.

298. (335) CTBP1 ORQUESTA LA ASOCIACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO Y EL CÁNCER DE PRÓSTATA A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE AROMATASA Y BRCA1
Massillo, Cintia Lorena; Porretti, Juliana; Dalton, Nicolás; De Luca, Paola; Moiola, Cristian Pablo; De Siervi, Adriana
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

El síndrome metabólico (SM) se refiere a un grupo de anomalías que incluyen obesidad abdominal, hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión arterial. Previamente se correlacionó el SM con la incidencia y la agresividad del cáncer de próstata (PCa). CtBP1 es un co-represor de la transcripción de genes supresores tumorales, como BRCA1, y es activado por una baja relación de NAD⁺/NADH producida por ingesta de dietas ricas en grasas (DG). Previamente, desarrollamos un modelo de SM alimentando ratones con DG los cuales fueron inoculados con líneas celulares de PCa con expresión disminuida de CtBP1 o la línea control. Utilizando microarreglos de expresión a partir de estos xenotransplantes, encontramos que CtBP1 reprime la expresión de CYP19A1 (aromatasa) que es una enzima que participa en la síntesis de estradiol por la aromatización de la testosterona. En base a estos resultados, nuestro objetivo fue determinar el mecanismo de regulación transcripcional de CYP19A1 y BRCA1 mediado por CtBP1 y las hormonas esteroideas en células de PCa. Para ello utilizamos un panel de líneas celulares de PCa (DU145, PC3, 22Rv1, C4-2 y LNCaP) con diferentes niveles de expresión de CYP19A1, CtBP1 y BRCA1. Determinamos que la testosterona induce la expresión de BRCA1 en PC3 y 22Rv1; mientras que en LNCaP, C4-2 y DU145 reprime su expresión. Al tratar las células con letrozol, un potente inhibidor de la actividad de CYP19A1, encontramos que se pierde el efecto de la testosterona sobre la expresión de BRCA1 en PC3, 22Rv1 y DU145; no mostrando cambios en LNCaP y C4-2. En resumen, nuestros resultados muestran por primera vez la regulación transcripcional de CYP19A1 por CtBP1, sugiriendo que a través de esta regulación CtBP1 podría modular los niveles de hormonas esteroideas impactando no solo en la regulación de la transcripción de genes, sino también teniendo consecuencias sobre la agresividad de los tumores de próstata.

299. (337) EL ÁCIDO RETINOICO INDUCE LA ACTIVACIÓN DE FAK-PAXILLIN-MOESIN Y REDUCE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA
Shortrede, Jorge¹; Sánchez, Ángel Matías¹; Gago, Francisco Eduardo²; Vargasa Roig, Laura María^{1, 2}; Flamini, Marina Inés¹
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET Mendoza¹; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza².

Introducción: El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres siendo las metástasis la causa del 98% de las muertes. La expresión del receptor de ácido retinoico beta (RAR β) se encuentra reducida o ausente en el 50% de los carcinomas de mama invasores, asociándose dicha pérdida con infiltración de ganglios linfáticos. En ensayos previos realizados por nuestro grupo de trabajo observamos que el ácido retinoico (AR), principal ligando de los receptores de ácido retinoico (RAR), participa en el proceso metastásico inhibiendo la migración vía RAR β . Nuestra hipótesis es que el AR tendría, además de los efectos genómicos ya demostrados por nuestro laboratorio, efec-

tos no genómicos a tiempos cortos relacionados con la motilidad y morfología en células de cáncer de mama. Metodología: Se utilizó la línea celular de cáncer de mama T47D para realizar inmunoblottings, ensayos de adhesión e inmunofluorescencia. Resultados: La administración de AR 10^{-6} M a tiempos cortos (10-15 min) produce la activación de las proteínas asociadas con la migración FAK-Paxillina-moesin. Los agonistas selectivos para RAR α y RAR β (BMS753 y BMS453, respectivamente), inducen la fosforilación de FAK-Paxillina-moesin comparable con la activación ejercida por el AR, no siendo así con el agonista del RAR γ ; sugiriendo la participación de RAR α y RAR β en esta vía. Además el tratamiento con AR 10^{-6} M por 15 minutos disminuye significativamente la adhesión celular ($p < 0,05$); pero cuando se tratan las células con AR 10^{-6} M más el inhibidor de FAK, el AR no logra inhibir la adhesión de manera significativa sugiriendo la participación de FAK en la adhesión inhibida por AR. Conclusión: La administración de AR por periodos breves participaría en la adhesión de células de cáncer de mama modulando la activación y relocalización de proteínas implicadas en la migración celular.

300. (338) EFECTO DE LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE HEMO OXIGENASA-1 IN VIVO SOBRE EL CRECIMIENTO DE TUMORES DE PRÓSTATA

Jaworski, Felipe Martín¹; Contrufo, Geraldine¹; Gentilini, Lucas Daniel¹; Gueron, Geraldine¹; González Pérez, Ignacio¹; Rabinovich, Gabriel Adrián^{1,2}; Compagno, Daniel Georges¹; Laderach, Diego José¹; Vázquez, Elba Susana¹ Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²

El cáncer de próstata (CaP) es la afección neoplásica más frecuente y una de las más letales en hombres. La inflamación ha sido reconocida como un factor de riesgo. Nuestros estudios previos sobre la célula tumoral *per se*, demuestran que Hemo Oxigenasa-1 (HO-1) emerge como mecanismo homeostático celular ante procesos inflamatorios. En el presente trabajo analizamos el rol de HO-1 en células del estroma. Condicionamos el estroma inyectando ratones C57BL/6 en forma s.c. con 200 μ l de hemina 30 μ M (inductor de HO-1) o su vehículo PBS, los días -8, -5 y -1 respecto al desafío s.c. con 2×10^6 células tumorales murinas isogénicas TRAMP-C1 en matrigel. Los animales pre-tratados con hemina exhibieron un aumento significativo en el tiempo de latencia tumoral (12 días; $p < 0,01$) y una disminución significativa en la tasa de crecimiento tumoral ($p < 0,05$). Dado que ensayos previos de proliferación linfocitaria *in vitro* revelaron que el tratamiento con hemina aumenta los niveles de proliferación linfocitaria, se analizaron distintos parámetros inmunológicos efectuando una inmunofenotipación por citometría de flujo de los ganglios linfáticos, el bazo y los tumores. Se hallaron diferencias significativas sistémicas en la frecuencia de células y grado de activación de los linfocitos T CD8⁺ ($p < 0,05$) así como en la frecuencia de células mieloides Gr-1⁺ ($p < 0,01$). Teniendo en cuenta que la alteración de parámetros vasculares podría explicar nuestras observaciones, se estudió por RT-qPCR el perfil de expresión de diferentes genes vinculados al proceso angiogénico (VEGF, FGF β , TIMP-1, CD142, uPA, TSP-1 y Gal-1), únicamente encontrándose una disminución significativa en la expresión de Gal-1 en los tumores desarrollados en animales pre-tratados con hemina ($p < 0,01$). Estos resultados demuestran que la modulación farmacológica de HO-1 en el estroma impacta en la progresión tumoral del CaP y postulan a las interacciones galectinas/glicanos como potenciales mediadores de estos fenómenos.

301. (341) ESTUDIO MOLECULAR DE LA ASOCIACIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA Y EL SÍNDROME METABÓLICO A TRAVÉS DE CTBP1 COMO MODULADOR DE LA EXPRESIÓN DE GENES

Moiola, Cristian Pablo¹; De Luca, Paola¹; Rodríguez-Seguí, Santiago A²; Dalton, Nicolás¹; De Siervi, Adriana¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Instituto de Fisiología, Biología Molecular y

Neurociencias (IFIBYNE-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires².

El síndrome metabólico (SM) emerge como un factor importante en la etiología del cáncer de próstata (PCa) ya que es capaz de modular las vías de señalización por hormonas, insulina e IGF. Asimismo, los niveles de NAD (H) se ven afectados por exceso de nutrientes en la dieta. La proteína CtBP1, un co-represor transcripcional de genes supresores tumorales, es considerado sensor del estado metabólico celular, pues es activado por unión a NADH. Nuestro objetivo fue investigar el rol de CtBP1 en el desarrollo de PCa en un modelo murino de SM. Previamente demostramos que CtBP1 tiene características oncogénicas ya que aumenta la proliferación celular y su expresión correlaciona con un menor grado de diferenciación en tumores de próstata. Además, ratones inoculados con células PC3 que tienen silenciada la expresión de CtBP1 y alimentados con una dieta rica en grasa, mostraron una disminución significativa del volumen tumoral respecto a los inoculados con células control. Para estudiar las vías moleculares asociadas a CtBP1 que provocaron la disminución del crecimiento tumoral en estos ratones, utilizamos ARN de tumores y analizamos la expresión de genes mediante microarreglos Affymetrix HuGene 1.0ST. Identificamos expresión diferencial de 823 genes (veces de cambio > 1.5). Por análisis de ontología molecular determinamos que estos genes están involucrados en procesos de adhesión, metabolismo, ciclo celular, proliferación, apoptosis y comunicación celular. Utilizando *GeneSet Enrichment Analysis* hallamos sobre-representados grupos de genes implicados en diversas vías moleculares como: de señalización olfatoria (OR5P2, OR4C45, GUC1C, CLCA3), asociados al desarrollo de metástasis (CDH1, CDH3, COL17A1, ITGB4, etc), secreción de hormonas (INHA), citoquinas y quimoquinas (CCL20, CCL26, IL18RAP, IL2RB, etc), entre otras categorías. Estos resultados asocian por primera vez al SM y el PCa definiendo nuevas vías moleculares para la comprensión en la progresión del PCa.

302. (344) LA PROTEÍNA CTBP1 ALTERA LA ADHESIÓN CELULAR EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO Y CÁNCER DE PRÓSTATA

Dalton, Nicolás; Moiola, Cristian Pablo; De Luca, Paola; De Siervi, Adriana Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

El síndrome metabólico (SM) es un grupo de factores de riesgo para una gran variedad de enfermedades, entre las cuales se encuentra el cáncer de próstata. En nuestro laboratorio hemos establecido un modelo de SM producto de la alimentación de ratones con una dieta rica en grasas (DG). C-terminal binding protein (CtBP1), un correpresor transcripcional, es considerado un sensor del estado metabólico celular ya que es regulado por NADH. En condiciones de alta energía, es decir en presencia de una baja relación NAD/NADH, que puede surgir como consecuencia de una DG, esta proteína dimeriza, se activa y media la represión transcripcional de varios genes, muchos de ellos supresores tumorales. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el silenciamiento de CtBP1 en tumores inoculados como xenotransplantes en ratones con SM, disminuye drásticamente el crecimiento tumoral. A partir de microarreglos de expresión de los tumores xenotransplantados realizamos un estudio de Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Identificamos enriquecimiento de un grupo de genes asociados con "adhesión celular" y "unión celular": PRSS2, TGM2, SIRPG, ARHGAP, ITGB4, CDH1, COL17A1, CDH3, GJB3, GJB5, GJA5. En este trabajo nos advocamos a la validación funcional y por RT-qPCR de los resultados obtenidos en el microarreglo. Comprobamos que el silenciamiento de CtBP1 lleva a una mayor expresión de genes como PRSS2, CDH1, CDH3 e ITGB4. Además, evaluamos la capacidad de las células de cáncer de próstata (PC3) que tienen aumentada o disminuida la expresión de CtBP1 en forma estable de adherirse a una matriz de colágeno. Estos ensayos de adhesión mostraron que una mayor expresión de CtBP1 limita la capacidad de estas

células de adherirse a dicha matriz. Estos resultados muestran por primera vez que CtBP1 tiene un rol importante en la regulación de la adhesión celular y sugiere una nueva función como regulador de etapas tempranas de la transición epitelio mesenquimal.

303. (345) ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE HO-1 EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Brandani, Javier Nahuel; Leonardi, Daiana Beatriz; Gueron, Geraldine; Vázquez, Elba; Cotignola, Javier
Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (QUIBICEN)-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

En la Argentina, el cáncer de próstata es el más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer entre los hombres. La enzima hemo oxigenasa 1 (HO-1) es responsable de la degradación del grupo hemo y se encuentra involucrada en la tumorigénesis prostática. Estudios sobre los niveles de expresión de HO-1 en líneas tumorales prostáticas sensibles a andrógenos (LNCaP, MDA PCa2b) muestran alta expresión de esta proteína, mientras que líneas insensibles a andrógenos (PC3) tienen baja expresión de la enzima. Considerando que existe escasa información sobre la regulación transcripcional de HO-1, nuestro objetivo fue estudiar si las diferencias en la expresión génica se deben a cambios epigenéticos. Realizamos ensayos in vitro utilizando las líneas LNCaP y PC3 como modelos de diferente sensibilidad a hormonas. Los cultivos celulares fueron tratados con el agente desmetilante 5-azacitidina (0 μ M, 2 μ M y 5 μ M) durante 72 h. La expresión génica de HO-1, NRF2 (factor de transcripción de HO-1) y KEAP1 (regulador negativo de NRF2) se analizó por RT-qPCR. En PC3 se observó que el tratamiento con 5-azacitidina 5 μ M redujo un 75% los niveles de HO-1 ($p=0,02$), 70% los de NRF2 ($p=0,02$) y 45% los de KEAP1 ($p=0,1$). En LNCaP el mismo tratamiento redujo un 30% la expresión de HO-1 ($p=0,17$). A diferencia de PC3 se observó un aumento en la expresión de NRF2 y KEAP1 (80% y 190%, respectivamente). Debido a que existe interacción entre NRF2 y KEAP1, analizamos la relación de la expresión génica de ambos y encontramos que en las dos líneas celulares ésta se mantenía a favor KEAP1, avalando la disminución observada en los niveles de HO-1. Los resultados muestran que la expresión de HO-1 no estaría dada por modificaciones epigenéticas propias, sino por alteraciones en la metilación de los genes NRF2 y KEAP1. Estos resultados garantizan el estudio de la vía de regulación de HO-1 en cáncer de próstata para caracterizar la biología de estos tumores.

304. (353) RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HACIA TUMORES LINFOBLÁSTICOS Y MODULACIÓN EJERCIDA POR HORMONAS TIROIDEAS

Amorós, Mariana A.¹; Gutiérrez, Luciana M.²; Cayrol, Florencia³; Díaz Flaque, María C.⁵; Sevelev, Gustavo³; Cerchietti, Leandro⁴; Podhajcer, Osvaldo²; Cremaschi, Graciela⁵; Bolontrade, Marcela F.^{2,1}
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Fundación Instituto Leloir-CONICET²; FLENI³; Weill Cornell Medical College of Cornell University, New York, USA⁴; Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET, Pontificia Universidad Católica Argentina⁵

Establecimos un xenomodelo de leucemia linfoblástica (T-ALL) utilizando la línea CUTLL1. La progresión tumoral en enfermedades hematológicas está modulada por factores microambientales entre ellos células estromales que regulan a las neoplásicas. Demostramos que las Células Madre Mesenquimales (MSC) migran hacia tumores CUTLL1 incorporándose como células estromales. Dentro de la complejidad de factores del microambiente tumoral que favorecerían la progresión existe evidencia de efectos de hormonas tiroideas (HT, T3 y T4) sobre el crecimiento tumoral. En cuanto al componente estromal tumoral aportado por MSC no está claro el rol de estas en la progresión. Evaluamos el aporte modulador de las HT sobre las MSC. Las HT ejercen sus ac-

ciones biológicas a través de su unión a receptores nucleares aunque también activando receptores de membrana como la integrina $\alpha\beta3$. Demostramos que las MSC expresan receptores nucleares para TH, $THR\beta$ y $THR\alpha$ así como también integrinas $\alpha\gamma$ y $\beta3$ con niveles de expresión mayores en comparación con tipos celulares que responden a HT como HMEC1 (valores de RT-qPCR normalizados con B2M: ITGAV 13,40 \pm 1,06 vs 0,67 \pm 0,13; ITGB3 4,9 \pm 1,9 vs 0,46 \pm 0,28, $THRa$ 6,18 \pm 2,53 vs 0,14 \pm 0,06 para MSC y HMEC1 respectivamente, $p<0,0001$; $THRb$ 13,37 \pm 5,72 para MSC). El secretoma de CUTLL1 tratadas con concentraciones fisiológicas de HT aumentó la migración de MSC (536,79 \pm 125,1 vs 368,11 \pm 22,87 células/campo con y sin hormonas respectivamente, $p<0,001$), a la vez que la estimulación de MSC con HT aumentó su migración hacia estímulos quimiotácticos tumorales. Esto sugiere que las HT modularían tanto indirecta como directamente a las MSC a través de un incremento en su capacidad migratoria hacia el tumor. Esto impactaría el conocimiento actual sobre los mecanismos que modulan el comportamiento de las MSC en el tumor, aportando un mecanismo novedoso de regulación de la progresión tumoral inducida por factores endócrinos presentes en el microambiente de dicho tumor

305. (358) MELANOMA UVEAL: VALOR PRONÓSTICO DEL ESTUDIO MOLECULAR POR MLPA

Luce, Leonela Natalia¹; Szijan, Irene¹; Croxatto, Juan Oscar²; Giliberto, Florencia¹
Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Fundación Oftalmológica Argentina Jorge Malbrán²

El melanoma uveal constituye el principal cáncer ocular en el adulto (3 a 7 casos por millón de habitantes/año). El origen de la patología no se relaciona con la exposición a la luz ultravioleta sino a causas genéticas. El 50% de los pacientes desarrolla enfermedad metastásica fatal, raramente detectado durante el tratamiento del tumor intraocular principal. La enfermedad metastásica se observa exclusivamente en pacientes cuyos tumores presentan pérdida de un cromosoma 3. También se ha descrito la ganancia 8q asociada a un mal pronóstico, la ganancia 6p a un buen pronóstico y la pérdida 1p a un pobre valor pronóstico. El objetivo del trabajo consistió en analizar la ganancia o pérdida de fragmentos cromosómicos implicados en la prognosis de pacientes con melanoma uveal mediante MLPA. Las muestras de tumor intraocular provenían de biopsias por enucleación de 7 pacientes con diagnóstico de melanoma uveal. Se extrajo DNAg y se analizó por MLPA (SALSA probemix P027 MRC-Holland). Se analizaron los resultados mediante el software Coffalyzer. De las 7 muestras analizadas, 6 presentaron alteraciones cromosómicas:

- Paciente 1: pérdida cromosoma 3; ganancia 8q; pérdida 6q y pérdida 1p.
- Paciente 2: pérdida cromosoma 3; ganancia 8q y pérdida 8p.
- Paciente 3: pérdida 3q; ganancia 8q y pérdida 6q.
- Paciente 4: ganancia 8q y ganancia 6p.
- Paciente 5: pérdida cromosoma 3; ganancia cromosoma 8 y pérdida de 1p.
- Paciente 6: ganancia de 8q.

La pérdida del cromosoma 3 y ganancia del brazo 8q en 3 pacientes, se correlaciona con un mal pronóstico de alto riesgo de desarrollo de enfermedad metastásica. Otros 3 pacientes, con ganancia 8q se asociaron a un mal pronóstico de la patología. El paciente 3, pese a portar también una pérdida parcial del cromosoma 3, aún no existen datos reportados suficientes que permitan establecer su implicancia pronóstica. La muestra restante no presentó ninguna alteración cromosómica por MLPA, lo cual se correlaciona con un buen pronóstico. En conclusión, el MLPA resultó una herramienta útil para detectar las alteraciones cromosómicas de alto valor pronóstico. La significancia clínica será evaluada con el transcurso del desarrollo fisiopatológico de cada paciente. Debe destacarse que este es el primer trabajo de detección pronóstica para melanoma uveal por MLPA en Argentina.

306. (365) ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL INTERACTOMA DE HEMO-OXIGENASA 1 (HO-1) EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Ortiz, Emiliano Germán¹; Páez, Alejandra¹; Giudice, Jimena⁴; Valacco, Pía³; Cortignola, Javier¹; Martí, Marcelo²; Vázquez, Elba¹; Gueron, Geraldine¹

Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI TOF (CEQUIBIEM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³; Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA⁴

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por esta enfermedad en los hombres occidentales. La integración de la proteómica junto con las nuevas herramientas bioinformáticas provee de resultados promisorios que pueden trasladarse a la clínica del PCa. Con estos abordajes experimentales nuestro objetivo fue identificar a los interactores de HO-1, enzima responsable del mantenimiento de la homeostasis celular. Para identificar las proteínas que interactúan con HO-1 se realizó un GST-pull down. HO-1 fue subclonada en un vector de expresión eucariota (pEBG) fusionado por su extremo amino terminal a un tag de GST para permitir la purificación por columna de afinidad. Con esta construcción, transfectamos la línea celular PC3. Para el análisis por MALDI-TOF/TOF, los péptidos fueron desalados y concentrados con una resina C18 y analizados utilizando el software Flex Analysis and Biotoools. Las búsquedas fueron realizadas contra el genoma humano, permitiendo una tolerancia de 200ppm y una tolerancia de fragmento de 0,7 Da. Se contemplaron las alteraciones de masa producidas por las modificaciones esperadas como la carbamidometilación, la oxidación de metionina y la acetilación N-terminal. Solo proteínas diferenciales unidas a GSTHO-1 fueron consideradas para su posterior análisis. Se obtuvieron 46 proteínas diferenciales, interactoras de HO-1, definiendo así el interactoma de HO-1 preliminar. Para este set de proteínas realizamos un análisis de red de interacciones y un análisis de ontología génica. Los resultados revelaron un enriquecimiento de proteínas asociadas a varias subcategorías relacionadas con componentes celulares, funciones moleculares y procesos biológicos. La detección de proteínas nucleares asociadas a HO-1 sugiere que el interactoma de HO-1 funciona como una maquinaria transcripcional y de procesamiento del RNA responsable de la modulación de los genes efectores de HO-1

307. (370) INCORPORACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENCQUIMALES EN ZONAS DE METÁSTASIS PULMONARES EN UN MODELO DE OSTEOSARCOMA

Gutiérrez, Luciana M.²; Amorós, Mariana A.¹; Sevlever, Gustavo³; Rotondaro, Cecilia¹; García, Mariana G.²; Mazzolini, Guillermo²; Podhajcer, Osvaldo¹; Bolontrade, Marcela F.¹
Fundación Instituto Leloir-CONICET¹; Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral²; FLEN³

El pulmón es el sitio metastásico más común en pacientes con osteosarcoma con la mayoría presentando micrometástasis pulmonar al diagnóstico. Pusimos a punto un xenomodelo de osteosarcoma con metástasis pulmonar. Células LM7 seleccionadas por su alta capacidad metastásica fueron inyectadas (1×10^6 células, iv) en ratones inmunosuprimidos. Luego de 10 semanas post-inoculación las metástasis pulmonares alcanzaron tamaño microscópico. Las Células Madre Mesenquimales (MSC) componen una población heterogénea con habilidad para migrar y alojarse en tejidos en remodelación incluyendo tumores. De modo de evaluar la participación de las MSC en la formación de metástasis pulmonares, MSC pre marcadas (DiR+/CMDiI+) fueron inyectadas ($0,5-1 \times 10^6$ células, iv) en la décima semana post-inoculación de LM7. Se evaluó la presencia de MSC en pulmón mediante visualización en tiempo real (DiR+) y posterior visualización microscópica (CMDiI+). El nivel de MSC en pulmones una semana post-inoculación de las mismas en ratones con metástasis pulmonar fue de $1,15 \times 10^5 \pm 0,07$ p2/sec/cm2/sr vs

$5,44 \times 10^4 \pm 0,5$ p2/sec/cm2/sr en pulmones de ratones sin metástasis (señal infrarroja, $p < 0,01$). Esto es indicativo de una alta capacidad de arribo de las células estromales en el microambiente aportado por células neoplásicas. A su vez las MSC presentaron una distribución heterogénea dentro de pulmones con metástasis en contraste con la distribución homogénea de MSC observada en pulmones sin metástasis. Esto sugiere que las MSC serían retenidas y/o quimioatraídas en áreas de migración preferencial dentro del pulmón con metástasis, a diferencia de MSC retenidas inmediatamente post-inoculación y alojadas inicialmente en pulmones sin presencia de metástasis. El análisis microscópico corroboró señal infrarroja con presencia de MSC e incorporación de MSC en sitios de metástasis. La puesta a punto y utilización de este modelo es de gran utilidad para estudiar la participación de las MSC en la diseminación tumoral

308. (379) ROL DE GALECTINA-3 Y -8 EN EL PROCESO METASTÁSICO EN CÁNCER DE PRÓSTATA.

Gentilini, Lucas Daniel¹; González Pérez, Ignacio¹; Jaworski, Felipe Martín¹; Conrufo, Geraldine¹; Gustavo, Carrizo¹; Chachereau, Anne²; Laderach, Diego¹; Compagno, Daniel¹
Laboratorio de Glicómica Estructural y Funcional, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; INSERM U981, Villejuif, Francia²

El cáncer de próstata (CaP) es un problema mayor de salud a nivel mundial por ser el segundo tipo de cáncer en hombres (IARC, WHO). Los tratamientos actuales son eficaces contra los tumores de próstata localizados. Sin embargo, entre un 15 y 20% de los pacientes evolucionan hacia fases avanzadas metastásicas para las que aún no hay tratamientos eficaces. Es por ello que se requieren métodos alternativos de prevención de la metástasis. El objetivo de este trabajo es investigar el rol de las galectinas (Gal's) en el desarrollo de metástasis en CaP. Hemos encontrado que una línea de CaP humana con baja expresión de Gal-3 y -8 presenta deficiente capacidad migratoria y tumorigénica, evidenciando un posible rol de dichas proteínas en los procesos mencionados. Por ello desarrollamos estudios *in vitro* e *in vivo* con líneas celulares de CaP, IGR-CaP1 (humana) y TRAMP-C1 (murina) silenciadas para Gal-3 o Gal-8 (KD). Estudios *in vitro* mostraron una disminución en la capacidad migratoria de ambas líneas IGR-CaP1 KD ($p < 0,002$). La capacidad proliferativa de la línea KD para Gal-3 se vio reducida al compararla con la línea control ($p < 0,02$). La tumorigenicidad en ratones *nude* no se alteró al disminuir la expresión de estas Gal's, pero sí lo hizo la incidencia de metástasis a ganglio linfático (GL) (100% en el control vs. 37% obtenidas con las células KD de Gal-3 y 0% en con las KD de Gal-8). En el caso de Gal-3, utilizamos el modelo TRAMP-C1 para desafiar los resultados encontrados en un contexto inmunocompetente. *In vitro*, las células KD para Gal-3 mostraron una deficiencia a nivel migratorio ($p < 0,0002$), no así a nivel proliferativo. La capacidad tumorigénica disminuyó en un 65% en las células KD y la incidencia de metástasis a GL disminuyó en un 42%. Los resultados encontrados muestran el rol preponderante de las Gal -3 y -8 en el desarrollo de metástasis en CaP, evidenciándolas como blancos de estudio para tratamientos aplicables a fases avanzadas de la enfermedad.

309. (390) EFECTOS ANTITUMORALES Y ACTIVIDAD CAL-CÉMICA DE UN NUEVO ANÁLOGO DE LA VITAMINA D3

Ferronato, María Julia¹; Salomón, Débora Gisele¹; Obiol, Diego Javier¹; Fermento, María Eugenia¹; Alonso, Eliana Noelia¹; Gandini, Norberto Ariel¹; Arévalo, Julián²; Fall, Yagamare³; Curino, Alejandro Carlos¹; Facchinetti, María Marta¹
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET, Bahía Blanca¹; Servicio de Patología del Hospital Interzonal de Agudos Dr. José Penna, Bahía Blanca²; Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Vigo, España³

El calcitriol presenta acciones antineoplásicas sobre varios tipos de cáncer pero su utilidad como agente antitumoral es limitada debido a su actividad hipercalcemiante. En el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Vigo se ha sintetizado un nuevo análogo de calcitriol de tipo Gemini, el UVB1, que ha demostrado tener efectos antitumorales sobre varias líneas de cáncer y no poseer efectos hipercalcemiantes. A partir de estos resultados, el objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad del UVB1, en especial el efecto calcémico a una dosis mayor y por un lapso prolongado de tiempo, y comenzar a evaluar el mecanismo por el cual el análogo ejerce su efecto antitumoral. Dado que se conoce que el calcitriol ejerce su acción antiproliferativa mediante la generación de ROS, la producción de los mismos fue determinada por medio de la sonda DCDCDHf en la línea HN13 (CCECC). Se observó un aumento de los niveles de ROS luego del tratamiento con el análogo ($p < 0,05$). El estudio del ciclo celular por citometría de flujo con marcación con IP reveló un aumento de células HN13 en la fase G0/G1 luego del tratamiento con el análogo ($p < 0,001$). Esta acumulación de células en la fase G0/G1 fue acompañada de una disminución de ciclina D1. Dado que el UVB1 disminuyó la migración celular en la línea LM3 (adenocarcinoma mamario murino) se evaluó la formación de las fibras de estrés mediante marcación de los filamentos de actina con faloidina rodaminada, encontrándose una disminución de las mismas ($p < 0,001$). Los ensayos de calcemia en ratones N: NIH(S)-Fox1^{nu} (dosis de 40 µg/Kg durante 21 días) mostraron que el nuevo análogo no provoca hipercalcemia. En los cortes histológicos de hígado y riñón teñidos con H-E no se observaron alteraciones tisulares, tampoco se evidenciaron cambios en el hematocrito ni pérdida de peso en los animales. En conclusión, los resultados aportan evidencia significativa sobre el potencial uso terapéutico de este nuevo análogo como droga antitumoral.

310. (391) EFECTOS ANTITUMORALES DE LA FRACCIÓN DEL DEL MAITAKE (*GRIFOLA FRONDOSA*) EN CÁNCER DE MAMA

Alonso, Eliana Noelia¹; Obiol, Diego Javier¹; Ferronato, María Julia¹; Fermento, María Eugenia¹; Salomón, Débora Gisele¹; Gandini, Norberto Ariel¹; López Romero, Alejandro²; Facchinetti, María Marta¹; Curino, Alejandro Carlos¹ *Laboratorio de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET, Bahía Blanca¹ Laboratorio de Citometría, IACA Laboratorios, Bahía Blanca²*

La Fracción D es un extracto de proteoglicanos obtenido del hongo medicinal *Grifola frondosa* (Maitake). Su efecto antitumoral es atribuido principalmente a la capacidad inmunomoduladora. En este trabajo nos proponemos demostrar que la Fracción D es capaz de actuar también directamente sobre células tumorales mamarias LM3 y MDA-MB 231, ejerciendo efectos antitumorales en dichas células. Además, pretendemos evaluar el efecto de la Fracción D sobre células mamarias murinas HC11 como contraparte celular normal. Para alcanzar los objetivos propuestos se realizaron ensayos de viabilidad (WST-1) y posterior conteo manual, se analizó por citometría de flujo las diferentes subpoblaciones celulares, se efectuaron ensayos de migración e invasión celular y se examinó las fibras de estrés mediante marcación de los filamentos de actina. En primera instancia, observamos que la Fracción D disminuyó de manera dosis dependiente la viabilidad y el número de células MDA-MB 231 y LM3, en comparación con su vehículo ($p < 0,001$). El aumento de la población de células en subG0/G1 producido por la Fracción D sobre ambas líneas ($p < 0,01$) sugirió la inducción de muerte celular. A diferencia del efecto observado sobre las líneas tumorales, la Fracción D no afectó la viabilidad de células normales HC11. Por otro lado, el tratamiento de las células MDA-MB 231 y LM3 con su correspondiente IC50 disminuyó la capacidad migratoria de ambas líneas ($p < 0,001$) y la capacidad invasiva de las MDA-MB 231 ($p < 0,001$). En correlación con este resultado, observamos una disminución de fibras de estrés en las células MDA-MB 231 tratadas con la Fracción D ($p < 0,001$). En conclusión, los resultados sugieren que la Fracción D es capaz de disminuir las capacidades de una célula

tumoral que favorecerían el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica: tales como la viabilidad celular, la migración e invasión. A su vez, se observa un potencial efecto diferencial de la Fracción D hacia células normales.

311. (395) ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE HEMOXIGENASA-1 (HO-1) EN LAS CARACTERÍSTICAS INVASIVAS DEL CÁNCER DE MAMA

Gandini, Norberto Ariel¹; Arévalo, Julián²; Fermento, María Eugenia¹; Andrés, Nancy Carolina¹; Facchinetti, María Marta¹; Curino, Alejandro Carlos¹ *Laboratorio de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET, Bahía Blanca¹; Servicio de Patología, Hospital Dr. José Penna, Bahía Blanca²*

La invasión celular implica modificaciones de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. La E-cadherina (E-cadh) y β -catenina (β -cat) participan como proteínas de anclaje epitelial célula-célula y se han visto desreguladas en el cáncer de mama (CM). Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran un rol de HO-1 en la progresión del cáncer de mama. En este trabajo nos propusimos estudiar el rol de esta enzima en la modulación de estas proteínas y en la regulación de la migración e invasión celular. En biopsias humanas de CM demostramos mediante inmunohistoquímica (IHQ) que existe una correlación positiva entre la expresión de HO-1 y de E-cadh ($p = 0,0144$; Test de Spearman). En la línea celular de CM murino LM3 demostramos mediante inmunofluorescencia y western blot un aumento de la expresión de E-cadh y β -cat ($p < 0,05$, Chi cuadrado) luego del tratamiento con hemina (activador de HO-1). Estos resultados fueron confirmados mediante sobreexpresión estable de HO-1 en la línea de CM humano T47D. Además, comprobamos que la modulación farmacológica de HO-1 con hemina en LM3 provoca disminución en la migración celular (ensayos de herida; $p = 0,003$, ANOVA) y en la invasión celular (ensayos en matrigel; $p = 0,0001$, test de Student). En un modelo murino de trasplante sintético de células LM3 demostramos mediante IHQ que el tratamiento de los animales con hemina se asocia a un aumento de la expresión de E-cadh (IRS=6 vs IRS=3,5 del control; $p = 0,026$, Mann Whitney test). En conclusión, estos resultados indican que HO-1 puede contrarrestar el fenotipo invasivo en cáncer de mama.

312. (409) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL A LA CO-INYECCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENCQUIMALES DERIVADAS DE CORDÓN UMBILICAL

García, Marcela N¹; Luzzani, Carlos²; Inda, Ana M¹; Andrini, Laura¹; Martínez, Marina¹; Miriuka, Santiago^{1,2,3}; Errecalde, Ana L¹ *Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata¹; LIAN FLENI Escobar²; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³*

Las células madre mesenquimales (CMM) tienen un efecto relevante en la biología tumoral. Las CMM son un importante componente del microambiente tumoral, por lo que se han convertido en foco de atención para nuevas terapias anticancerígenas. Nos hemos interesado en el efecto que las CMM de cordón umbilical (CMMCU) podrían tener sobre el desarrollo de los tumores sólidos, ya que los resultados publicados por diversos autores son contradictorios. El objetivo del presente trabajo es evaluar los efectos de la co-inyección de CMMCU y células tumorales (CT) de un carcinoma mamario en ratones. Se utilizaron ratones machos de la cepa C3HS que se dividieron en 3 grupos: co-inyección de ambos tipos celulares (grupo CMMCU+CT); inyección de CT (grupo CT); e inyección solo de CMMCU (grupo CMMCU). Observamos que en los ratones del grupo CMMCU+CT el carcinoma apareció significativamente antes que en el grupo CT, mientras que en el grupo CMMCU no se observó la aparición de tumores durante todo el tiempo de desarrollo del estudio (2 meses). Además, la velocidad de crecimiento de los tumores sólidos fue más rápida en el grupo CMMCU+CT que en el grupo CT. Los tumores del grupo CT alcanzaron su máximo volumen de desarrollo todos juntos,

mientras que los del grupo CMMCU+CT lo hicieron de manera más dispersa. Durante la extracción observamos que los tumores del grupo CMMCU+CT se presentaron bien encapsulados, sin úlceras en la piel adyacente, al corte estos tumores presentaron una menor cantidad de zonas necróticas o de lisis tumoral que los del grupo CT. Por último, realizamos tinciones histológicas para marcadores de angiogénesis y observamos una mayor generación de microvasculatura en el grupo CMMCU+CT. Estos resultados estarían evidenciando que la co-inyección de las CMMCU y CT tendría un efecto acelerador en el crecimiento tumoral y de mejoría en la perfusión del tumor.

313. (411) REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA PROGRESIÓN TUMORAL POR 17- β ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN TUMORES MAMARIOS Y DE COLON DE RATAS OVARIETOMIZADAS

Sasso, Corina Verónica¹; Santiano, Flavia Eliana¹; Campo Verde Arbocco, Fiorella²; Semino, Silvana Noemi³; Pistone Creydt, Virginia¹; López Fontana, Constanza Matilde¹; Carón, Rubén Walter¹

Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza¹; Laboratorio de Reproducción y Lactancia, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza²; Anatomía Patológica, Hospital Universitario, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza³

Estudios epidemiológicos sugieren que la terapia de reemplazo hormonal con análogos sintéticos de los esteroides ováricos en mujeres menopáusicas incrementa el riesgo de cáncer de mama (CaM) y disminuye el de cáncer de colon (CaCo). En este trabajo estudiamos el efecto de los esteroides ováricos fisiológicos sobre ambos tipos de cáncer en un modelo animal. Para ello, analizamos las diferencias entre el tratamiento individual o combinado con 17- β estradiol (E2) y progesterona (P4) sobre la progresión de tumores mamarios inducidos con Dimetilbenzantraceno (DMBA) y de tumores de colon inducidos con Dimetilhidracina (DMH) en ratas ovariectomizadas (OVX). En el día 0 de experimento un grupo de ratas hembras Sprague Dawley fue tratado con una dosis de DMBA (15 mg/rata, p.o.) y otro grupo con 20 dosis de DMH (21 mg/kg, s.c., una dosis por semana). En el día 30 fueron OVX y una semana después se inició la terapia de reemplazo hormonal con inyecciones s.c. dos veces a la semana de E2 (60 μ g/kg), P4 (10 mg/kg), E2+P4 o vehículo (V, aceite vegetal). Los niveles séricos de E2 y P4 alcanzaron valores fisiológicos al momento del sacrificio y los tumores fueron clasificados como carcinomas mamarios ductales, y adenocarcinomas de colon. El E2 redujo un 29% la incidencia del CaCo ($p < 0,05$), mientras que aumentó un 90% del CaM ($p < 0,0001$). Además se observó una menor multiplicidad y un aumento en las figuras mitóticas en tumores de colon con E2, mientras que en CaM se vio el efecto contrario ($p < 0,05$). La P4 produjo una incidencia del 22% en CaM, mientras que en CaCo fue del 100%, y al combinarse ambas hormonas, predominó el efecto del E2 produciendo CaM en un 75% de las ratas. En cambio en CaCo predominó el efecto de la P4, ya que el 100% desarrolló tumores, y estos presentaron la mayor cantidad de figuras apoptóticas ($p < 0,05$). Concluimos que tanto el E2 como la P4 ejercen diferentes efectos según el origen del tumor, y esto puede deberse a la expresión diferencial de sus receptores.

314. (414) ALTERACIONES CELULARES EN UN MODELO TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN HUMANO LUEGO DE LA APLICACIÓN DE ALA-TFD

Teijo, María Julieta^{1,2}; Meiss, R³; Batlle, A¹; Fukuda, H.^{1,2} Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET, Universidad de Buenos Aires¹; Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina³

La administración de ácido 5-aminolevulínico (ALA) induce acumulación de porfirinas fotoactivas; la iluminación adecuada

produce especies reactivas de oxígeno que llevan a la muerte celular, base de la Terapia Fotodinámica del cáncer (TFD). Los esferoides multicelulares (EMCs) son un modelo *in vitro* 3D útil para el estudio de terapias antitumorales independiente de la vasculatura. Se utilizó la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón humano. Sembrando 5×10^4 cél/ml sobre agar 3%-RPMI (1:1) se obtuvieron esferoides compactos de 100-700 μ m a los 7 días. Los EMCs se incubaron 3h con ALA 1mM y se irradiaron con 2 tubos fluorescentes. La síntesis de porfirinas ($0,09 \pm 0,1$ pg/cel) no varió significativamente con el cultivo en monocapa ($0,109 \pm 0,1$ pg/cel). Su distribución en los distintos planos del esferoide es uniforme (microscopía confocal). La viabilidad celular post TFD (ensayo de fosfatasa ácida), indicó un corrimiento de 2 min de la DL_{50} para los EMCs. El fotodaño visualizado mediante diferentes métodos: tinción con NA/BE, Hoechst y H/E, mostró aumento de la granularidad del citoplasma, gran cantidad de núcleos condensados y con tinciones atípicas, pérdida de compactación de la estructura del EMC con desprendimiento de células muertas de la superficie. La tinción para mucopolisacáridos de secreción (PAS) indicó en EMCs no tratados fuerte marcación que se pierde luego de la TFD. La inmunodetección de Ki67, mostró en EMCs control un gradiente de células proliferativas desde la periferia hacia el centro. En los tratados, las células positivas se restringen a la periferia con morfología relativamente conservada. La expresión de HIF1 α fue moderada y heterogénea con localización nuclear en EMCs control, la que se pierde con 10 y 20 min de irradiación. Los resultados muestran que la estructura interna y la diferenciación de las células en el EMC se ven alteradas por la TFD-ALA, señalando que el efecto no es únicamente superficial, sino también en las capas internas.

315. (417) LA ACTIVACIÓN β -ADRENÉRGICA INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS NO TUMORALES DE MAMA HUMANA MCF-10^a

Gargiulo, Lucía¹; May, María¹; Rivero, Ezequiel¹; Davio, Carlos²; Luthy, Isabel¹; Bruzzzone, Ariana¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²

La glándula mamaria normal contiene tres tipos de lóbulos (tipo 1, 2 y 3) de acuerdo a su complejidad, definido por el número de brotes por lóbulo. El desarrollo se completa al final del embarazo y posterior lactancia donde los lóbulos progresan del tipo 2 al 3. Esto se asocia a una reducción de la susceptibilidad de las células epiteliales a la transformación maligna. En trabajos anteriores demostramos que la activación de los receptores β -adrenérgicos con isoproterenol (Iso) induce un fenotipo más benigno en células tumorales y no tumorales de mama humana (disminución de la proliferación y migración celular y un aumento de la adhesión). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del Iso sobre la diferenciación de células de mama humana no tumorales MCF-10A y de células tumorales MCF-7 en cultivo tridimensional (3D). Se sembraron 5000 células/well sobre una capa de Matrigel, y se estimuló durante 2 semanas con Iso (1 μ M) o forskolina (Fk 10 μ M). Se realizó marcación del citoesqueleto con faloidina y de núcleos con ioduro de propidio. Las células tumorales MCF-7 no formaron ductos, sino mamosferas. Se pudo determinar que el tratamiento con Iso aumenta 10 veces el tamaño de las mismas con respecto al control ($p < 0,0001$). En células no tumorales MCF-10A, en condiciones control, se observó la presencia de estructuras tubulares sólidas o con lúmenes incipientes correspondientes a lóbulos mamarios tipo 1 y 2. El tratamiento con Iso y Fk (compuesto que aumenta los niveles intracelulares de AMPc) indujo el desarrollo de lúmenes bien constituidos y la formación de lóbulos de tipo 3, observándose mayor número de brotes terminales con respecto al control (Iso: $45,40 \pm 3,36$ vs Control: $12,75 \pm 3,77$, $p < 0,0001$). Por lo tanto, la activación β -adrenérgica, posiblemente a través de la producción de AMPc, estaría regulando la diferenciación de las células de mama humana MCF-10A creciendo en cultivo 3D.

316. (426) CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE PAPAS ANDINAS COMO ANTIOXIDANTES Y ANTITUMORALES EN HEPATOCITOS EN CULTIVO

Martínez, María Julia¹; Andreu, Adriana Balbina¹; Barbini, Luciana²

*Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata*¹; *Catedra 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, asociado a una alta mortalidad. Los compuestos polifenólicos son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas; descriptos como agentes beneficiosos para la salud humana. El interés en los compuestos polifenólicos se basa en su potencial uso como antitumorales. El objetivo del trabajo es caracterizar la composición, la actividad antioxidante y la citotoxicidad de extractos de papas andinas en células de hepatocarcinoma. Para ello se cuantificó el contenido de ácidos fenólicos, antocianinas y flavan-3-oles y se midió la actividad antioxidante en los extractos. Se caracterizaron cuali y cuantitativamente distintos metabolitos por HPLC. La actividad citotóxica se ensayó en hepatocitos incubados por 24 h con los extractos. Se midió la viabilidad celular y la apoptosis por distintos métodos. Se estudió la expresión de proteínas de la familia de Bcl-2. Las concentraciones de cada grupo fueron: 0,88±0,09 mg ac. clorogénico eq. /gPF ác.fenólicos totales; 0,11±0,02 mg. cianidin-3-glu eq/gPF antocianinas totales; 0,06±0,02 mg catequina eq. /gPF flavan-3-oles totales, y actividad antioxidante 1,03±0,04 mg trolox eq/gPF. El ácido clorogénico resultó ser el ácido fenólico mayoritario y la pelargonidina la antocianina en mayor proporción. Se detectó citotoxicidad y las CC50 fueron: HepG2 103,34 µg/mL; Hep3B 60,48 µg/mL; Huh7 124,97 µg/mL. Se observaron alteraciones morfológicas típicas de la apoptosis, tanto por microscopía de contraste de fases como por microscopía electrónica. Se observaron aumentos significativos en la mortalidad de las células tratadas (tinción con azul tripán y tinción con bromuro de etidio/naranja de acridina) y aumentos en los porcentajes de células apoptóticas tempranas. Se obtuvieron variaciones en los niveles de expresión la familia de Bcl-2 (Bax, Bcl-x, Bcl-2). La actividad citotóxica de los extractos polifenólicos de CL658 estaría ejercida por activación de la apoptosis.

- 317. (454) LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS Y LAS ARGINASAS PARTICIPAN DEL EFECTO PROLIFERATIVO PRODUCIDO POR COMPUESTOS AMARGOS EN EL TUMOR SCA-9**
Dmytrenko, Ganna; Castro, María Ester; Sales, María Elena
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los T2R reconocen compuestos amargos (CA) y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. La vía de señalización de estos receptores incluye a la fosfolipasa C y por lo tanto la óxido nítrico sintasa (NOS) podría participar en la misma vía. Además, la NOS comparte su sustrato con la arginasa (ARG), que forma precursores para la mitosis. Hemos detectado la expresión del subtipo T2R6 en las células tumorales SCA-9 derivadas de un tumor de glándula salival murina. Al tratar estas células con los CA denatonio (D) (10^{-8} M) o naringenina (N) (10^{-7} M) se estimuló la proliferación celular con respecto al control (C) considerado como el 100% (D: 144,6±6,4%; N: 138,1±12,0%; $p < 0,001$ vs. C) en cultivo bidimensional y también tridimensional, ensayado por medio de la formación de esferoides (D: 139,5±12,7%; N: 137,1±13%; $p < 0,001$ vs. C). Los CA disminuyeron la producción de nitritos (µM) cuantificados por el método de Griess en los sobrenadantes de cultivo bidimensional (D: 9,1±1,4; N: 7,7±1,1; $p < 0,05$; $p < 0,001$ vs. C: 12,5±1,9) y tridimensional (D: 6,3±0,7; N: 6,4±0,6; $p < 0,0001$ vs. C: 9,7±1,2). Este efecto fue revertido por el pre-tratamiento con LNMMA (10^{-4} M), un inhibidor de las NOS, que produjo potenciación del efecto proliferativo sólo para el D (181,9±5,9). El NOHA (10^{-4} M), inhibidor de las ARG transformó en estimulante el efecto del D sobre la producción de nitritos (16,9±2,3). También observamos que el D estimuló la actividad de la ARG determinada por medio de la producción de urea en un 61,9±17,4%; $p < 0,05$ vs. C. Este efecto se redujo en presencia de

NOHA. Aun cuando el pre-tratamiento de las células SCA-9 con aminoguanidina, inhibidor de la NOS2 potenció el efecto proliferativo de ambos CA (D: 179,9±4,9%; N: 169,5±6,0%; $p < 0,05$ vs. CA) sólo incrementó la producción de urea para el D ($p < 0,001$). Las NOS y las ARG participan del efecto proliferativo producido por ambos CA aunque sólo para el D se pone de manifiesto un mecanismo de interacción entre ambas enzimas.

- 318. (455) EFECTO DE LA ACTIVACIÓN COLINÉRGICA SOBRE LA PROGRESIÓN TUMORAL EN CÉLULAS DE MAMA HUMANA**

Martínez Pulido, Paola; Oroño, Manuel; Castro, María Ester; Lombardi, María Gabriela; Sales, María Elena
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Para determinar el rol de los receptores muscarínicos (RM) en la tumorigénesis mamaria, transfectamos células no tumorigénicas de mama humana, MCF-10A y obtuvimos tres líneas estables que expresan diferentes subtipos de RM: M₂, M₄ o M₃ (MCF-10A-M). En la progresión tumoral, la degradación de la matriz extracelular es central para la generación de neovasos y el crecimiento tumoral, por esto estudiamos la expresión y actividad de la metaloproteínasa-9 (MMP-9). Por Western blot observamos que, tanto las células MCF-10A-M como las células tumorales de mama humana MCF-7 expresan MMP-9, enzima que no se detectó en células MCF-10A. La estimulación con el agonista colinérgico carbacol (CARB) aumentó significativamente la expresión de MMP-9 con respecto al control sin tratamiento (control=100%), MCF10-A-M₂ (178,0±5,2%), MCF10-A-M₄ (176,7±12,1%), MCF10-A-M₃M₄ (223,0±23,4%) (n=3; $p \leq 0,05$ vs. control). Este efecto fue revertido en presencia del antagonista muscarínico atropina (AT). En ensayos de zimografía, observamos que el CARB incrementó la actividad de MMP-9 en las células MCF-10A-M y el efecto se revertió en presencia de AT. Además analizamos la neovascularización in vivo ($\delta = N^\circ$ de vasos/mm²) (X±DS; n=6; $p \leq 0,05$) observando en todos los casos una respuesta positiva: MCF10-A-M₂: 6,11±0,43; MCF10-A-M₃: 5,01±0,83; MCF10-A-M₃M₄: 6,47±0,66 con respecto a MCF-10A: 3,72±0,35 y con valores semejantes a los de las células MCF-7: 5,35±0,93. También evaluamos el crecimiento tumoral in vivo, inyectando las células transfectadas (10^6 cel. /0,1 ml) en ratones nude, en forma s.c. Todas las células formaron tumores (mm³±DS; n=5): MCF10-A-M₂: 1124±614; MCF10-A-M₃: 1680±88 y MCF10-A-M₃M₄: 860±169 a diferencia de las células MCF-10A. Concluimos que la expresión de los RM en células no tumorigénicas de mama humana sería suficiente para desencadenar el proceso de malignización celular.

INMUNOLOGÍA SAI 2

- 319. 323) CHANGES IN RHD AND CD47 EXPRESSION DURING RED BLOOD CELL AGING**

Luján Brajovich, Melina Eliana^{1,2}; Trucco Boggione, Carolina^{1,2}; Mattaloni, Stella Maris^{1,2}; Ensinck, María Alejandra²; Racca, Liliana²; Biondi, Claudia²; Cotorrueolo, Carlos^{1,2}
Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER)-Universidad Nacional de Rosario-CONICET¹ Area Inmunología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.²

Red blood cells (RBCs) undergo multiple changes while they age *in vivo*. Loss or reorganization of several proteins occurs gradually in erythrocytes membrane over 120 days in circulation. The aim of this work was to evaluate the participation of the RhD and CD47 polipeptides during the RBC senescence process. D positive samples expressing the C, c, E and e Rh antigens (n=30) and controls (D, C and E negative) were incubated with three different IgM anti-D mAbs. Subsequently, anti-µ-FITC and anti-CD47-PE were added. All samples were analyzed by flow cytometry (FACSARIA II). RBCs were gated on the basis of their forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) characteristics with the use

of logarithmic amplification. Flow cytometric analysis was carried out using the FACSDiva software. Dot-plot based on the FSC (cell size) versus SSC (cell density) parameters was used to identify Young (Y) and Senescent (Se) RBCs subpopulations. Statistical analysis showed that the median of the fluorescence intensity (MFI) (expressed as mean and standard deviation) associated with the D antigen expression obtained with the 3 different mAbs for YRBCs was 10635.6 ± 917.0 , 7527.6 ± 625.5 and 9629.2 ± 625.5 . The data obtained for SeRBCs were 8075.7 ± 1033.9 , 6119.7 ± 598.3 and 8027.3 ± 928.1 respectively. The MFI values were significantly higher in YRBCs when compared with SeRBC ($p < 0.0001$, Student's test for paired samples). The MFI values of CD47 were significantly lower in SeRBCs (13799.4 ± 1070.4) compared with YRBCs (17232.0 ± 1087.3) for all the experiments ($p < 0.005$, Wilcoxon's test for paired samples). The data obtained for CD47 did not differ significantly when analyzing YRBCs and SeRBCs for the 3 mAbs tested ($p > 0.15$, ANOVA test). The MFI reduction observed for RhD and CD47 in SeRBCs might be explained by the loss of membrane in form of microvesicles and the accumulation of oxidative damage, respectively that occur during RBC aging.

320. (65) VISCERAL ADIPOSE TISSUE TREGS EXPRESSING CD39 ARE PROTECTED FROM ATP INDUCED CELL-DEATH

Pandolfi, Julieta¹; Ferraro, Ariel²; Lerner, Martín²; Payaslian, Florencia¹; Billordo, Ariel¹; Baz, Placida¹; Fainboim, Leonardo¹; Arruvito, Lourdes¹

Laboratorio de Inmunogenética, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ Div. Cirugía Gastroenterológica, Hospital de Clínicas José de San Martín.²

Obesity (OB) is associated with local inflammation in visceral adipose tissue (VAT) which induces the release of ATP. Extracellular ATP as a danger signal can trigger cell- death. Its concentration is regulated by CD39 that hydrolyzes ATP/ADP into AMP. Because Regulatory T cells (Tregs) express CD39 and also CD73, which converts AMP into adenosine, they are therefore able to generate adenosine with suppressor properties. In this context we hypothesized that the expression of CD39 constitutes not only a suppressor mechanism to Tregs, but also could determine a different sensibility to ATP induced cell-death. Aims: 1-To determine functional differences between CD39+ and CD39-Tregs in VAT; 2-To analyze a differential susceptibility to ATP induced cell-death in both subsets; 3-To determine the frequency of CD39+ and CD39-Tregs in VAT of lean and obese donors. Results: Samples of VAT were obtained during endoscopic repair of hernias or bariatric surgeries from lean (LD) or obese (OB) patients, respectively. Our data demonstrate that CD39+Tregs and CD39-Tregs resident in VAT are functionally different: CD39+Tregs expressed higher levels of CD73 and secreted lower amounts of IL-10 compared to CD39-Tregs. Moreover, in the presence of ATP, CD39+Tregs showed lower levels of cell-death (Annexin+), quantified by Flow cytometry. As expected, and in accordance with the fact that extracellular ATP is increase in VAT of OB, the frequency of CD39-Tregs was lower in VAT of OB compared with LD. Conclusions: Our data suggest that CD39 expression may rescue Tregs from ATP induced cell-death. This feature could be relevant during OB associated inflammation because allows the presence of a resident Treg population in VAT. Additionally, a decreased CD39-Tregs frequency secreting IL-10 could be important in OB as this cytokine is associated with insulin sensitivity.

321. (313) MARGINAL ZONE B CELL EXPRESSES HIGHER LEVELS OF PD-L1 THAN FOLLICULAR B CELLS

Fiocca Vernengo, Facundo; Beccaria, Cristian Gabriel; Gorosito Serrn, Melisa; Acosta Rodriguez, Eva Virginia; Montes, Carolina Luca; Gruppi, Adriana

Depto. Bioquímica Clínica, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI) –CONICET-UNC.

Protective immune responses require specific and balanced responses to clear pathogens and tumors and yet maintaining

tolerance to self-antigens. Induction and maintenance of T cell tolerance is achieved by pathways triggered by different pairs of receptors and ligands. Among them, PD-1 (programmed death-1) and its ligands PD-L1 and PD-L2 can limit effector T cell responses preventing immune-mediated tissue damage. The general aim of our work is to evaluate the PD-1-PD-L1 pathway on B cell immunity. We first analyzed the expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 on different B cell subsets. All follicular (FO) and marginal zone (MZ) B cells expressed similar levels of PD-1 (MFI 8.4 ± 0.3 and 9.6 ± 0.5 respectively) and few MZ and FO B cells expressed PD-L2 (1.3% and 3.9% respectively $p = 0.0036$). Interestingly, all MZ B cells expressed PD-L1 and its expression was significant higher than on FO B cells ($p = 0.0019$). By immunofluorescence, we observed a B220^{hi}PD-L1^{hi} population in the marginal zone of spleen sections of C57BL6 mice. Stimuli like LPS, CpG and tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* considerably increased the expression of PD-L1 on B cells. The high expression of PD-L1 by MZ B cells correlates with high production of IL-6 and IL-10 in basal condition and after LPS stimulation, in comparison to FO B cells. PD-L1 and PD-L2 can signal bi-directionally by engaging PD-1 on T cells which can deliver signals into PD-L1/2-expressing cells. Thus, MZ B cells could regulate immunity or be regulated via PD-1/PD-L1 pathway, particularly upon activation during an infectious process. Functional studies are currently being performed in our laboratory.

322. (453) VIP INDUCES THE DECIDUALIZATION PROGRAM ON HUMAN ENDOMETRIAL STROMAL CELLS AND CONDITIONS DENDRITIC CELLS PROFILE

Grasso, Esteban Nicolas¹; Gori, Soledad²; Papparini, Daniel¹; Salamone, Gabriela²; Martínez, Gustavo³; Pérez Leirós, Claudia¹; Ramhorst, Rosanna¹

Laboratorio de Inmunofarmacología, Dto. Qca Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUBICEN)-CONICET-UBA¹ Laboratorio de Inmunología, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Academia Nacional de Medicina² Instituto de Fertilidad San Isidro (IMAC)³.

The decidualization program involves phenotype and functional changes on endometrial cells that will facilitate the attachment and invasion of the blastocyst. This process involves the modulation of different mediators such as cytokines, chemokines and growth factors. Particularly, the vasoactive intestinal peptide (VIP) is a neuropeptide produced by endometrial stromal cells among others, and displays multiple target circuits that allow immunotolerance. Here, we investigated VIP contribution to the decidualization program and whether this process modulates dendritic cells (DC) profile. We differentiated human endometrial stromal cell line (hESC) in the presence of VIP (10^{-7} M), or with medroxyprogesterone (MPA) and dbcAMP (Positive control) during 8 d. The decidualization performed with MPA+dbcAMP increased VIP expression (by RT-PCR) and secretion (by ELISA). When the decidualization was induced by VIP, we observed an increase IGFBP1, PRL and KLF13/KLF9 ratio in a concentration-dependent manner; accompanied by and increase in the expression of IL-8 and SDF1, both markers of receptive endometrium ($p < 0.05$). To evaluate the functional aspect of VIP-decidualization, an invasion assay was performed using blastocyst-like spheroids (BLS) from first trimester trophoblast cells (Swan71) cultured on hESC monolayer. BLS were able to attach and invade hESC monolayer decidualized with VIP or MPA+dbcAMP. When these assays were performed with conditioned media obtained from human blastocyst we found an increase in BLS invasion to hESC decidualized with VIP ($p < 0.05$). Finally, we evaluate the immunomodulatory effects of decidualized cells on DC. Decidualized hESC conditioned media induced a semi-mature profile on DC preventing the induction of CD83 and CD86 expression, while inducing IL-10 secretion ($p < 0.05$). Our results suggest that VIP may contribute to the decidualization process by inducing phenotypic and functional markers on hESC cells and to maintain tolerogenic DC-profile.

- 323. (469) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA ACTIVACIÓN DE LA SÍNTESIS DE CITOQUINAS EN GLÁNDULA MAMARIA BOVINA INOCULADA CON UN INMUNOMODULADOR**
Baravalle, Celina¹; Beccaria, Camila¹; Silvestrini, Paula¹; Renna, María S.¹; Andreotti, Carolina¹; Ortega, Hugo H.¹; Calvino, Luis F.²; Dallard, Bibiana E¹
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET) UNL-CONICET¹. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA.²

Resultados previos han demostrado los efectos inmunomoes-timulantes de un extracto de *Panax ginseng* (PG) aplicado al final de la lactancia en glándula mamaria bovina como alternativa de prevención y terapia frente a las infecciones intramamarias. Sin embargo, existe escasa información sobre los componentes implicados en las vías de señalización celular que involucran su mecanismo de acción. En el presente trabajo se propone evaluar la expresión génica de los receptores tipo *tol*/TLR2 y 4, la proteína adaptadora MyD88, el factor de transcripción nuclear NFκB y las citoquinas IL-1b e IL-6 identificando posibles modificaciones tras la inoculación intramamaria de PG durante la involución temprana. Se utilizaron 6 vacas Holstein en la etapa final de la lactancia. La unidad experimental fue el cuarto mamario. Ocho cuartos fueron inoculados con 10 ml de una solución de extracto de PG (3 mg del extracto seco/ml), 8 con 10 ml de solución fisiológica (placebo, P) y 8 fueron mantenidos como controles libres de inoculación (C). Los animales fueron secados luego del tratamiento y se obtuvieron muestras de tejido mamario a los 7 días post inoculación. La expresión de los genes evaluados se cuantificó mediante PCR en Tiempo Real a partir de ARN extraído de los diferentes grupos en estudio. La expresión génica de TLR2 y 4, NFκB, MyD88, IL-1b e IL-6 fue mayor en cuartos tratados con PG en comparación a cuartos tratados con P y C ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en la expresión entre cuartos tratados con P y C en ninguno de los genes analizados. Los resultados indicarían que los componentes del extracto de PG podrían ser detectados por TLR2 y 4 estimulando la vía de señalización de MyD88 y la consecuente activación de NFκB como posible mecanismo de acción. El aumento significativo en la expresión génica de las citoquinas en los cuartos tratados con PG confirmaría su efecto inmunestimulante.

- 324. (351) NANOSTRUCTURE-BASED PLATFORM FOR CPG-ODN PROMOTES ENHANCED CD8+ T CELL EFFECTOR RESPONSE TO PROTEIN ANTIGEN AND ACCELERATES SEROCONVERSION**
Chiodetti, Ana Laura¹; Sánchez Vallecillo, María Fernanda¹; Crespo, María Ines¹; Morón, Gabriel¹; Palma, Santiago²; Pistoresi, María Cristina¹; Allemandi, Daniel Alberto²; Malletto, Belkys Angélica¹
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC¹ Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-CONICET²

Previously, we have shown that immunostimulatory CpG-ODN formulated in a nanostructure of 6-O-ascorbyl palmitate (Coa-ASC16) has the capacity of enhancing a specific immune response in a more efficient manner than the CpG-ODN solution alone using OVA as an antigen model. In order to further evaluate the advantage of this formulation in the specific immune response, we analyses the kinetic of antibody response and the capacity to generate cytotoxic CD8+ T lymphocyte (CTL) response. Mice were s.c. immunized on day 0 with OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 formulation or OVA/CpG-ODN solution (dose/mice: OVA: 60µg, CpG-ODN: 75 µg) and plasma was obtained on days 8, 10, 13, 16, 19, 22, 35, 49 and 65 post immunization for OVA-specific IgG titers analyzed by ELISA. On day 8, plasma from both groups was not reactive. At day 10 only OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 immunized mice elicited IgG response (2.1 ± 0.2 vs not detected). After day 10 the OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 group presented higher IgG titles than

OVA/CpG-ODN group ($p < 0,001$). For CTL determination, an in vivo killing assay was performed. Mice were s.c. immunized on day 0, 7 and 14 with OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 or OVA/CpG-ODN (dose/mice: OVA: 60µg, CpG-ODN: 75µg). Mice immunized with OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presented on day 21 a more effective specific lysis percentage than mice immunized with OVA/CpG-ODN ($79 \pm 6\%$ vs $16 \pm 6\%$, $p < 0,02$). At the same time, IFN-γ was assayed by ELISA in supernatants of splenocytes from this immunized mice after reestimulation in vitro with $0.1 \mu\text{g/ml}$ of OVA₂₅₇₋₂₆₄ during 72 h; the splenocytes from OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mice secreted higher levels of IFN-γ than those from OVA/CpG-ODN mice ($p < 0,05$). Our results show that this nanostructure-based vaccine platform accelerates specific antibody seroconversion and improves the efficiency of antigen-specific cytotoxic CD8+ T cell response demonstrating the potentiality of this strategy as a new adjuvant option for future vaccines.

- 325. (542) STUDY OF THE IMMUNE RESPONSE ELICITED BY A COMMERCIAL VACCINE AGAINST BOVINE RESPIRATORY DISEASE IN A MURINE MODEL**
Díaz, Ailén M; Cognard, Anaïs; González Maglio, Daniel H; Canellada, Andrea M; Manghi, Marcela A; Castro, Marisa S.
Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA.

Bovine Respiratory Disease (BRD) constitutes one of the most common diseases that affect cattle during the first months of life. *Pasteurella multocida* (PM) and *Mannheimia haemolytica* (MH) are included among the complex etiologic agents responsible of BRD. Although vaccines against BRD are broadly employed in Argentina, they do not always provide an adequate control of the pneumonic form of the disease. To improve actual formulations, it is necessary to understand the immune response elicited by these vaccines. The present work attempts to establish a murine model to study the immune response triggered by a BRD commercial vaccine. Female BALB/c mice were immunized with 0.25 ml of BRD vaccine by subcutaneous route at days 1 and 15. Twelve days after the last immunization mice were bled and sacrificed. Specific humoral and cellular immune response against PM and MH were measured. IgG levels in serum were measured by ELISA, spleen cell proliferation was determined by ³H thymidine uptake, and cytokine levels in spleen cell supernatants were analyzed by capture ELISA. Immunization induced specific IgG levels against PM ($p < 0,001$) and MH ($p < 0,01$) in immunized mice. Spleen cells from immunized mice showed a specific cell proliferation when PM ($p < 0,001$) or MH ($p < 0,01$) were used as *in vitro* stimulus. IL-2 and IFNγ levels measured in supernatants were low. Results demonstrate that immunization in mice with the commercial vaccine elicited a specific immune response. However, the response generated not seems to be too strong. Further studies will allow assessing whether the response is sufficient to protect animals against challenge with pathogens.

- 326. (118) ELEVATED NUMBER OF CIRCULATING PLASMA-BLASTS IN PATIENTS WITH ACUTE HANTAVIRUS PULMONARY SYNDROME CAUSED BY ANDES VIRUS INFECTION**
García, Marina¹; Martínez, Valeria P²; Iglesias, Ayelén²; Landoni, Verónica¹; Sasiain, María Del Carmen¹; Schierloh, Pablo¹
Laboratorio de Inmunología de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET¹ INEI-ANLIS "Dr. Carlos G Malbran"².

The presence of "immunoblast-like" cells in patients with Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) is a regular finding during routine clinical blood exam. Nonetheless their cellular lineage has not been established nor their relevance in the course of the disease. In order to characterize the phenotype of those immunoblasts in HPS patients caused by the Andes virus (ANDV), anticoagulated blood samples were obtained from confirmed HPS patients (ANDV+ n=12), seronegative patients with acute respiratory symptoms (ARS n=12) and healthy subjects (HS n=21). Samples were inactivated

and stabilized under biosecure conditions and processed for flow cytometry and confocal microscopy for quantitative (CountBright™) and qualitative analysis. In ANDV⁺ acute samples, we observed high numbers of CD19⁺ CD27^{hi} CD38^{hi} CD20^{neg} IgD^{neg} CD138^{hi/neg} intracellular Igs^{hi} blasted (FSC^{hi}SSC^{hi}) lymphoid cells identified as circulating plasmablasts (PB), a B cell-derived population virtually absent on HS ($p < 0.0012$) and less frequent in ARS ($p < 0.02$). PB level dropped in ANDV⁺ late samples ($n=4$), resembling the ones observed in HS. In addition, ANDV⁺ with low IgG anti-NP titer show higher PB levels than those with high titer ($p < 0.02$), which could be related with the fact that IgG increases with the progress of the disease. Finally, flow-sorted ANDV⁻-derived PB analyzed by confocal microscopy exhibit intracellular Igs contents and bigger size than CD38^{low/neg} B-lymphocytes ($p < 0.05$). This phenotype resembles the "immunoblast-like" cell shape often described during cytology exam. As recently reported for other RNA viruses (i.e. Dengue and Influenza), our results show that ANDV⁺ present a massive and transient PB response, corresponding to what has previously been morphologically defined as "immunoblasts". The antigen specificity of these cells remains to be addressed as well as their role during the course of the disease.

327. (193) ADRENAL STEROIDS MODULATE THE IMMUNE RESPONSE DURING BRUCELLA ABORTUS INFECTION
 Gentilini, María Virginia; Velásquez, Lis Noelia; Barrionuevo, Paula; Benitez, Paula Constanza Arriola; Giambartolomei, Guillermo H; Delpino, María Victoria
 Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA

Brucella abortus (*Ba*) induces an inflammatory response that could stimulate the endocrine system resulting in the secretion of glucocorticoids and dehydroepiandrosterone (DHEA). Our aim was to evaluate the role of adrenal hormones on the immune response in brucellosis. We found an increased in the cortisol/DHEA ratio in sera from brucellosis patients ($p < 0.05$) (electroquimioluminiscence). Since monocytes are the replication niche of *Ba*, we evaluated the role of adrenal hormones on IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, IL-8 production (ELISA), MMP-9 activity (zymography) and MHC-I, MHC-II, CD40, CD86 and CD54 expression (flow cytometry) in human monocytes (THP-1) in the presence of cortisol or DHEA. Our results showed that DHEA induced the secretion of cytokines, MMP-9 production and the surface expression of MHC-I and MHC-II and co-stimulatory molecules in *Ba* infected THP-1 cells. Cortisol treatment inhibited the expression of these molecules during *Ba* infection. When experiments were performed in the presence of both cortisol and DHEA, we observed a significant increase in the expression of all molecules studied respect to *Ba*-infected untreated cells or *Ba*-infected cells treated with cortisol. These results indicated that DHEA was able to reverse the inhibitory effect induced by cortisol. It has been described that *Ba* can survive inside macrophages and this phenomenon could be explained at least in part by the inhibition of MHC-I and MHC-II expression induced by IFN- γ . Our results indicated that treatment with DHEA resulted in significant recovery of the inhibition of IFN- γ -induced MHC-I ($p < 0.05$) and MHC-II ($p < 0.01$) expression mediated by *Ba* infection. Cortisol had no effect on the down-modulation of IFN- γ -induced MHC-I and MHC-II expression mediated by *Ba*. When both hormones were administered together the effect was the same as with DHEA alone. This work is the first report demonstrating the influence of the endocrine system on the immune response in Brucellosis.

328. (288) EXPLORING IMMUNOLOGICAL MEMORY IN CHAGAS DISEASE: PROTOCOL OPTIMIZATION FOR THE GENERATION OF TRYPANOSOMA CRUZI-SPECIFIC HUMAN T-CELL LINES

Acevedo, Gonzalo Raúl¹; Longhi, Silvia¹; Atienza, Augusto²; Chiale, Pablo²; Pinilla, Clemencia²; Judkowski, Valeria²; Gómez, Karina¹
 Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)-CONICET¹ Torrey Pines Institute for Molecular Studies² Hospital Ramos Mejía³

Human Chagas disease, caused by infection with the protozoan *Trypanosoma cruzi* has an acute phase, followed by a chronic stage that can remain asymptomatic for years, or develop into digestive or cardiac pathologies, being the latter the most frequent form. Given the size and complexity of the parasite's proteome and it's interaction with the host's immune system, positional scanning of combinatorial synthetic peptide libraries appears as a promising, high-throughput method for the study of immunological memory against *T. cruzi*. The aim of the present study was to produce an optimized protocol for the generation of pathogen-specific clonal T-cell lines, which peptide libraries are to be scanned with. For this, PBMC or CD3⁺CD8⁻ sorted cells, from both chronic asymptomatic and cardiac patients, as well as from non-infected individuals, underwent different *in vitro* culture and stimulation protocols. Our results allowed us to adjust the following variables: **a)** for the cell culture and expansion stages, which intend to expand antigen-specific memory T-cell populations: initial stimulus concentration (2.5 $\mu\text{g/ml}$) and incubation time (1 day), initial culture density (250,000 PBMC/well), IL-2 addition in culture medium (since day 6, every 3-4 days), and **b)** for the challenge stages, by which cultures' response specificity for *T. cruzi* antigens was assessed: days since initial simulation (27 days), T-cells to antigen presenting cells ratio (1:2), *T. cruzi* lysate concentration (2.5 $\mu\text{g/ml}$) and readouts (Interferon- γ secretion, cell proliferation). When considered appropriate, flow cytometry experiments were carried out to find out whether protocol variations favored cytolytic or helper T-cell populations enrichment. These are the first steps in a novel, T-cell driven way towards the identification of potential prophylactic or therapeutic antigenic candidates, a matter of strategic relevance for the control of Chagas disease.

329. (294) STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROTEIN A INDUCES INFLAMMATORY CYTOKINES AND CHEMOKINES IN HUMAN NEUTROPHILS AND REGULATES THEIR SURVIVAL

Garofalo, Ailin¹; Giai, Constanza¹; González, Cintia¹; Mendoza, Andrea¹; Ledo, Camila¹; Sabbione, Florencia²; Trevani, Analía²; Gómez, Marisa¹
 Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-UBA-CONICET¹ Laboratorio de Inmunología, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET²

Staphylococcus aureus is a major human pathogen that causes infections characterized by an intense inflammatory response. Protein A (SpA), is a critical virulence factor that mimics TNF- α signaling cascades by interacting with TNFR1 and initiates a strong inflammatory response that leads to the recruitment of neutrophils to the site of infection. The aim of this study was to determine the role of SpA in the induction of pro-inflammatory responses in human neutrophils and its capability to modulate cell survival. Neutrophils were stimulated with purified SpA, GST (as control), *S. aureus* or an isogenic mutant that lacks SpA expression (*spa*-) for different periods of time and cytokines and chemokines were quantified by ELISA or Real Time PCR. SpA induced a significant increase in the expression of CD11b ($p < 0.05$), CCL3 ($p < 0.05$) and IFN β ($p < 0.05$) at 2 hours after stimulation whereas a significant increase in the production of IL-8 ($p < 0.01$) and TNF α ($p < 0.05$) as well as in the expression of CCL2 ($p < 0.05$) was observed at 4 hours post-stimulation. Similarly, *S. aureus* induced IL-8 ($p < 0.001$) and TNF α ($p < 0.05$) production after 4 hours of stimulation ($p < 0.01$) as well as CCL3 expression at 2 hours post-stimulation ($p < 0.05$) which was dependent upon SpA expression ($p < 0.05$). Four hours after stimulation, the *spa*- mutant induced an increase in neutrophil apoptosis and neutrophil death which was not observed with *S. aureus* expressing protein A ($p < 0.05$). Twenty two hours after stimulation the *spa*- mutant induced neutrophil death in a significantly higher rate than that observed in response to *S. aureus* expressing SpA ($p < 0.05$). Whereas both *S. aureus* and *spa*- stimulated neutrophils produced IL-8 by 22 hours post-stimulation ($p < 0.05$), TNF- α production was only decreased in cells stimulated with the *spa*- mutant ($p < 0.01$). These results suggest that *S. aureus* protein A may contribute to increase neutrophil survival and to maintain a proinflammatory environment during *S. aureus* infection.

- 330. (321) ASOCIACIÓN DE PATRONES SEROINDETERMINADOS POR WESTERN BLOT CON BAJOS NIVELES DE CARGA PROVIRAL EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON EL VIRUS LINFOTRÓFICO T HUMANO TIPO 1 (HTLV-1)**
 Cánepa, Camila; Salido, Jimena; Pattaccini, Gabriela; Ruggieri, Matías; Fraile, Sindy; Delfino, Cecilia; Biglione, Mirna M.; Berini, Carolina
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (INBIRS)-UBA-CONICET.

Introducción: el HTLV-1 infecta 25 millones de personas en el mundo y es el causante de la Leucemia/Linfoma a Células T del Adulto y la Paraparesia Espástica Tropical. Los resultados reactivos por tamizaje se confirman generalmente por Western Blot (WB). Un problema frecuente es el gran número de WB indeterminados. Objetivo: determinar si bajos niveles de carga proviral (CPV) están asociados a resultados seroindeterminados por WB. Metodología: se comparó la CPV en casos HTLV-1+ por WB con patología (G1), HTLV-1+ por WB asintomáticos (G2) y HTLV-1+ sin patología seroindeterminados por WB (G3). Todas las muestras fueron confirmadas por n-PCR. La CPV se llevó a cabo por real-time SYBR Green (qPCR) (ABI Prism 7500 System-AppliedBiosystems), mediante amplificación del gen *pol* y albúmina. La calibración se realizó a partir de ADN de MT2 (Límite de cuantificación: 3,4 copias de *pol* /reacción - $R^2 > 0,99$) y el análisis por Krustall Wallis (InfoStat v.2011). Resultados: el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo fue: 14% para valores altos (>10%), 9% para valores medios (1-10%), y 7% para valores bajos (<1%); el CV inter-ensayo para valores altos fue de 24%. Las medianas de CPV fueron de 4,26, 1,89 y 0,15 copias de HTLV-1/100 CMSPs para G1, G2 y G3, respectivamente. Se observó una diferencia significativa entre la CPV de casos con serología positiva (G1 y G2) y aquellos con resultados seroindeterminados ($p_1 = 0.07$, $p_2 = 0.0036$); la diferencia también se observó al considerar muestras con resultados HTLV-1+ por WB como único grupo [G1 + G2] ($p = 0.005$). Se halló correlación entre la CPV y la edad de los pacientes ($S = 0.61$). Conclusiones: este estudio demuestra que algunos WB indeterminados asociados a infección por HTLV-1 pueden deberse a bajos niveles de CPV. Si bien la qPCR aporta información de utilidad clínica, debería alcanzar el nivel de sensibilidad de la n-PCR actualmente utilizada para implementarse como técnica confirmatoria, tal como se ha propuesto.

- 331. (392) TH17 AND TREGS AT EARLY HIV INFECTION INFLUENCE DISEASE PROGRESSION AND HIV SPECIFIC CD8+ RESPONSES**
 Falivene, Juliana¹; Ghiglione, Yanina¹; Laufer, Natalia^{1,2}; Holgado, María Pia¹; Maeto, Cynthia¹; Socias, María Eugenia^{2,3}; Ruiz, María Julia¹; Cahn, Pedro^{2,3}; Sued, Omar^{2,3}; Salomon, Horacio¹; Turk, Gabriela¹; Gherardi, María Magdalena¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (INBIRS) UBA-CONICET¹ Hospital Juan A. Fernández, Servicio de Infectología² Fundación Huésped³

The direct relation of Th17 and Tregs with specific HIV-adaptive T cell responses during primary HIV infection (PHI) is unexplored. Aim: To analyze the frequency and balance of Th17 and Tregs and the correlation with clinical parameters, immune activation and HIV-specific responses during PHI. We used PBMCs from 14 healthy donors (HDs) and 62 HIV+ patients: 13 elite controllers (ECs), 9 chronics (Chs) and 40 PHIs (baseline/year samples). Th17 and Tregs were identified as CD3/CD4 IL-17 and CD25/FoxP3 respectively. Data was compared inter/intragroups and correlated with clinical parameters (viral load (VL), CD4 counts), CD8 CD38/HLA-DR activated cells and specific anti-HIV CD8 responses (by a viral inhibitory activity (VIA) assay and ICS for IFN γ and CD107a/b cytotoxicity markers) using para/nonparametric statistics. Th17 and Tregs were altered in Chs versus (vs) HDs and ECs ($p < 0.01$), and all HIV+ patients had lower Th17/Tregs ratio vs HDs ($p < 0.05$). Among PHIs, according to their CD4 counts during the first year post-infection (pi), comparing rapid (RPs) vs typical (TPs) progression: at baseline RPs had higher immune activation ($p = 0.04$), lower Th17 counts ($p = 0.004$)

and a tendency to higher VLs ($p = 0.07$). Correlations with clinical parameters of disease progression were found: Th17 vs CD4 counts at baseline ($p = 0.002$, $r = 0.499$) and 1 year pi ($p = 0.007$, $r = 0.596$), Th17 vs soluble MDC at baseline ($p = 0.01$, $r = 0.574$) and sCD40L at 1 year pi ($p = 0.02$, $r = -0.648$). Novel correlations with anti-HIV T-cell responses previously associated with protection were detected: Th17 cells vs baseline and 1 year pi HIV-specific polyfunctional IFN γ /CD107a/b cells ($p = 0.01$, $r = 0.674$ and $p = 0.03$, $r = 0.605$ respectively) and VIA at 1 year pi ($p = 0.06$, $r = 0.572$). Thus, Th17 preservation positively impacts on the clinical status of the HIV-infected patients. Remarkably, higher Th17 at early stages directly correlated with more potent anti-HIV T-cell responses associated with protection at later times pi.

- 332. (420) INHIBITION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I (MHC-I) BY BRUCELLA ABORTUS IS AN EARLY EVENT DURING INFECTION AND INVOLVES THE EGF RECEPTOR PATHWAY**
 Velásquez, Lis Noelia¹; Delpino, M. Victoria²; Milillo, M. Aye-lén¹; Giambartolomei, Guillermo H.²; Barrionuevo, Paula¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM¹ Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA²

Brucella abortus is able to persist inside the host despite the development of a potent CD8⁺ T cell response. We have recently reported the ability of *B. abortus* to inhibit the IFN- γ -induced cell surface expression of MHC-I molecules on human monocytes. MHC-I down-modulation resulted in a diminished CD8⁺ cytotoxic T cell response and was dependent on bacterial viability. The aim of this study was to further characterize this phenomenon by studying its kinetics and if it elicits a bystander effect. For this, THP-1 cells were infected with a virulent strain of *B. abortus* (S2308), a rough strain (RB51) or a mutant strain lacking the VirB Type IV secretion system (*virB10*) in the presence of IFN- γ for 48 h. MHC-I expression was then evaluated by flow cytometry. All 3 strains were able to diminish the IFN- γ -induced expression of MHC-I molecules ($p < 0.05$). However, only the S2308 strain was capable of surviving intracellularly and establishing a successful infection. Thus, we evaluated the kinetics of MHC-I down-modulation. The phenomenon occurred early in time and was observable at 8 h post-infection ($p < 0.01$). At 24 h and 48 h it was even more pronounced. Interestingly, even though few cells were infected in culture, MHC-I down-regulation occurred in the whole population. Thus, we infected cells with *B. abortus*-GFP and evaluated MHC-I expression in infected as well as non-infected cells. In both populations MHC-I expression was inhibited ($p < 0.01$). Moreover, supernatants from *B. abortus*-infected cells were also able to inhibit MHC-I expression in non-infected THP-1 cells. Finally, neutralization of the EGF receptor by a monoclonal antibody (Cetuximab) resulted in partial recovery ($p < 0.01$) of MHC-I expression indicating that EGF-like ligands may be the soluble mediators involved. Overall, these results describe how *B. abortus* evades CD8⁺ T cell responses early during infection and generates a bystander effect to better escape from the immune system and favor chronicity.

- 333. (444) INCREASE IN A FC ϵ R1+ CELL POPULATION IN LUNG DURING THE ACUTE PHASE OF TRICHINELLA SPIRALIS INFECTION. ITS ROLE IN HELMINTHOCYTOXICITY**
 Falduto, Guido Hernán¹; Vila, Cecilia Celeste; Saracino, María Priscila; Calcagno, Marcela Adriana; Venturiello, Stella Maris
Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA

We have previously demonstrated that: A) lung cells (LC) from Wistar rats are able to kill *Trichinella spiralis* migrant larvae (mL) through an antibody-dependent mechanism (ADCC). B) Such mortality depends on the mL maturation age. C) A lung inflammatory process occurs during the acute phase of infection, increasing the helminthocytotoxic activity. This study was aimed to evaluate

the Fc ϵ RI surface expression in LC and its role in the cytotoxic attack against mL. Both Fc ϵ RI surface expression and biological activity were examined by flow cytometry and by *in vitro* ADCC assays. In these ADCC assays: 2 and 20 hour-old mL (mL₂ and mL₂₀ respectively), rat serum containing anti-mL antibodies and LC from infected (day 6 pi; LCI) or non-infected rats (LCNI) were incubated for 20 hours. LC were preincubated with an anti-Fc ϵ RI or an isotype control. Also the significance of the IgE isotype was evaluated using serum heated at 56 °C for 3 hours. Results are expressed as mL mortality percentages. Our results revealed that: I) the% of LC expressing Fc ϵ RI was significantly higher in cell suspensions from infected rats (LCI: 1.82±0.36 vs. LCNI: 0.46±0.08, $p < 0.05$); II) Fc ϵ RI blockade caused a decrease in the mortality% of mL₂ (LCI: 48±2 vs. 10±5; LCNI: 30±2 vs. 17±2) and mL₂₀ (LCI: 67±2 vs. 37±1; LCNI: 47±2 vs. 36±1); III) the elimination of the IgE activity in serum caused a marked decrease in cell adhesion, and in the mortality% of mL₂ (LCI: 48±1 vs. 14±3; LCNI: 30±1 vs. 1±1) and mL₂₀ (LCI: 66±2 vs. 35±1; LCNI: 44±1 vs. 19±4). These results show that the lung inflammatory process during the acute phase of infection causes an increase in the number of Fc ϵ RI+ cells which, in the presence of IgE, enhances the helminthocytotoxic activity exerted by LC. Thus, the role of the lung as an important parasitic destruction organ in trichinellosis is strengthened.

334. (461) TRANSCRIPT EXPRESSION FOR IMMUNE AND ENDOCRINE MEDIATORS IN THP1-DERIVED MACROPHAGES INFECTED WITH MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EXPOSED TO CORTISOL AND/OR DHEA

Bongiovanni, Bettina¹; D Attilio, Luciano¹; Mata Espinosa, Dulce²; Marquina Castillo, Brenda²; Bottasso, Oscar¹; Hernández Pando, Rogelio²; Bay, María Luisa¹

Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER)-CONICET¹ Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México²

Macrophages play a central role in the response against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Our previous work demonstrated that the response of macrophages infected to Mtb was modulated by cortisol (Gc) and dehydroepiandrosterone (DHEA). In fact, combined treatment with both steroids increased Mtb phagocytosis but decreased the number of colony-forming units; for which we decided to analyze the possible intracellular mechanisms involved in this process. Macrophages derived from the THP-1 cell line were exposed to live Mtb strain H37Rv (MOI 5:1) during 3 hr in presence or absence of Gc (1 μ M) and/or DHEA (1 and 0.1 μ M). Upon washing, cells were cultured for 24 hr in the same media with or without hormones to further analyze several cell transcripts by qRT-PCR. That is the expression of glucocorticoid receptors, alpha y beta (GR α and GR β), enzyme regulating cortisol availability (11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 -11 β HSD1- and type 2 -11 β HSD2-) and pro-apoptotic proteins (Caspases), the inflammasome related protein (NLRP) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Results showed that Gc inhibited GR α , 11 β HSD1 and caspase 1 expression ($p < 0.05$), while increasing caspase 3 expression irrespective of DHEA treatment ($p < 0.05$). DHEA alone increased caspase 3 transcript ($p < 0.05$). Mtb increased caspase 1 ($p < 0.05$) and caspase 3 ($p < 0.01$) expression along with a slight increase of NLRP expression (statistically not significant respect the control group). Mtb in presence of Gc with or without DHEA resulted in a decreased expression of 11 β HSD1 and caspase 3 respect cells only exposed to Mtb ($p < 0.05$). In addition, Mtb plus DHEA (1 μ M) significantly increased GR α expression as compared to Mtb-exposed cultures ($p < 0.05$). While treatment with Gc and DHEA (1 μ M) seems to inhibit Mtb-induced apoptosis, both steroids continue to favor processes implied in mycobacterial clearance considering the lower bacillary load.

335. (509) STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXIN G (SEG) INDUCES IN VITRO RESISTANCE TO GLUCOCORTICOID TREATMENT

Fernández Lynch, María Julieta; Noli Truant, Sofía; Antonoglou, María Belén; Todone, Marcos; Romasanta, Pablo Nicolás; Sarratea, María Belén; De Marzi, Mauricio; Malchiodi, Emilio Luis; Fernández, Marisa Mariel

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA

Bacterial superantigens (SAGs) are bacterial proteins which bind in a non-classical way to TCR-MHC-II complexes inducing a peptide-non-specific proliferation of T lymphocytes. *Staphylococcus aureus* produces a wide range of enterotoxins, including type II SAG SEG. SAG related diseases are commonly treated with a combination of: antibiotics, if the bacteria are present; systemic glucocorticoids, for modulating the exacerbated response; and hemodynamic support for severe cases. Recently, resistance to the glucocorticoid traditional treatment was described for SEB, another type II SAG. In order to elucidate whether glucocorticoid resistance is extended to other members of the type II family, mouse splenocytes were treated with 1 and 10 μ g/ml of SEG, showing significant proliferation at high doses of dexamethasone (10^{-5} M); SEG 1 μ g/ml: (2208 \pm 15) cpm; SEG 10 μ g/ml: (3017 \pm 59) cpm compared to control (161 \pm 75) cpm; whereas classical LT-mycogen PHA proliferation is inhibited at low glucocorticoid doses (10^{-8} M). The addition of 0.0025 and 0.025 μ g/ml of *S. aureus* peptidoglycan enhances the resistance at higher dexamethasone doses. Moreover, SEG site directed mutants D172A, F204A, G20A, N24A and N24D, which involve TCR "hot spots" binding residues, show decreased *in vitro* activity and glucocorticoid inhibition at lower doses. These results suggest that the activation of TCR signaling might be necessary for glucocorticoid resistance. The understanding of the underlying mechanisms of superantigen glucocorticoid resistance might lead to more effective treatments of the pathologies related to these toxins.

336. (519) IMMUNE RESPONSE IN PREGNANT HEIFERS TO STREPTOCOCCUS UBERIS RECOMBINANT PROTEINS FORMULATED WITH DIFFERENT ADJUVANTS

Perrig, Melina¹; Camussone, Cecilia²; Marcipar, Iván Sergio¹; Calvino, Luis Fernando²; Veaute, Carolina¹; Barbagelata, María Sol¹

Laboratorio de Tecnología Inmunológica¹ INTA Estación Experimental Agropecuaria Rafaela.² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas³

Bovine mastitis leads to great economic losses to the dairy industry. *Streptococcus uberis* is one of the causative agents and no preventive vaccine is available. The aim of this work was to study the ability of two recombinant *S. uberis* virulence factors formulated with different adjuvants, to induce an immune response in cows. *S. uberis* PauA and SUAM proteins were cloned and expressed in *E. coli*. Pregnant Holando Argentino heifers (n=8/group) received 2 doses of a mix of rPauA and rSUAM (0.2mg each), formulated with: Al(OH)₃ (AL), Al(OH)₃ with saponin (ALS), or liposomes with saponin (immunostimulating particles: ISPA). Control animals (C) received the adjuvant alone. Results were analyzed using nonparametric tests, Kruskal Wallis or Mann-Whitney, as appropriate, at 45 and 15 days prior to expected calving date, subcutaneously in the supramammary region. Animals did not show immune reactivity towards proteins prior to immunization. Blood total IgG, assessed by indirect ELISA, in sera diluted 1:2000, was maximum at 21 days after the second dose, for both proteins, with ISPA (OD_{SUAM}: 1.00 \pm 0.35, OD_{PauA}: 1.23 \pm 0.26, $p < 0.05$ vs C) and ALS (OD_{SUAM}: 0.73 \pm 0.32; OD_{PauA}: 0.86 \pm 0.44, $p < 0.05$ vs C). Both adjuvants induced higher levels of specific IgG than Al (OH)₃ (ISPA vs AL ($p < 0.05$), ALS vs Al ($p < 0.05$)). All formulations induced balanced levels of specific IgG1 and IgG2, without differences among adjuvants ($p > 0.05$). Specific antibodies were detected in milk; IgG levels on day +21 were similar among the three adjuvants for PauA ($p > 0.05$). Milk anti-SUAM IgG levels were similar between ALS and Al ($p > 0.05$), and higher than those obtained with ISPA ($p < 0.05$). In conclusion rPauA and rSUAM proteins administered to pregnant heifers, are able to induce an immune response in the peripartum. Saponins added to the adjuvant formulation enhance serum antibody levels against that are considered good candidates for the design of a vaccine for *S. uberis* mastitis control.

337. (544) APOPTOSIS SIGNALING PATHWAYS IN ADRENAL GLANDS DURING EXPERIMENTAL TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION

Villar, Silvina Raquel¹; Martinelli, Romina¹; González, Florencia¹; Roggero, Eduardo¹; Pérez, Ana Rosa¹; Ronco, M. Teresa²; Bottasso, Oscar¹
Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER)-CONICET-UNR¹ Instituto de Fisiología Experimental (IFISE)-CONICET-UNR.²

TNFR1 and Fas share an intracellular domain crucial to induce apoptosis by triggering the initiator caspase-8 and subsequently the effector caspase 3; or could induce pathways that are involved in the inflammatory response including NF- κ B and MAPK pathways. At adrenal level both pathways might influence glucocorticoid (GC) synthesis during an inflammatory process. We previously showed that during *T. cruzi* (Tc) infection MAPK and NF- κ B pathways regulate the expression of enzymes involved in GC synthesis. Now we aimed to evaluate whether TNF α and FasL participate through their respective death receptors on adrenal cell apoptosis. We studied this issue infected with Tc C57BL/6 mice (B6) and mice deficient in TNFR1 (R1) and Fas (lpr mice). Controls were inoculated with saline solution (Co). Data was obtained at day 17 post-infection and expressed as mean \pm SEM (n=5/group). Histological evaluations showed increased values of adrenal apoptotic index (AI) in all infected groups, despite Tc-lpr displayed a minor AI compared with Tc-B6 and Tc-R1 (AI%; number of apoptotic bodies/total cell number \times 100); Tc-B6: 5.0 \pm 0.4*; Tc-R1: 5.0 \pm 0.5*; Tc-lpr: 1.2 \pm 0.2*#&. Caspase 8 activity was enhanced in Tc-B6 group compared to Tc-R1 and Tc-lpr mice (Relative activity; Tc-B6/Co-B6: 0.85 \pm 0.07, Tc-R1/Co-R1: 0.60 \pm 0.08#, Tc-lpr/Co-lpr: 0.68 \pm 0.07#). Caspase 3 activity was augmented in all infected groups compared to their respective Co group (p<0.05), but without differences between infected ones. Adrenal lipoperoxidation (LP) were also evaluated as a signal of oxidative stress-induced apoptosis by HPLC. LP was only observed in the Tc-R1 group. In addition, Bax expression was diminished in Tc-lpr compared to the rest of infected mice (p<0.05). *p<0.05 vs uninfected counterparts, #p<0.05 vs Tc-WT, &p<0.05 vs R1. Ours results showed that adrenal apoptosis are mainly triggered by Fas pathway. In R1 mice the results suggest that mechanisms inducing LP triggered apoptosis during infection.

338. (548) TWO NEW ANTIGENS IMPROVE ACELLULAR PERTUSSIS VACCINES EFFICACY AGAINST NOVEL CIRCULATING *B. PERTUSSIS* STRAINS

Álvarez Hayes, Jimena; Perazzo, Gerónimo; Rodríguez, María Eugenia
Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)-UNLP-CONICET

Whooping cough, caused by the bacterial pathogen *Bordetella pertussis* (*Bp*), is the most prevalent vaccine-preventable disease. Current acellular pertussis vaccines (Pa) are formulated with different combination of *Bp* virulence factors such as pertactin (Prn) among others. Probably due to vaccine immune selection, during the last few years clinical isolates not expressing Prn have been causing epidemic outbreaks. While Prn is not critical for infection, it is the only antigen present in Pa able to raise opsonophagocytic antibodies, a key protecting activity against *Bp* infection. Thus, the addition of new opsonin targets is increasingly needed to improve current vaccines. Recently, we characterized two new antigens, namely AfuA and IRP1-3, which are already in preclinical studies of pertussis vaccines. These two antigens are particularly interesting since they induce opsonic antibodies that increase significantly Pa protective capacity. In the present study we investigated whether this new vaccine formulation might be also more effective against this newly circulating clinical strain. By mean of flow cytometry and fluorescence microscopy we found that, as compared with anti-Pa anti-serum, opsonization with serum from mice vaccinated with Pa+AfuA+IRP1-3 (Pa*) significantly increased PMN phagocytosis of a Prn deficient mutant of *Bp* (*Bp* Δ Prn), a strain that mimics new clinical isolates genotype. Polymyxin B protection assay showed that bacteria opsonized with anti-Pa* anti-serum were efficiently killed by PMN. Finally, we evaluated the ability of Pa* vaccine to

protect mice against infection with *Bp* Δ Prn. We observed a significant increase in the protection level when mice were immunized with Pa* as compared with Pa immunization (p<0.05). Altogether these results suggest that a new generation of Pa including AfuA and IRP1-3 will not only provide higher protection against the wild type strain of *Bp* infection but also against new circulating *Bp* genotypes.

339. (823) ROLE OF PROGRAMMED DEATH LIGAND 2 IN MACROPHAGE ACTIVATION DURING *FASCIOLOA HEPATICA* INFECTION

Stempin, Cinthia C.; Falcon, Cristian R.; Aoki, María Del Pilar; Motrán, Claudia C.; Cerban, Fabio M.; Cervi, Laura
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBIC)-CONICET-UNC

Helminth infections induce an increase in co-inhibitory molecule programmed death ligand-2 (PD-L2) which is defined as a marker for alternatively activated macrophages and is involved in the inhibition of T cell proliferation. However, it is not known how PD-L2 modulates macrophage activation, which promotes fibrosis in helminth infections, whereas classical activation produces deleterious toxic metabolites. Previously we have observed that *F. hepatica* infection increases PD-L2 expression in F4/80+ cells. The aim of this study was to investigate the role of PD-L2 in the outcome of *F. hepatica* infection as well as in macrophage activation during experimental infection with the parasite. BALB/c WT and PD-L2 KO were orally infected with 8 *F. hepatica* metacercariae. Survival rate was evaluated and histological changes in liver tissues were determined by hematoxylin and eosin staining. PD-L2 KO mice showed increased mortality during *F. hepatica* infection (p<0.05). Histological analysis of infected liver from WT and PD-L2 KO mice showed tissue damage, being greater extent in PD-L2 KO mice. Fasciolosis, like other helminth infections, is associated with the induction of T-cell responses polarized to the Th2 subtype. Spleen mononuclear cells (SMC) from WT infected mice exhibited a polarized Th2 cytokine profile in response to *F. hepatica* antigens while SMC from PD-L2 infected mice showed a predominant Th1 response. On the other hand, to study macrophage activation, peritoneal cells (PC) were obtained at different time point of infection (24, 48 and 72 hs p.i) and stimulated with LPS plus INF γ or IL4 during 24 hs. Arginase activity and nitrite production were evaluated. The results show that, PC from PD-L2 KO infected mice exhibit reduced arginase activity and nitrite production at 24 hs p.i. Our data indicate that PD-L2 is involved in arginase/iNOS activation in macrophages which may play a protective role during *F. hepatica* infection.

340. (207) VIP AND VIP-INDUCED TROPHOBLAST FACTORS MODULATE NEUTROPHIL ACTIVATION

Calo, Guillermina¹; Sabbione, Florencia²; Papparini, Daniel¹; Ramhorst, Rosanna¹; Trevani, Analía²; Pérez Leirós, Claudia¹
Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUBICEN)-CONICET-UBA¹ Academia Nacional de Medicina²

Trophoblast cells (Tb) interact with different maternal immune cell populations at early pregnancy promoting a local anti-inflammatory and tolerogenic response. Neutrophils (neu) are highly detected in human uterine tissues at the secretory phase and decrease in the first trimester of pregnancy. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a pleiotropic peptide with immunomodulatory effects through its action on VPAC1 and VPAC2 receptors. Our aim is to evaluate the effect of VIP and Tb derived factors on neu activation. Whole blood was obtained from healthy donors and neu purified on Ficoll-Trioyosom gradient and dextran sedimentation. VPAC2 receptors are expressed in neu and a trend increase of VPAC2 expression was observed after 4h incubation with conditioned media (CM) from human first trimester Tb (Swan-71 cell line). The effect was higher when neu were incubated with CM obtained from

Tb treated for 18h with 10 nM VIP (CM*VIP). VIP, CM and CM*VIP decreased neu activation induced by fMLP or PMA resulting in lower CD11b expression and lower release of reactive oxygen species determined by FACS. Both CM and CM*VIP increased the % of apoptotic neu compared to non treated neu ($P < 0.05$) determined by fluorescence microscopy with ethidium bromide and acridine orange. Moreover, CM and CM*VIP reversed the antiapoptotic effect of LPS (% apoptosis 18h $X \pm SE$ LPS: 35.0 ± 5.4 ; LPS+CM: 56.4 ± 9.5 ; LPS+CM*VIP: 53.7 ± 7.1 $P < 0.05$). This effect was confirmed by FACS with annexin V-FITC/propidium iodide. Finally, neu were incubated with PMA to induce NET release. VIP, CM and CM*VIP diminished PMA-induced DNA release compared to cells treated with PMA alone ($\mu\text{g/ml}$ $X \pm SE$ basal: 3.1 ± 0.4 ; PMA: 5.1 ± 0.5 ; PMA+VIP: 4.3 ± 0.4 PMA+CM: 3.8 ± 0.5 PMA+CM*VIP: 3.6 ± 0.5 ; $P < 0.05$). PMA-treated neu also showed lower elastase activity released. The effects of VIP and VIP-induced Tb factors on neu activation and apoptosis are consistent with the maintenance of an anti-inflammatory microenvironment during early pregnancy.

341. (380) NEUTROPHILS ENHANCE GAMMA DELTA T CELL ACTIVATION TRIGGERED BY ANTI-CD3 ANTIBODIES

Towstyka, Nadia Yasmín¹; Borge, Mercedes¹; Sabbione, Florencia²; Giordano, Mirta¹; Geffner, Jorge²; Trevani, Analía¹; Jancic, Carolina C¹

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS)-CONICET-UBA²

gd T cells act as early sensors of cellular stress and infection; they use both, the TCR and additional activating receptors (i.e. NKG2D, TLRs), to respond to stress and/or infection-induced ligands. Furthermore, gd T cells play an important role in linking the innate and adaptive immunity. gd T lymphocytes modulate the function of neutrophils; and growing evidence supports a critical role of gd T cells in the recruitment and activation of neutrophils at the sites of infection. We previously reported that neutrophils suppress gd T cell activation induced by the specific agonist HM-BPP, in a ROS-dependent manner. Now, we analyzed whether neutrophils were able to modulate the phenotype and function of human blood gd T cells activated by anti-CD3 antibodies. For this purpose, we analyzed the expression of T cell activation markers, CD25 and CD69 by flow cytometry and the production of IFN- γ by ELISA. In this study, we found that the up-regulation of CD25 ($p < 0.05$, $n=6$) and CD69 ($p < 0.05$, $n=6$) expression, and the production of IFN- γ ($p < 0.05$, $n=5$) by activated gd T cells was increased in the presence of neutrophils. It was reported that IL-18 enhances the activation of stimulated gd T cells by different stimuli. Since neutrophils produce IL-18, we decided to evaluate the plausible role of this cytokine in the potentiation of gd T cell activation by neutrophils. Treatment of neutrophils with YVAD-CMK (a specific inhibitor of caspase-1) did not prevent the increase in gd T cell activation induced by neutrophils, showing that IL-18 was not involved. Our results indicate that neutrophils potentiate the activation of gd T cells stimulated through CD3/TCR pathway; contrasting with the inhibitory effect exerted by neutrophils when gd T cells are stimulated with HMBPP. The potentiation of gd T cell activation is not dependent on the presence of IL-18. We are currently investigating the mechanism/s involved in the enhancement of activated-gd T cell responses by neutrophils.

342. (401) IL-23 PROMOTES IFN-GAMMA SECRETION ON HUMAN NK CELLS AND PRIMES FOR IL-18 RESPONSIVENESS

Ziblat, Andrea; Raffo Iraolagoitia, Ximena Lucía; Spallanzani, Raúl Germán; Domaica, Carolina Inés; Torres, Nicolás Ignacio; Fuertes, Mercedes Beatriz; Zwirner, Norberto Walter

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) CONICET

IL-23 is a member of the IL-12 family of cytokines involved in pro- and anti-tumoral responses. NK cells express IL-23 receptor but the effects of IL-23, mainly produced by dendritic cells (DCs),

on human NK cells remain unknown. Previously, we demonstrated that IL-23 induced the secretion of IFN- γ but not cytotoxicity of human NK cells against Raji cells. Also, we showed that IL-23 induced a significant up-regulation of CD25 and had a priming effect for IL-18 induced secretion of IFN- γ . Therefore, the aim of this work was to further study the role of IL-23 on human NK cells, and the mechanism and signaling pathways underlying the IL-23-induced production of IFN- γ . We observed by flow cytometry that IL-23 induced a significant up-regulation of CD69 ($p < 0.01$). Moreover, we observed a significant up-regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of NK cells against Rituximab (RTX)-coated Raji cells ($p < 0.05$) that was not due to an up-regulation of CD16. Also, using different pharmacological inhibitors (SP600125, AG490, Ly294002, U0126, BAY11-7082, SB-202190, Rapamycin, Fludarabine), we observed that JNK ($p < 0.001$), PI3K ($p < 0.01$), MEK1/2 ($p < 0.01$), NF- κ B ($p < 0.01$) and m-TOR ($p < 0.001$) but not the p38 MAP kinase, JAK-STAT3 and STAT-1 pathways were involved in the IL-23-induced secretion of IFN- γ (assessed by ELISA). IL-23 induced IFN- γ secretion not only by resting but also by activated NK cells ($p < 0.01$). Moreover, we observed that LPS induced the secretion of IL-23 by DCs ($p < 0.05$) while blocking antibodies against IL-23 during DC-NK cell co-cultures induced secretion of significantly lower amounts of IFN- γ by NK cells ($p < 0.05$). Overall, our results indicate that IL-23 (alone or in combination with IL-18) exerts a potent stimulatory effect on IFN- γ secretion by NK cells, independently of the activation status of the cells. This could be relevant during the cross-talk with DCs and the onset of adaptive immunity.

343. (442) CURCUMIN MAY HALT THE PROGRESSION OF EXPERIMENTAL NAFLD BY PREVENTING INFLAMMASOME-ASSOCIATED GENES EXPRESSION

García, Cecilia C.¹; Inzaugarat, María Eugenia¹; Ferro, Florencia¹; Alegre, Nadia Soledad¹; Wald, Miriam²; Chernavsky, Alejandra Claudia¹

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-UBA²

Background: Curcumin (Cur) is an antioxidant/anti-inflammatory polyphenol able to prevent metabolic alterations of experimental nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Activation of NLRP3 inflammasome (Inf) is involved in some models of NAFLD. Aim: to evaluate if high fat diet (HFD) induces the expression of NLRP3-associated genes in correlation with liver injury and biochemical alterations, and if Cur prevents the upregulation of Inf-associated gene expression. Methods: C57BL/6 male mice were fed normal chow (NC) or HFD (10-16 mice/group). After 4 weeks of feeding, Cur (2g/kg diet) was co-administered to half of the NC-fed and HFD-fed mice respectively. After 23 weeks of treatment an intraperitoneal glucose intolerance test was performed and serum nonesterified fatty acids were determined. Liver tissues were processed for histological and gene expression assessment. NLRP3, ASC, caspase-1 (Casp-1), IL-1b and IL-18 mRNA expression was analyzed by Real-Time PCR. Fold-change values were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Two-ways ANOVA with Bonferroni's post-test and Spearman correlations were used. Results: Casp-1 expression was increased in HFD-fed mice (vs. NC, $p < 0.05$) and Cur treatment prevented its upregulation ($p < 0.05$). Tendencies to higher values for NLRP3 and to Cur's negative modulation were observed in the HFD group. Casp-1 ($p=0.0218$, $r=0.4444$), NLRP3 ($p=0.0083$, $r=0.5287$) and ASC ($p=0.0295$, $r=0.4291$) expression was found positively correlated with liver injury scoring. Systemic glucose intolerance was positively correlated with liver NLRP3 expression ($p=0.0207$, $r=0.5261$). Serum nonesterified fatty acids were negatively correlated with Casp-1 ($p=0.0249$, $r=-0.4825$), ASC ($p=0.0244$, $r=-0.4996$), NLRP3 ($p=0.0390$, $r=-0.4532$) and IL-1 β ($p=0.0298$, $r=-0.4656$) liver expression. Conclusion: NLRP3 Inf could be involved in HFD-induced experimental NAFLD. Thus, our findings may lead to a therapeutic strategy based on the use of Cur aiming at halting NAFLD progression.

344. (446) IDENTIFICATION OF GENES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* INVOLVED IN IMMUNOMODULATION USING REPORTER INTESTINAL EPITHELIAL CELLS

Romanin, David Emmanuel¹; Perelmuter, Karen²; Carbo, Natalia²; Garrote, Graciela Liliana³; Aguilar, Pablo Sebastián²; Bollati-Fogolin, Mariela²; Rumbo, Martín¹
Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-UNLP-CONICET¹ Institut Pasteur de Montevideo² Centro de Investigación y Desarrollo en Biotecnología de Alimentos (CIDCA)-UNLP-CONICET³

In previous works we have demonstrated the ability of different yeast to modulate the inflammatory response triggered by diverse innate immunity agonists *in vitro*. This capacity is dependent on yeast viability. In the present work *Saccharomyces cerevisiae* single-gene mutants were used to evaluate the role of those genes in the immunomodulatory effect. We used a stably transfected cell line that reports epithelial inflammation based on human intestinal enterocyte HT29 cells with GFP as reporter driven by a NF-κB dependent artificial promoter. From a collection of approximately 5000 non-essential gene deletion mutants, forty were selected according to their described phenotypes in *Saccharomyces Genome Database* (SGD). The selection of mutants was focused on genes involved in yeast metabolism, cell wall synthesis, protein glycosylation and membrane transport. Most of the mutants analyzed showed no altered capacity to modulate epithelial response activation. However, the mutant yeast YER044C, with a deletion on gene *ERG28* coding for an enzyme located in the endoplasmic reticulum which is involved in ergosterol biosynthesis, shows a significant lower immunomodulatory capacity compared to the parental haploid strain By4741, using TNF-α as proinflammatory agonist (p<0.05, ANOVA + Bonferroni's multiple comparison test). On the other hand, two mutants with significantly higher modulation capacity were identified: YGR032W and YJL078C, with mutations on the catalytic subunit for the beta 1,3 glucan synthase (coded in the gene *GSC2*) and a protein coded by the gene *PRY3* which participates in the transport of acylsterols respectively. Together these results set the bases for the study of the molecules present in yeast that are responsible for the interaction between microorganism and epithelial cells and the mechanistic basis of epithelial proinflammatory modulation.

345. (470) A NANOSTRUCTURE FROM ASCORBYL PALMITATE BASED-ADJUVANT BOOSTS ADAPTIVE IMMUNITY BY INDUCING AN INFLAMMATORY EFFECT AT THE INJECTION SITE, BOTH PROPERTIES REQUIRE THE ADAPTOR PROTEIN MYD88

Sánchez Vallecillo, María Fernanda¹; Ullio Gamboa, Gabriela²; Minguito De La Escalera, María³; Palma, Santiago D²; González-Cintado, Leticia³; Chiodetti, Ana Laura¹; Aguirre, María Virginia¹; Luque Buteler, Carolina¹; Morón, Gabriel¹; Allemandi, Daniel A²; Ardavín, Carlos³; Pistoiresi-Palencia, María Cristina¹; Maletto, Belkys A.¹
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)- CONICET-UNC¹ Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA)-UNC² Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Madrid, España³

The approved adjuvants for human use induce weak cellular immune responses in subunit vaccines. Thus, the development of new adjuvant strategies is critical. Recently, we have showed that a nanostructure from 6-O-ascorbyl palmitate (Coa-ASC16), used as a platform to formulate CpG-ODN, improved notably its adjuvanticity; one of the possible mechanisms involved is the controlled release given by Coa-ASC16 formulation. In addition, Coa-ASC16 elicits local inflammatory response but how it is sensed is little understood. Here, we begin to understand the underlying mechanisms on the interaction between Coa-ASC16 and immune system after i.p injection. We previously found that the inflammatory response elicited by Coa-ASC16 (neutrophils and monocytes recruitment and IL-1β, IL-6, IL-12) was dependent on MyD88 adaptor protein. TLR2, TLR4 and TLR7 were dispensable

for this inflammatory effect. The administration of Coa-ASC16 was associated with the local release of double-stranded DNA (Coa-ASC16 vs control 2.5±0.5 vs 0.5±0.1 (μg/mL) (p<0.05)). In mice injected locally with DNase or in *Tlr9*^{-/-} mice, the IL-6 production was inhibited compared to control (pg/mL: 442±167 vs 2231±378 (p<0,001) and 272.4±0.6 vs 1415±322 (p<0.01), respectively). Coa-ASC16 inflammatory activity is independent of NLRP3 signaling. In addition, Coa-ASC16 has itself adjuvant activity when is administrated with OVA antigen, which in turn requires MyD88 and IL-6 cytokine (*Myd88*^{-/-} vs wt mice: IgG2c: 0.2±0.2 vs 1.6±0.2 (p<0,001), IFN-γ (pg/ml): not detected vs. 931±223; *Il6*^{-/-} vs wt mice: IgG2c: 0.1±0.1 vs 2.8±0.5 (p<0.01), IFN-γ (pg/ml): 37±37 vs 254±104 (p<0.05)). Mice immunized with OVA were not reactive. Our results show a connection, given by IL-6 cytokine, between the innate and the adaptive response. Coa-ASC16 has not only a platform capacity but also an adjuvant function. Understanding the mechanisms of action of this biomaterial is important for development of safe and effective vaccines.

346. (515) THE HISTIDINE RICH GLYCOPROTEIN DELAYS HUMAN MONOCYTE'S APOPTOSIS

Dantas, Ezequiel; Merlotti, Antonela; Ernst, Glenda; Varese, Augusto; Erra Díaz, Fernando; Pereyra, Pehuén; Sabbaté, Juan; Geffner, Jorge
Instituto de Investigaciones Biomedicas en Retrovirus y Sida (INBIRS)-CONICET-UBA

The histidine rich glycoprotein (HRGP) is a high concentration serum protein (100-150 mg/ml) produced by the liver. It is capable to interact with different molecules such as the hem group, Zn²⁺, plasminogen, fibrinogen, trombospondin, heparan sulfate and IgG. It's most characterized activities have been related to the regulation of the complement and haemostasis cascades. At the present work we analyze HRGP's capability to modulate human monocyte's apoptosis. HRGP was purified from fresh human plasma by Ni-NTA immobilized-metal affinity chromatography (IMAC). Monocytes were purified from peripheral blood by conventional methods with at least 93% purity. Biotinylated HRGP's binding to monocytes was assessed by flow cytometry. Monocyte's apoptosis was measured by flow cytometry using annexin V/ Propidium iodide. We observed that HRGP (100 μg/ml) binds significantly to monocytes (Median Fluorescence Intensity= 81 ± 22 vs 731 ± 112, isotype vs HRG, media ± ES, n=4, p<0.01) and dramatically inhibited their apoptosis after 48 h of culture (% apoptosis 61 ± 9 vs 12 ± 5, control vs HRG, p<0.01, n=8). A similar inhibitory effect was obtained using recombinant HRGP (100 μg/ml): 56 ± 12 vs 18 ± 6, control vs HRG, n=3. The adsorption of HRGP's preparations to polymyxin B coupled to sepharose did not prevent the anti-apoptotic effect of HRGP, ruling out a role for contaminant LPS. Monocytes represent a short term living cell. Our results suggest that HRGP promotes monocyte's survival. Ongoing studies are been done to assess the possibility that HRGP might modulate monocyte's functional profile or their capability to differentiate into macrophages or dendritic cells.

347. (121) GLYCOPHENOTYPE AS POTENTIAL BIOMARKER OF TUMOR CELLS, SURROUNDING PARENCHYMA AND IMMUNE CELL INFILTRATE IN HUMAN RENAL CARCINOMAS

Almada, Evangelina¹; Domaica, Carolina Inés¹; Raffo Iraola-goitia, Ximena¹; Spallanzani, Raúl Germán¹; Ziblat, Andrea¹; Secin, Fernando²; Rovegno, Agustín²; Rabinovich, Gabriel Adrián¹; Zwirner, Norberto W.¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹. CEMIC²

Renal cell carcinoma (RCC) is the most important type of adult renal epithelial neoplasm, accounting for 90% of all renal malignancies and that shows high mortality. RCC is unresponsive to traditional chemotherapies, highly radiation resistant, and lacks the genetic hallmarks of solid tumors. Also, no specific molecular prognostic marker has been recommended for routine clinical use. Carbohydrate expression pattern (glycophenotype) changes

play crucial roles in carcinogenesis in other cancer types such as breast cancer, and the glycophenotype of the cell may confer susceptibility to immunoregulatory effects of galectins. Therefore, the aim of this work was to analyze the glycophenotype of RCC, surrounding tissue (parenchyma, P) and the immune cell infiltrate (ICI, CD45⁺ cells) using 10 samples from nephrectomies of human patients. By lectin binding assay (binding of biotinylated MAL-II, PNA, LEL, PHA-L and SNA lectins, detection with Streptavidin-PE and flow cytometry analysis) and expression clustering with Genesis we observed that 1) the glycophenotype of RCC, P and ICI was quite different; 2) RCC displayed low binding of SNA and high binding of MAL II, indicating that sialic acid is mostly displayed in a2,3 and not in a2,6 position, which is associated with poor prognosis in other cancer types; 3) RCC and ICI showed high binding of LEL, suggesting the existence of high poly-Lac-Nac repeats with potential galectin-1 binding sites; 4) PHA-L and PNA binding were mostly detected in ICI, indicating that complex N-glycans (branching) core-2-O-glycans are mainly associated with ICI. Therefore, the differential glycophenotype of tumor cells (LEL⁺PHA-L⁻SNA⁻), surrounding parenchyma (LEL⁺PHA-L⁻SNA⁻) and ICI (LEL⁺PHA-L⁻SNA⁺) may constitute useful biomarkers to distinguish between these cells. Also, such differential glycophenotype may determine the susceptibility to galectin-driven regulatory circuits and influence cancer immunoediting.

348. (195) DEPLETION IN VIVO OF MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS BY GEMCITABINE, ALLOWS THE ESTABLISHMENT OF AN ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE

Abrigo, Mariana¹; Porte Alcón, Soledad²; Karas, Romina Alejandra¹; Diament, Miriam¹

Instituto de Oncología Angel H. Roffo¹ Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-oncología, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA²

Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are involved in the neoplastic development associated immunosuppression through the production of reactive oxygen species and the expression of high levels of myeloperoxidase enzyme (MPO), among others. MDSCs accumulate in the tumor microenvironment, migrate to lymphoid organs and exert immunosuppressive functions. In diverse mouse tumor models, in vivo treatment with gemcitabine (GEM) reduced the splenic MDSC population. We previously described that BALB/c mice bearing the murine lung adenocarcinoma LP07 (P-LP07), show an increase of MDSC in the spleen and that their depletion with GEM (60 mg/kg) treatment (P+GEM) established an effective antitumor response. Our objective was to determine whether depletion of MDSC in P-LP07, by treatment with GEM, may promote the establishment of an effective immune response by activating splenocytes and reversing immunosuppression induced by MDSC. Using a delayed-type hypersensitivity assay, it was determined that treatment with GEM to P-LP07 mice, reversed the response inhibition when inoculated LP07 formalinized cells (5x10⁵/0.05ml) in hind footpads (n=5, P-LP07 vs P+GEM, p<0,001). By adoptive transfer of splenocytes from P+GEM, LP07 tumor growth was inhibited in syngeneic mice, while splenocytes from P-LP07, normal (N) or normal mice treated with GEM (N+GEM) did not inhibit tumor growth (n=6, P+GEM vs P-LP07, N+GEM, N, p<0.01). By measuring MPO activity, splenocytes from P-LP07 mice showed a greater peak activity than P+GEM and N groups (P-LP07 vs P+GEM, N, p<0.0001). The western blot assay determined a higher phosphorylation of STAT3 in P-LP07 splenocytes over P+GEM splenocytes. The in vivo depletion of MDSC by GEM treatment in LP07 tumor bearing mice, allows activation of splenocytes, which may establish a more efficient antitumor immune response, probably due to a less STAT3 phosphorylation.

349. (205) EL ÁCIDO HIALURÓNICO REVIERTE LA ACCIÓN ANTI-PROLIFERATIVA DE IMATINIB EVITANDO LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Díaz, Mariángeles; Lompardía, Silvina; Mascaró, Marilina; Pibuel, Matías; Papademetrio, Daniela; Álvarez, Éliada; Hajos, Silvia

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

El ácido hialurónico (AH), principal glicosaminoglicano de la matriz extracelular, cumple diversas funciones fisiológicas. Al interactuar con sus receptores, CD44 y RHAMM, es capaz de activar vías de señalización como PI3K/Akt y MAPK. En tumores sólidos el incremento de los niveles de AH correlaciona con menor sobrevida si bien es poco lo que se sabe de su implicancia en oncohematología. Resultados de nuestro laboratorio indican que líneas celulares humanas de leucemia mieloide crónica (LMC), K562 y Kv562, sintetizan AH para impedir la inducción de senescencia y resistir a la Vincristina. Dado que Imatinib es la droga de primera línea en LMC, resultó de interés estudiar si el AH modula los mecanismos biológicos regulados por esta droga. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de Imatinib en combinación con AH sobre la proliferación celular, la inducción de senescencia y apoptosis, y la modulación de pAkt y pERK en las células K562 y Kv562. La proliferación celular se evaluó mediante la incorporación de ³H-T. Se observó que el AH revirtió el efecto anti-proliferativo de Imatinib en ambas líneas celulares (p<0,01). La senescencia se analizó mediante la actividad de SA-β-gal y la presencia de SAHF. El AH evitó la inducción de senescencia producida por Imatinib en las células K562 y Kv562 (p<0,01). El estudio de la apoptosis se realizó mediante CF (AnexinaV-PE-7AAD y pico subG1) y microscopía de fluorescencia (DAPI). El AH no moduló la apoptosis inducida por Imatinib (p>0,05). Mediante WB se analizó la relación de pAkt/Akt y de pERK/ERK observándose que en ambas líneas celulares el AH revirtió la disminución de los niveles de pAkt/Akt inducida por Imatinib (p<0,01). El mismo efecto se observó para la relación pERK/ERK pero sólo en las células K562 (p<0,05). Concluimos que el AH revierte la acción anti-proliferativa de Imatinib evitando la inducción de senescencia. Dicho efecto estaría mediado por la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y MEK/ERK.

350. (213) DIFFERENTIAL EFFECT OF IFN-I ON AUTOPHAGY MODULATION IN TUMOR PANCREATIC CELLS

Papademetrio, Daniela L.; Cavaliere, Victoria; Costantino, Susana N; Álvarez, Éliada

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Prof. Dr. Ricardo Margni (IDEHU)-CONICET-UBA. Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Infiltrating ductal adenocarcinoma of the pancreas (PDA) accounts for over 95% of all exocrine pancreatic malignancies, with a median survival for patients is 4-6 months. IFN-I exhibit a variety of biological effects which are different from those on viral replication, such as antitumor activity. IFN-I are widely expressed and secreted as the first line of defense against several types of tumors. They have been used for the treatment of more than 14 types of cancer, including some hematological malignancies and certain solid tumors. In pancreatic tumors, autophagy process constitutes a resistant mechanism to several pro-apoptotic stimuli such as treatment with gemcitabine. The aim of this study was to investigate the effect of IFN-I on autophagy process and its influence on gemcitabine cell response on MIAPaCa-2 cell line. For that, we evaluate the modulation of autophagy levels by dying with CytoID Green and LC3 levels by western blot. We observed that IFNα induced autophagy meanwhile IFNβ inhibited this process. Gemcitabine induced moderated apoptotic death of MIAPaCa-2 cells, assayed by TUNEL. When cells are pretreated with IFNα, apoptosis induced by gemcitabine decreased in a 50% at all doses tested (p<0,001). By contrast, the pretreatment with IFNβ increased apoptosis in a 35% (p<0,001) reaching values of 65.1±6.5% of apoptotic cells. According to these result, Beclin 1/Bcl-XL ratio was increased by treatment with IFNα and decreased by IFNβ. In addition, PARP cleavage was decreased by treatment with IFNα + Gemcitabine and increased by IFNβ + gemcitabine. Taking these results together, we propose that IFNα and IFNβ have opposite effects on autophagy. The inhibition of this process by IFNβ sensitized MIAPaCa-2 cells to the pro-apoptotic effect of gemcitabine. By contrast, IFNα enhance the protective effect of autophagy inhibiting the apoptotic effects of gemcitabine.

351. (287) STUDY OF SECRETOR STATUS AND FUT2 GENE IN PATIENTS WITH UROGENITAL TUMOURS

Ensínck, María Alejandra¹; Lebensohn, Berta Natalia¹; Racca, Liliana¹; García Borrás, Silvia¹; Cotorruelo, Carlos^{1,2}; Biondi, Claudia¹

Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario¹ CONICET²

Histo-blood group ABH antigens are the major allogeneic antigens in humans and they are widely distributed in human tissues. Their presence not only is limited in blood cells but also is found in various epithelial cells and in secretions. Since most human cancers originate from epithelial cells, changes in blood group antigens are an important topic in human tumor immunology. The aim of this work was to investigate the polymorphism of *FUT2* gene and secretor status using biochemical and molecular methods in patients with urogenital tumors. In total 118 subjects were examined, 48 individuals who had prostate and bladder tumors and 70 which showed no demonstrable pathology constituting the control group. Saline erythrocyte suspensions were used for serological studies. In order to establish the secretor status we analyzed their saliva by the agglutination inhibition technique using monoclonal antibodies anti-A, anti-B and lectin *Ulex europaeus*. We analyzed the *FUT2* polymorphism by ASO-PCR (allele specific oligonucleotide) with specific primers for G428 allele and the wild type allele of *FUT2* gene. 77.1% (n=54) of the healthy individuals studied possessed the *Se* gene (*FUT2*) that governs the secretion of water-soluble ABH antigens into saliva. These secreted antigens can be demonstrated in saliva by agglutination inhibition tests with ABH antisera and molecular biology through analysis of the *FUT2* gene. 58.3% (n=28) of the patients with urogenital cancerous were non-secretors, in contrast with the healthy population (22.8%; n=16). We observed association between the secretor status and these urogenital cancer (p<0.0001). The studies of patients with urogenital cancer, in which non-secretor status predominates, show that this status appears to be an associated risk marker for the development for this cancer (RO = 4.7, IC 95% (2.1; 10.5). Further follow-up studies are required to clarify the role of predictive markers of risk in precursor lesions of urogenital cancer.

352. (316) BRUCELLA SPP. LUMINAZE SYNTHASE (BLS) INDUCES A PROTECTIVE RESPONSE IN MICE WITH B16 MELANOMA

Fariás, Ana; Rossi, Andrés Hugo; Fernández, Javier Eduardo; Goldbaum, Fernando Alberto; Bonomi, Hernán Ruy; Berquer, Paula Mercedes

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA), Fundación Instituto Leloir, CONICET

BLS is a highly immunogenic decameric protein. It is possible to insert foreign proteins at its 10 N-termini and these chimeras are very efficient to elicit systemic and oral immunity without adjuvants. BLS induces the cross presentation of OVA₂₅₇₋₂₆₄ and also the activation of CTLs and a specific cytotoxic response via TLR4. In this work we study the effect induced by BLS in TLR4-expressing B16 melanoma. C57BL/6J mice were immunized with 50, 100 or 200 µg of BLS or BLS-OVA and 35 days later were sc inoculated with 2.5x10⁵ OVA-expressing B16 melanoma (B16-OVA). Tumor development was monitored by measuring tumor perpendicular diameters with a caliper (vol= d²×D×0.5). All doses of BLS and BLS-OVA induced a significant inhibition of tumor growth (n=10, p<0.05) and 50% of mice immunized with 200 µg did not develop a visible tumor. For treatment experiments, mice were immunized with 100 µg of BLS or BLS-OVA 3 days after the inoculation of B16-OVA. Both treatments induced a significant delay in tumor growth and a significant increase in survival (n=12, p<0.05). Similar results were obtained in TLR4 deficient mice (n=6, p<0.05). These results show that BLS has a protective role in mice with B16 melanoma and suggest that this effect is not dependent on mice TLR4. Results suggest that anti-OVA specific response does not make a significant contribution in this model. To study if BLS has a direct effect on tumor cells, B16 cells were preincubated *in vitro* with PBS (nontreated), BLS or LPS. After 48h cells were

washed and sc inoculated in C57BL/6J mice. We determined that cells were not dead or apoptotic (BD Biosciences Apoptosis Detection kit). Tumors induced by BLS-stimulated B16 cells had an inhibited growth and survival was increased compared with nontreated and LPS-stimulated groups (n=10, p<0.05) In BLS group, 40% of mice did not develop tumors. These results show that BLS has a direct effect in tumor cells and also a protective antitumoral effect in immunized mice.

353. (374) CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL) B CELLS DELAY NEUTROPHIL APOPTOSIS IN VITRO

Podaza, Enrique^{1,4}; Borge, Mercedes^{1,4}; Sabbione, Florencia^{1,4}; Colado, Ana¹; Fernández Grecco, Horacio³; Cabrejo, María³; Bezares, Fernando²; Trevani, Analía^{1,4}; Gamberale, Romina^{1,4}; Giordano, Mirta^{1,4}

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-ANM¹ Hospital T. Álvarez² Sanatorio Méndez³ CONICET⁴

Leukemic B cells from CLL patients have the ability to modify macrophage and T lymphocyte functions as a way of promoting their own survival. Recent evidence indicates that neutrophils, the most abundant leukocyte in blood, can also be reprogrammed by tumor cells. The aim of the present study was to determine whether CLL cells are able to modify the viability and functional capacity of neutrophils. Polymorphonuclear cells (>95% neutrophils) isolated from healthy donors (3-4 x 10⁶/ml) were cultured with peripheral blood mononuclear cells from CLL patients (> 93% leukemic B cells, <1% CD14⁺ cells) for 24, 48 and 72 hs. Three different neutrophil:CLL cell ratios were assessed, 2:1, 1:1 and 1:2. Cell death was analyzed by flow cytometry using Annexin V and propidium iodide staining. We found that CLL cells delayed neutrophil apoptosis in all the conditions evaluated. Percentages of cell death of neutrophils alone versus neutrophils plus CLL cells at 1:1 ratio were: 54.5 ± 12,0 vs. 24.2 ± 12,4 at 24 h; 72.1 ± 14.9 vs. 47.7 ± 5.9 at 48 h and 98.5 ± 1,1 vs. 72.3 ± 7,1 at 72h (n=6, p<0.01). Purified B cells from healthy donors were unable to delay neutrophil apoptosis (n=3). To evaluate the involvement of soluble factors in CLL effects, we used Transwell inserts (pore 0.4 µm) to separate neutrophils from CLL cells. Lower levels of protection were found when cell contact was prevented suggesting the involvement of both, soluble and membrane signals in these effects. We evaluated the phagocytic capacity of neutrophils before and after 72 hs incubation with CLL cells using zymosan-FITC particles and flow cytometry. Viable neutrophils at both times displayed comparable levels of phagocytosis (MFI: 4353 ± 1537 vs 4293 ± 1874, initial vs 72h co-culture, n=3). In conclusion, our results showed that CLL cells prolong the survival and functional activity of neutrophils. Experiments are in progress to compare neutrophils from healthy donors and CLL patients.

354. (237) AUTOPHAGY MODULATES CYTOKINE PRODUCTION IN MICROGLIAL CELLS

Bussi, Claudio; Arroyo, Daniela; Peralta Ramos, Javier; Gaviglio, Emilia; Iribarren, Pablo

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Introduction: Autophagy is an essential, homeostatic process by which cells deliver their cytoplasmic material, including soluble macromolecules and organelles, to lysosomes for degradation. Recent developments reveal a crucial role for the autophagy pathway and proteins in immunity and inflammation. They balance the beneficial and detrimental effects of immunity and inflammation, and thereby may protect against infectious, autoimmune and inflammatory diseases. Purpose: The aim of this study was to evaluate the modulatory effect of autophagy on the cytokine production in BV2 microglial cells. Experimental procedure: BV2 microglial cells were stimulated with TLRs ligands, such as PGN, Pam3 and LPS. Autophagy was induced before or after TLR stimulation by rapamycin or trehalose. Cytokines were determined in cell-free culture supernatants by ELISA. Autophagy pathway was blocked using 3-Methyladenine (3-MA), an inhibitor of type III Phosphatidylinositol 3-kinases (PI-3K). Results: Our preliminary results

show that stimulation of autophagic pathway downregulates the production of the cytokines IL1b, IL-6, IL-10 and TNF α ($p < 0.01$). This effect was inhibited when cells were pre-treated with 3-MA ($p < 0.01$). Interestingly, when 3-MA was added to cell cultures before TLR stimulation, an increase in the release of pro-inflammatory cytokines was observed compared with TLR stimulation alone ($p < 0.01$). However, no changes were detected in IL-10 determination. Conclusions: The induction of autophagy negatively affected the cytokine release by microglial cells. In addition, the inhibition of PI-3K showed a synergistic effect with TLR stimulation in the release of pro-inflammatory cytokines. These results suggest that the class III PI-3K pathway plays an important role in modulating inflammatory mediators. Additional studies are needed to better understand the molecular mechanisms that mediate this process.

355. (273) PROINFLAMMATORY AND PROOSTEOCLASTOGENIC STATE IN PATIENTS WITH GAUCHER DISEASE

Mucci, Juan¹; Delpino, Victoria²; Rozenfeld, Paula¹
Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP¹Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA²

The aim of our work was to evaluate the proinflammatory and proosteoclastogenic environment in circulation of Patients with Gaucher disease. The study was performed using PBMC from patients under ERT. The percentage of two different monocyte subsets and the production of proinflammatory cytokines were evaluated by flow cytometry. To evaluate the proosteoclastogenic state PBMC from patients were cultured in the presence of M-CSF and RANKL and osteoclast differentiation and activity were assayed. These experiments were carried out in the presence of Velaglugerace to study the effect of ERT. To evaluate the presence of secreted molecules that induced osteoclast differentiation conditioned media (CM) prepared from patients PBMC was used in osteoclastogenesis induction assays and the involvement of TNF- α and RANKL was evaluated using neutralizing molecules. The percentage of the proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocyte subset was statistically higher on patients ($p < 0.001$) and an increased production of proinflammatory cytokines was observed for T cells and monocytes in patients. Osteoclastogenesis was higher in patients ($p < 0.01$) and in vitro Velaglugerace treatment reduced osteoclast levels and activity to control levels. The induction of osteoclast differentiation by CM was higher by patient's CM compared to healthy controls ($p < 0.001$) and this effect partially involved TNF- α and RANKL. In conclusion we have shown a potential involvement of two monocyte subsets in the proinflammatory state present in patients with Gaucher disease. PBMC from patients showed higher osteoclastogenesis which is reduced by in vitro Velaglugerace treatment. TNF- α and RANKL would be involved in the potential proosteoclastogenic state in patients.

356. (282) PRO-INFLAMMATORY EFFECT OF VOLCANIC ASH IN A COLITIS MODEL

Orsini Delgado, María Lucía¹; Papa Gobbi, Rodrigo¹; Sambuelli, Alicia²; Gil, Anibal²; Negreira, Silvia²; Huernos, Sergio²; Goncalves, Silvina²; Bellicoso, Maricel²; Chavero, Paula²; Tirado, Pablo²; Docena, Guillermo H¹
Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP¹ Sección Enfermedades Inflamatorias, Hospital Bonorino Udaondo²

It is widely accepted the role of environmental factors in the pathogenesis of Inflammatory Bowel diseases (IBD): ulcerative colitis (UC) and Crohn's Disease (CD). Recently, increased industrial pollutants and particulate matter have been related with an early debut and hospitalization of IBD. We hypothesized that volcanic pollution triggers severe IBD flares. In this work we studied the effect of volcanic ash (Puyehue, Neuquén) in the drinking water of a colitis model. BALB/c mice received drinking water with or without volcanic ash for 14 days. On day 7 mice were intrarectally administered with different inflammatory stimuli: TNBS, Flagellin (FluC) or ethanol (EtOH), as control. Weight was daily monitored and on day 14 animals were sacrificed. Colon was removed and studied (weight, length, histology and cytokine expression by qPCR

- IL1 β , IL6, TNF α and IFN γ). We found that the pro-inflammatory stimuli induced a marked weight loss in mice receiving drinking water with ash compared with mice receiving only drinking water or treated with EtOH. Colon showed a greater ratio weight/length in animals that received ash compared with controls (28.4 ± 4.4 vs 31.3 ± 2.4 for EtOH vs EtOH+ash, 28.3 ± 0.1 vs 33.7 ± 4.2 for TNBS vs TNBS+ash and 24.7 ± 4.01 vs 31.5 ± 5.9 for FluC vs FluC+ash). The histologic activity index defined with H&E staining was: 1 vs 3 for EtOH vs EtOH+ash; 3.2 ± 0.3 vs 4.3 ± 0.6 for TNBS vs TNBS+ash and 2.3 ± 0.6 vs 4 for FluC vs FluC+ash, with an increased cellular infiltration of the intestinal wall and vascularization in mice that received ash compared with controls. We found that TNF- α and IFN- γ expression was significantly increased in mice that received ash compared with controls ($p < 0.05$). In conclusion, the oral administration of volcanic ash in mice with TNBS- or FluC-driven colitis induced an increased inflammation and vascularization in the colonic mucosa and submucosa, thus suggesting that volcanic ash could exert a pro-inflammatory effect in patients with IBD.

357. (404) RELATIONSHIP AMONG NEUTROPHIL COUNTS, AUTOANTIBODY LEVELS AND DISEASE PROGRESSION IN SYNOVIAL FLUIDS FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Gorlino, Carolina Virginia¹; Dave, Mabel Noemí¹; Tamashiro, Héctor²; Blas, Rodrigo³; Munarriz, Alicia⁴; Pistorresi-Palencia, María Cristina⁵; Di Genaro, María Silvia¹
Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMBIO)-CONICET-UNSL¹ Clínica Bolívar² MEDIC³ Instituto Privado Cenyr⁴ Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC⁵

Rheumatoid arthritis (RA), one of the most frequent autoimmune disease, is a chronic inflammatory rheumatism hallmarked by progressive and irreversible joint destruction. Among the numerous autoantibodies associated with RA, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (ACPA) are now recognized as the most disease-specific. The aim of this study was to determine the relationship between neutrophil infiltration into inflamed joints and the presence of ACPA in RA patients. Synovial fluid (SF) samples were obtained from 42 patients (Male/Female: 8/34; mean age: 53 ± 13 years) who full-filled the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) RA classification criteria. All patients gave informed consent and the protocol of the study was approved by the ethic board of IBYME (CE 003-2/2013). Disease activity was evaluated by 28-joint count Disease Activity Score (DAS-28) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined by Westergren method. Immunoglobulin G (IgG) ACPA were measured using QuantaLite CCP3 ELISA kit and total IgG levels were determined by radial immunodiffusion assay. We found that neutrophil numbers infiltrating inflamed joints correlated positively with DAS-28, suggesting that the presence of high numbers of these cells is related with severe disease manifestations ($p < 0.05$). Although SF-total IgG levels were negatively correlated with disease activity ($p < 0.05$), the ratio of ACPA/total IgG showed a positive correlation ($p < 0.05$), demonstrating that ACPA levels are increased in relation to total IgG concentrations in SF from patients with worse clinical manifestations. The findings of this study indicate a correlation among disease activity, neutrophil infiltration and levels of ACPA antibodies in inflamed joints of RA patients. We propose that neutrophil counts in SF, together with ACPA/total IgG determination, may serve as prognostic factor for RA progression.

358. (474) ALTA PREVALENCIA DE AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES INFECTADOS CON EL VIH. ASOCIACIÓN DE LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ANCA-MPO Y ASMA CON TÍTULOS VIRALES ELEVADOS Y BAJOS NIVELES DE CÉLULAS T CD4+

Navarta, Luz Marina; Espul, Carlos Alberto; Acosta-Rivero, Nelson
Hospital Central Mendoza

Introducción: El estudio de la prevalencia de autoanticuerpos en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia hu-

mana (VIH) es relevante para determinar opciones terapéuticas óptimas, diagnóstico e investigar los mecanismos de inducción de enfermedades autoinmunes relacionadas con la infección viral. Objetivo: Estudiar la prevalencia de autoanticuerpos en 117 pacientes adultos con infección por el VIH y su relación con los niveles de células T CD4+ y títulos virales. Resultados: Se detectó una prevalencia alta de autoanticuerpos en los pacientes infectados con el VIH (74,36%). Se observó una mayor frecuencia de factor reumatoideo (FR), anticuerpos anti músculo liso (ASMA), antinúcleo (ANA), anticoplasma de neutrófilos con especificidad anti mieloperoxidasa (ANCA-MPO). También, la infección por el VIH se asoció con la detección simultánea de dos o más autoanticuerpos como FR-ASMA y FR-ANCA. Resulta interesante destacar que la detección de ANCA y la detección simultánea de ANCA y ASMA se asociaron tanto con la presencia de altos títulos virales como con bajos conteos de células T CD4+ en los pacientes estudiados. Conclusiones: Se observó una alta prevalencia con detección simultánea de varios autoanticuerpos en la población estudiada de pacientes argentinos infectados con el VIH. Resultó interesante que ANCA-MPO y la detección simultánea de ANCA-MPO y ASMA se asociaron con la presencia de altos títulos virales y bajos niveles de células T CD4+. Estudios previos indicaron que estos autoanticuerpos se asociaron con bajos niveles de células T CD4+ y células T reguladoras en pacientes con VIH. Otros estudios también mostraron que ANCA-MPO pueden ser patogénicos y pro-inflamatorios y se asociaron con la infección sintomática por el VIH. Por esto sugerimos la necesidad de estudios adicionales para investigar los mecanismos inmunológicos y el papel de estos autoanticuerpos en la patogénesis de autoinmunidad asociada con la infección por el VIH.

- 359. (485) PROKARYOTIC EXPRESSION AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF INSULINOMA-ASSOCIATED TYROSINE PHOSPHATASE 2 (IA-2) FUSED TO THIOREDOXIN. EARLY APPLICATION IN THE DIAGNOSTIC SUPPORT OF AUTOIMMUNE DIABETES MELLITUS**
 Guerra, Luciano; Faccinetti, Natalia Inés; Trabucchi, Aldana; Iacono, Rubén Francisco; Poskus, Edgardo; Valdez, Silvina Noemí
Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) UBA-CONICET y Cátedra de Inmunología; Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Autoantibodies to IA-2 (IA-2A) are early markers of pancreatic autoimmunity, being useful in diagnostic support of Autoimmune Diabetes Mellitus. The aim of this work was to express properly folded IA-2 in order to develop non-radiometric immunoassays for IA-2A detection. The intracellular domain of IA-2 (IA-2_{ic}) was cloned into pTrxFus vector to obtain it fused to thioredoxin (TrxIA-2_{ic}). *Escherichia coli* Gl724 was transformed with pTrxIA-2_{ic} and cultured at 30°C. Protein expression was induced with tryptophan for 3 h; the soluble intracellular fraction was isolated and TrxIA-2_{ic} was purified by affinity chromatography. SDS-PAGE and Western Blot analysis were carried out. The ability of TrxIA-2_{ic} to compete with [³⁵S]IA-2 was assessed qualitatively by incubating 30 IA-2A(+) patients sera with the tracer in the presence of 0.2 µM TrxIA-2_{ic}. Quantitative competition assays with 4 IA-2A(+) patients sera were performed by adding TrxIA-2_{ic} (31 pM to 0.6 µM) to the Radioligand Binding Assay (RBA). Bridge ELISA employing TrxIA-2_{ic} and biotinylated TrxIA-2_{ic} with chemiluminescent detection, was developed using 24 IA-2A(+) sera from routine autoantibodies detection. Results were expressed as standard deviation scores (SDs). SDS-PAGE and Western blot revealed a band compatible with TrxIA-2_{ic} expected molecular weight (~55.4 kDa) and yielded 0.72 mg of >99% pure TrxIA-2_{ic}/L culture. All 30 IA-2A(+) sera became virtually negative under antigen excess (mean SDs changed from 17.07 to 0.34) and all dose-response curves from 4 IA-2A(+) sera showed similar protein concentration that caused 50% inhibition (53.3 to 1.08 nM). Finally, bridge ELISA showed a 79.2% sensitivity (cut off = 2 SDs) and 95% specificity. We were able to express and purify TrxIA-2_{ic} from *E. coli*. We demonstrate its proper immunochemical behavior by inhibition or displacement of [³⁵S]IA-2 binding to IA-2A and use it in early attempts for IA-2A assessment by non-radiometric immunoassays.

- 360. (491) ANTIBODIES ANTI SSA IN NEGATIVE SAMPLES OF ANTICYTOPLASMATIC ANTINUCLEAR ANTIBODIES**
 Motta, Estela Leonor¹; Galardi, Nicolás²; Pedraza, Anabela³; Zamora, Marcelo³
Hospital Oscar Alende y Universidad Nacional de Mar del Plata¹ Hospital Materno Infantil Dr Victorio Tetamanti, Mar del Plata² Sector Inmunología Clínica y Hematología Clínica, Servicio de Laboratorio Central; Hospital Dr. Oscar Alende³

The Ro/La system is considered as a heterogeneous antigenic complex, constituted by three different proteins (52 kDa Ro, 60 kDa Ro and La) and four small RNAs particles. Anti-Ro/SSA are the most prevalent specificity among many autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE), SS/SLE overlap syndrome, subacute cutaneous LE (SCLE) and neonatal lupus. Indirect immunofluorescence (IIF) with HEp-2 cells is a common initial screening test for detection of antinuclear antibodies (ANA) and antibodies to ENA although screening with conventional HEp-2 cells may miss some antigens, such as SSA and Jo-1, false-negative results are infrequent. Objective: The aim of this study was to determine how many tests of ANA by IIF not demonstrated the presence of anti ENA antibodies. Materials and Methods: Between 2008 and 2013, 488 tests of ENA were performed by ELISA (Inova Diagnostics and AEsKu). ANA tests were done by indirect immunofluorescence using a Hep-2 substrate (Bion Interpret, Inc.; Inova Diagnostics, Inc. and Biocientífica). Details of the clinic results were obtained from clinic history of patients with negative ANA and SSA positive results. Results: From 488 tests of ENA, 31.3% were positive, of which 21 patients had negative ANA results. Seven patients came from other hospitals; five patients had no clinical history data. Of the remaining patients: 2 had a diagnosis of scleroderma, 1 systemic lupus erythematosus, 1 discoid lupus (DL), 1 Sjögren syndrome, 1 with a positive vasculitis pANCA, 2 polyarthralgia and 2 hypothyroidism. The prevalence of anti ENA was 12 fold higher in ANA positive samples (79.5%) than in ANA negative samples (6.5%). The sensitivity of ANA to detect positive ENA results was 87.9%. Conclusions: These results indicate that although a negative result was obtained by IIF; when there is a high clinical suspicion, testing for ENA antibodies and in particular anti SSA, should be performed.

- 361. (499) EVALUATION OF TLR4 AND TLR9 PATHWAY IN PEDIATRIC PATIENTS WITH SPECIFIC POLYSACCHARIDE ANTIBODY DEFICIENCY**
 Esnaola Azcoiti, María; Gaillard, María Isabel; Caldirola, María Soledad; Bezrodnik, Liliana
Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez

Recurrent or invasive bacterial infections by *S. pneumoniae* in patients (pts) that present specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD) are common in immunology consult. It hasn't been identified the molecular defects related to this disease yet. It has been described impairment in Toll like receptors (TLR) signaling pathways and B lymphocyte (BL) defects in Common variable immunodeficiency (CVID) which can associate polysaccharide antibody deficiency. Aim: To evaluate BL activation through TLR4 and TLR9 activation in SPAD and CVID pts. Materials and methods: Group 1 (G1): 13 SPAD pts, 7-18 years old (median: 12); Group 2 (G2): 10 CVID pts, 7-59 years old (median: 12); Group 3 (G3): 30 healthy donors (6 pediatric and 24 adults). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from G1, G2 and G3 were stimulated with lipopolisaccharide (LPS) and CpG oligodeoxynucleotides for 24 hs. Over expression of activation markers CD69 and CD86 was evaluated by flow cytometry (BDFacSCAN) in CD19⁺ cells. Inflammatory cytokines production was evaluated in PBMCs's LPS activated supernatants by Inflammatory CBA Kit (BD). Results: G2 presented significant decreased CD86 expression after activation with CpG compared with G3 (P=0.0462). G1 and G2 showed a diminished CD69 expression after LPS activation compared with G3 (p=0.0004; p=0.0019). There were not significant differences between any groups regarding inflammatory cytokines production. Discussion: This technique allowed us to identify impairment of

activation through TLR signaling pathway in CVID pts as it has been described in bibliography. SPAD pts showed alteration of TLR4 activation but normal TLR9 pathway function. Given that memory BL (mBL) express the highest levels of TLRs and SPAD and CVID pts can present low number of mBL, this may explain this alteration. We didn't find correlation between decreased TLRs activation and low mBL. Further studies adding more pts are necessary to find out the mechanisms involved.

362. (96) PROTEIN MALNUTRITION SIGNIFICANTLY INCREASES LUNG INFLAMMATORY DAMAGE INDUCED BY THE VIRAL PATHOGEN-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERN POLY(I:C)

Clua, María Patricia; Zelaya, Hortensia; Salva, Susana; Marranzino, Gabriela; Álvarez, Susana; Villena, Julio
Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET

The respiratory inflammatory response triggered by the activation of Toll-like receptor (TLR)-3 in malnourished mice was evaluated. Weaned BALB/c mice were malnourished with a protein-free diet for 21 days (M mice). Aged-matched well-nourished mice consumed a balanced conventional diet for 21 days and were used as controls (W mice). To mimic the pro-inflammatory and physiopathological consequences of RNA viral infections in the lung, the administration of the artificial viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C) (pIC) was used. M and W mice were nasally challenged with 250 µg of pIC. Mice received three doses of pIC with 24 hours rest period between each administration. Lung tissue damage and respiratory and systemic immune responses were studied at several time points (12, 24 and 48 h) after the last administration of pIC. TLR3 activation induced a marked impairment of lung function that was accompanied by the production of pro-inflammatory mediators and inflammatory cell recruitment into the airways in both M and W mice. However, lung tissue injury was significantly higher in M than in W mice. Significantly increased levels of albumin concentrations as well as LDH activity were found in broncho-alveolar (BAL) samples of M mice ($p < 0.05$), indicating an increased alteration of the alveolar-capillary barrier and the local cellular damage. pIC administration increased the numbers of neutrophils and macrophages in lung, the levels of TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , and IL-10 in serum and BAL, and the expression of lung TLR3 and TLR9 of both M and W mice. However, the levels of those parameters were significantly lower in M mice when compared to the W group during all the studied period ($p < 0.05$). These results indicate that protein malnutrition would significantly alter viral lung inflammation and their physiopathological consequences, which would explain the higher morbidity and mortality of malnourished hosts to respiratory viral infections.

363. (264) ANALYSIS OF INNATE LYMPHOID CELLS DURING THE FOLLOW-UP OF INTESTINAL TRANSPLANT PATIENTS

Pucci Molineris, Melisa^{1,2}; Rumbo, Carolina¹; Rumbo, Martín³; Gondolesi, Gabriel^{1,2}; Meier, Dominik^{1,2}
Hospital Universitario Fundación Favaloro¹ Universidad Favaloro² Facultad de Ciencias Exactas de La Plata (UNLP)³

Intestinal transplantation (ITx) presents the highest risk of graft loss due to its unique immunological characteristics. Patients with ITx are submitted to a strict immunosuppressive therapy, which raises susceptibility to infections and might dysbalance the intestinal homeostasis. ILCs (lin⁻CD127⁺) are a recently described family of immune cells that differ from conventional natural killer cells (cNK). ILC3 is a subpopulation defined as lin⁻CD127⁺CD117⁺NKp44⁺CD56⁺ secreting IL-22 and IL-17A by IL-23 induction. Studies in mouse model have shown a crucial role of ILC3 in the maintenance of the intestinal homeostasis. In humans, an increased number of ILC3s was detected in inflammatory pathologies such as Crohn's disease (CD). Therefore, we wanted to elucidate whether the immunosuppressive regimen influences ILCs composition in the setting of ITx during the follow-up. We isolated lamina propria cells of biopsies from patients with ITx,

CD, Celiac disease (CE) and control. For the enrichment of ILCs, we depleted CD4⁺ cells by MACS technology and the resulting CD4⁻ cells were stained with fluorochrome-conjugated anti-CD3, CD20, CD127, CD117, NKp44 and CD56 antibodies and analyzed by flow cytometry. Preliminary results showed a decreasing trend in total ILCs and ILC3s in ITx and CE, whereas we did not detect a difference in our CD sample compared to control. In the ITx group, we noted a declining tendency as the diagnosis worsens (from normal to mild acute cellular rejection (mACR)). The percentage of CD56⁺ILC3s was higher in CD than ITx, whereas in CE the percentage was similar to control. The percentage of activated NK cells was similar in control and ITx and lower in CD and CE. We conclude that the composition of ILCs is affected by the immunosuppressive regimen in ITx patients. Surprisingly, there was no increase of ILC3 in the mACR group as it has been described in CD patients.

364. (291) GALECTINS AS BIOMARKERS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Papa Gobbi, Rodrigo¹; De Francesco, Nicolás¹; Muglia, Cecilia¹; Rumbo, Martín¹; Rocca, Andrés³; Sambuelli, Alicia³; Toscano, Marta²; Rabinovich, Gabriel²; Docena, Guillermo¹
Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-UNLP-CONICET¹. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET² Hospital de Gastroenterología Dr. Bonorino Udaondo³

Galectins (Gal) are a family of mammalian lectins with affinity for β -galactoside-containing glycans. Although they have been implicated in a wide range of biological activities, their roles in intestinal inflammatory disorders are poorly understood. Seeking for potential biomarkers that could delineate different IBD entities, here we analyzed the gene expression profile of four relevant galectins in intestinal biopsies of patients with inflammatory bowel disease (IBD) and controls. Colonic biopsies were obtained by endoscopy from 57 IBD patients (20 Crohn's disease-CD patients, 37 ulcerative colitis-UC patients), 5 patients with acute cellular rejection after intestinal transplantation, and 22 non-IBD controls. mRNA was isolated and RT-PCR/qPCR were carried out using specific primers for Gal-1, Gal-3, Gal-4, Gal-9 and β -actin. Linear discriminant analysis (LDA) was used to compare the expression of these lectins in different patients and mucosal settings. We found a differential expression of galectins in inflamed tissue compared to uninfamed IBD or control patients. Gal-1 was markedly raised in fulminant IBD ($p < 0.01$), whereas Gal-3, Gal-4 and Gal-9 were down-regulated ($p < 0.01$). LDA significantly discriminated between different inflammation grades in IBD (weak inflammation= 67%; marked inflammation= 72%, controls= 83%). In addition, gene expression in remission IBD samples were clustered with control samples, and significantly differentiated from active IBD. This analysis could not distinguish CD from UC samples, but clearly discriminated inflamed IBD and samples of patients undergoing rejection upon intestinal transplantation (IBD=76%; gut rejection= 70% and controls= 86%). These findings indicate that the integrated analysis of four intestinal galectins could be used as a novel mucosal biomarker for monitoring IBD patients.

365. (422) PROBIOTIC FERMENTED MILK IN AN OVOALBUMIN ALLERGY MODEL APPLIED TO YOUNG MICE

Velez, Eva María Del Mar¹; Bibas Bonet, Mara E.²; Perdigon, Gabriela^{1,2}; Maldonado Galdeano, Carolina^{1,2}
Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET¹ Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán²

In previous work, probiotic fermented milk (PFM) administration in adult mice, lowered anti-OVA IgE in serum and BAL increasing α -OVA IgG and regulating Th1/Th2 balance towards a Th1 response with high level of IFN- γ . The aim of this work was to explore if PFM prevents allergy development using this or other regulatory process in young mice. Young BALB/c mice (21 days old) were split into 5 groups: Normal-Control (NC), Basal

(B-5days-PFM), OVA-Sensitization-Control (SC), Previous feeding and sensitization (P-5d-PFM+OVA+H₂O) and Continuous feeding (C-5d-PFM+OVA+PFM). At 7 and 15 days-post-sensitization (dPS) and 2 days-post-re-stimulus (dPR) mice were sacrificed and samples of: serum, BAL, small intestinal fluid (SIF) and gut and lungs tissue were taken to determine: anti-OVA IgE, IgG, IL-4, IL-10, IgA + cells and inducible Treg cells (lungs). We found that a-OVA IgE and IgG increased gradually reaching a peak at 2 dPR in all groups. In BAL, a-OVA IgG also increased at 2dPR; a-OVA IgE was no detectable. In serum IL-4 was lower in C group compared to SC at 15 dPS and 2 dPR ($p \leq 0.05$) but had no differences between groups in SIF. IL-10 showed significant increase only in P group at 7 and 15 dPS of the studied periods in serum; in SIF IL-10 was significantly lower in P and C compared to SC group ($p \leq 0.05$). Treg cells expression was not affected by PFM intake or sensitization with OVA. PFM does not exert the same effect observed previously in adult mice. It does not lowers a-OVA IgE and did not showed regulatory effects according to the levels of IL-10/IL-4 or for the lack of expression of Treg cells in sensitized treated and non treated groups.

366. (463) CHARACTERIZATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE IN A MURINE MODEL OF INTRATRACHEAL INFECTION WITH *B. ABORTUS* 2308

Hielpos, María Soledad¹; Ferrero, Mariana Cristina¹; Fernández, Andrea Giselle¹; Bonetto, Josefina¹; Fossati, Carlos Alberto¹; Comerci, Diego J²; Baldi, Pablo C¹
Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA¹ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB), UNSAM-CONICET²

Brucella is a human pathogen that can be acquired by inhalation. We studied the early stages of infection in a murine model of intratracheal inoculation in terms of bacterial dissemination and cytokine/chemokine response. Balb/c mice were inoculated at 10⁶ or 10⁴ CFU of *B. abortus* per animal. Lung, liver and spleen homogenates were obtained at 1, 2, 3 and 7 days post infection (pi) and were used for CFU counting and for measuring cytokine and chemokines by ELISA. We found that at 2h pi 77% of the inoculum remains in the lung. During the first 2 days pi, pulmonary bacterial counts in mice receiving the high inoculum dropped from 7.8 to 1.5 (x10⁶) CFU. With the small inoculum, CFU remained constant around 12000 CFU/lung for 4 days pi but increased at day 7 pi. CFU in spleens and livers mimicked the kinetics in lungs, but started at 100 CFU/organ when infected with 10⁶ CFU; and were non-detectable until day 7 pi with the lower inoculum (when they reached 100 CFU/organ). We measured IL-1 β , TNF- α , KC, IL-10, IL-12 and MCP-1 in total lung homogenates. We found no significant differences between controls and infected animals when inoculated with 10⁴ CFU at any given time point. When we assessed the high inoculum group the total lung levels of MCP-1 and IL-1 β increased significantly only after 3 days pi ($p < 0.05$), while KC and IL-12 increased at 7 days pi ($p < 0.05$). TNF- α levels were lower in infected mice than in controls at days 2 and 3 pi ($p < 0.01$), and IL-10 levels followed the same pattern. In another set of experiments, mice inoculated intratracheally with *B. abortus* or PBS received *E. coli* LPS through the same route 1 day later, and lungs were harvested for histopathology 24 h later. A marked decrease in signs of inflammation was noted in lungs of animals from the *Brucella*/LPS group as compared with the PBS/LPS group. Our results show that *B. abortus* infection produces a delayed innate response in the lung and seems to subvert the local inflammatory response to PAMPs.

367. (493) CORNEAL LESION ON ONE EYE DISRUPTS CONJUNCTIVAL IMMUNOLOGICAL TOLERANCE OF THE FELLOW EYE: ANOTHER OCULAR SYMPATHETIC PHENOMENON?

Keitelman, Irene Angélica¹; Guzmán, Mauricio¹; Sabbione, Florencia¹; Giordano, Mirta N.^{1,2}; Galletti, Jeremías G.¹; Trevani, Analía S.^{1,2}
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Depto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA²

Introduction: The rejection of a recent corneal graft favors the rejection of a previous transplant on the fellow eye, suggesting that one eye's immune response conditions its fellow. Ocular surface disorders could affect the opposite eye in the same way. Objective: To evaluate the effect that a corneal lesion on one eye exerts over the conjunctival immune response of the opposite eye and the potential mechanisms involved. Study design: A unilateral chemical burn was induced in the cornea of Balb/c mice (day 1), and were then instilled with ovoalbumin (OVA) daily (days 2-5) either in the same or the fellow eye. After subcutaneous immunization with OVA in adjuvant (day 8), induced T cell responses were measured by the delayed-type hypersensitivity (DTH) response in the footpad (day 15). To assess the lymphatic drainage, fluorescent OVA was injected in the subconjunctival space of one eye and 2 hours later each cervical lymph node was harvested separately. Results: Compared with untreated mice, ocular OVA instillation before immunization reduced the DTH response ($p < 0.05$), while instillation after corneal burn did not affect it when done neither on the injured nor on the fellow eye. Regarding lymphatic drainage, higher-than-control fluorescence was detected in the homolateral submandibular and preauricular lymph nodes ($p < 0.001$) but not in the contralateral counterparts. However, higher-than-control T cell activation was observed in both ipsi- and contralateral lymph nodes 48 h after corneal injury ($p < 0.05$). Conclusion: A unilateral corneal lesion is able to tip the immune balance of the contralateral eye despite the absence of direct chemical damage or crossed lymphatic drainage. Nevertheless, increased T cell activation is detectable in the opposite lymph nodes. These results are in line with others on ocular disorders that are sensitive to corneal nerve fiber section or cervical sympathectomy.

368. (153) FURTHER ANALYSIS OF THE USE OF *TOXOPLASMA GONDII* SERINE PROTEASAE INHIBITOR-1 FOR THE TREATMENT OF ALLERGIC LUNG INFLAMMATION.

Soto, Ariadna¹; Fenoy, Ignacio²; Sánchez, Vanesa¹; March, Florencia¹; Picchio, María¹; Perrone, Matías¹; Aldirico, María Ángeles¹; Dran, Graciela³; Martín, Valentina¹; Goldman, Alejandra¹
Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente (CESyMA), Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires¹. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB)-INTECH, UNSAM². Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM³

By using a murine allergic airway inflammation model, we had previously shown that *Toxoplasma gondii* serin-proteases inhibitor 1 (PI) was able to reduce BAL eosinophilia and lung mucus production. Herein, we extended our study by analysing the immune mechanisms involved. BALB/c mice were ip sensitized with OVA (allergen) /Alum and aerosol challenged with OVA. Two days later they were intranasally (IN) treated for 3 days with OVA + PI (OPI). Control groups included non-sensitized mice IN treated with PI alone (NPI) (negative) and sensitized mice treated with OVA alone (OO) (positive). One week later, mice were OVA aerosol challenged. PI treated mice showed a decrease in OVA specific IgG1 and IgG2a (IgG1: NPI^a: 0.01 \pm 0.002; OO^b: 0.13 \pm 0.01; OPI^c: 0.09 \pm 0.01; OD \pm ES $p < 0.01$ b vs c; IgG2a: NPI^a: 0.04 \pm 0.005; OO^b: 1.53 \pm 0.22; OPI^c: 0.55 \pm 0.05; OD \pm ES $p < 0.01$ b vs c). Also, a trend to decreased IgE levels was observed. IL-4, IL-5 and IFN- γ production was reduced in thoracic lymph node cells from PI treated mice *ex vivo* stimulated with OVA (IL-4: NPI^a: 5.3 \pm 0.16; OO^b: 1442 \pm 203.7; OPI^c: 680.9 \pm 159.7 pg/ml \pm ES, $p < 0.01$ b vs c; IL-5: NPI^a: 5.0 \pm 8.0; OO^b: 4794 \pm 298.9; OPI^c: 1664 \pm 345.8 pg/ml \pm ES; $p < 0.001$ b vs c; IFN- γ : NPI^a: 0.017 \pm 0.0; OO^b: 1.326 2 \pm 0.56; OPI^c: 0.265 \pm 0.08 OD \pm ES, $p < 0.05$ b vs c). Regulatory cytokines were also diminished (IL-10: NPI^a: 53.42 \pm 2.2; OO^b: 4507 \pm 1266; OPI^c: 1682 \pm 289.3 pg/ml \pm ES, $p < 0.05$ b vs c; TGF- β : NPI: 1424 \pm 285.1; OO^b: 15402 \pm 450.3; OPI^c: 647.5 \pm 66.83 pg/ml \pm ES; $p < 0.05$ b vs c). Moreover, PI induced a reduction in OVA specific T cell proliferation (OO: 23907 \pm 2577; OPI: 12285 \pm 2103 Δ cpm \pm ES, $p < 0.05$). This model shows the potential use of PI in respiratory immunotherapies. The results suggest that the effect of PI in modulating allergic lung inflammation would be the result of a decrease in the overall response to the allergen.

ENDOCRINOLOGÍA 3

369. (669) LA HORMONA TIROIDEA T3 PROMUEVE EL MOVIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MEDIANTE EL CONTROL DEL COMPLEJO QUINASA SRC-FAK-PI3K

Neira, Flavia Judith; Flamini, Marina I.; Pennacchio, Gisela Erika; Uzair, Ivonne Denise; Jahn, Graciela Alma; Sánchez, Ángel Matías

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET-Centro Científico Tecnológico (CCT)-Mendoza

Introducción: Las hormonas tiroideas juegan un papel fundamental en diversos procesos incluyendo el movimiento celular. La migración celular requiere la integración de una serie de eventos que inducen cambios en la estructura celular hacia la dirección de migración, como la reorganización del citoesqueleto actínico y el desarrollo de sitios de adhesión celular. La quinasa de adhesión focal (FAK), modula dichos procesos, y promueve la adhesión, migración e invasión celular a través del control de los sitios de adhesión focal. Nuestra hipótesis se basa en que T3 tendría un efecto regulador sobre proteínas quinasas claves Src/FAK/PI3K en la morfología y motilidad celular. Metodología: Utilizamos la línea celular de cáncer de mama T47-D, y se realizaron ensayos de inmunoblottings, adhesión, migración, inmunoprecipitación e inmunofluorescencia. Resultados: hemos demostrado que la hormona tiroidea triyodotironina (T3) promueve la reorganización del citoesqueleto actínico, impulsando el movimiento celular. Además, T3 promovió la fosforilación y translocación de FAK, hacia los sitios de formación de complejos de adhesión focal. Dicha activación, desencadenada tras la rápida señal de c-Src y fosfatidilinositol 3-OH quinasa (PI3K), condujo a la formación del complejo Src/FAK/PI3K, promoviendo los procesos de adhesión y migración celular. Además, desarrollamos un modelo de hipertiroidismo e hipotiroidismo en células T47-D (mediante diversas concentraciones de T3), determinando como los niveles de expresión de Src, FAK y PI3K se mantuvieron constantes en el modelo hipertiroidico (respecto a los niveles normales), mientras que en el modelo hipotiroidico se redujo significativamente la expresión de dichas quinasas. Conclusión: nuestros resultados sugieren un importante rol por parte de T3 como regulador del movimiento celular, proporcionándonos nuevos conocimientos para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer de mama.

370. (676) LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA NOTCH DISMINUYE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN HORMONAL DE LOS TUMORES SOMATOLACTOTROPOS EN RATONES NUDE/NUDE.

Zubeldía Brenner, Lautaro¹; Ribuffo, Santiago¹; Perrone, Sofía²; Cristina, Carolina²; Becu-Villalobos, Damasia¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ Centro de Investigación y Transferencia del Noroeste Bonaerense (CIT NOBA)-CONICET, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires²

La vía de señalización de los receptores Notch regula diversos procesos durante el desarrollo de células eucariotas como proliferación, migración, diferenciación y apoptosis. Notch se encuentra involucrado en la autorrenovación de células madre determinando el destino celular, y se ha descrito su participación en el desarrollo de diversos tumores. En el presente trabajo evaluamos si la inhibición farmacológica de la activación de Notch comprometía el crecimiento y secreción de tumores somatolactotropos generados en ratones Nude/Nude. Se inyectaron 700.000 células GH3 (somatolactotropos) en ratones Nude/Nude, y luego de 21 días se inició un tratamiento i.p. cada tres días con DAPT, un inhibidor de la gama secretasa que activa la señalización de Notch (8mg/kg de peso corporal, tres veces por semana). Luego de tres semanas de tratamiento se extrajeron los tumores. Se comprobó que el crecimiento de los mismos resultó inferior en un 42% en los animales tratados por DAPT (masa tumoral + ES: 490 + 80,7 y 284+ 67,5 mm², control y DAPT, n=12 y n=11 respectivamente, p<0,05). Esto fue acompañado con una disminución significativa

de la concentración intratumoral de prolactina y GH, y de la liberación de las hormonas en suero. El dominio intracelular de Notch-1 (producto de activación del receptor Notch-1) determinado por Western blot disminuyó por el tratamiento, en concordancia con una disminución de la proteína PCNA, marcador de proliferación. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los ARNm de Hes-1, Hey-1, y Ciclina D1. En células GH3 in vitro la incubación con DAPT (1, 5 y 10 µM) durante 24 o 48 horas produjo una disminución significativa y dosis dependiente de la secreción de GH y prolactina al medio de cultivo. Y por PCR en tiempo real se observó una disminución del ARNm del factor río abajo Hes-5 perteneciente a la vía de Notch. Estos resultados demuestran la participación de la vía de Notch en la proliferación y desarrollo de tumores somatolactotropos GH3.

371. (683) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MARCADORES DE CÉLULAS STEM/PROGENITORAS EN ZONA MARGINAL Y PARÉNQUIMA HIPOFISARIO DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA ACTIVA

Vaca, Alicia; Guido, Carolina; Sosa, Liliana; Petiti, Juan Pablo; Torres, Alicia

Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET

Una de las características de la hipófisis es la plasticidad para responder a demandas hormonales en estadios como preñez y lactancia activa, lo cual podría estar vinculado con el reclutamiento de células stem/progenitoras (CS) localizadas en la zona marginal (ZM) de la glándula. Mediante inmunocitoquímica ultraestructural, observamos variaciones de marcadores de fenotipo CS en ZM de hipófisis durante preñez (P) y lactancia activa (LA). La expresión de GFRA2 aumentó significativamente en AT previo al incremento registrado para Sox2 y Oct-4 durante LA. Con el objetivo de esclarecer la contribución de CS en la proliferación celular adenohipofisaria, se evaluó la expresión diferencial de marcadores asociados a CS y células diferenciadas en ZM y parénquima hipofisario durante P y LA. Se utilizaron hipófisis de ratas Wistar en: Cópula (COP), día 5 (d5G) y 15 de gestación (d15G), a término de la preñez (AT), día 1 (D1L) y día 4 de lactancia (D4L). Mediante la técnica de microdissección láser se obtuvieron cortes de ZM y parénquima hipofisario. En las muestras de ARNm extraído de las dos zonas mencionadas, se evaluaron los marcadores de CS y células diferenciadas por qRT-PCR. Estadística: test-t. El ARNm de GFRA2, marcador específico de CS en hipófisis, incrementó notablemente en ZM sólo en AT, sin cambios en los otros grupos. Resultados similares fueron observados para Oct-4 y Sox2 en ZM de AT. La expresión del ARNm de Sox2 mostró un aumento significativo en ZM de D1L y en parénquima de D4L. Niveles elevados del ARNm de PROP1 fueron obtenidos en ZM de D1L, mientras que Pit-1 se expresó sólo en parénquima hipofisario, registrándose un importante incremento en D4L. Estos resultados evidencian que durante la preñez y lactancia activa se produce un reclutamiento de CS de ZM, que daría origen a poblaciones celulares en distintos estadios de diferenciación, incluyendo la formación de nichos de células progenitoras y diferenciadas en el parénquima hipofisario.

372. (689) TESTOSTERONA REVIERTE LA DEDIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS (CMLP) INDUCIDA POR LPS REGULANDO EL SISTEMA MYOCD/SRF.

Leimgruber, Carolina¹; Peinetti, Nahuel¹; García, Luciana Noemí¹; Miano, Joseph²; Maldonado, Cristina Alicia¹; Quintar, Amado Alfredo¹

Centro de Microscopía Electrónica, Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA) -CONICET-Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.¹ Aab Cardiovascular Research Institute, University of Rochester.²

El fenotipo de las CMLp tiene impacto clave en el desarrollo y progresión de patologías prostáticas. Recientemente, deter-

minamos que el pretratamiento con Testosterona (T) evita la desdiferenciación y proliferación de CMLp inducida por LPS, por lo que los andrógenos tendrían un rol benéfico. Sin embargo, clásicamente se ha sostenido que T induce hiperplasia prostática; en vista de esta controversia, el objetivo fue determinar si T revierte la desdiferenciación de CMLp inducida por LPS y la regulación androgénica del eje miodiferenciador MYOCD/SRF. Cultivos primarios de CMLp de rata se estimularon con LPS 1µg/ml (LPS) o su vehículo (CTRL) por 48h y luego se adicionó T (10^{-7} M o 10^{-12} M) por 48h. Las CMLp se procesaron para qPCR, WB e IF de MYOCD/SRF, calponina, α -actina (ACTA2), leimodina, y vimentina como parámetros de diferenciación y se midió IL6 por ELISA. Análisis estadístico ANOVA-Tukey. Los CMLp-CTRL exhibieron un perfil muscular con expresión de MYOCD/SRF, siendo ACTA2(+), calponina(+) y leimodina(+) y vimentina(-). LPS disminuyó la expresión de MYOCD/SRF, ACTA2 ($p<0,05$), calponina ($p<0,01$) y leimodina ($p<0,01$) e incrementó vimentina ($p<0,05$), a la vez que estimuló la secreción de IL6, indicando desdiferenciación de CMLp. Interesantemente, T revirtió los cambios inducidos por LPS parcialmente con la dosis $T10^{-12}$, alcanzando niveles de ACTA2, calponina, leimodina, vimentina e IL6 similares al CTRL con $T10^{-7}$. Asimismo, T reestableció la expresión de MYOCD/SRF, por lo que a continuación se determinó si T actúa modulando este eje; para ello, células de la línea HCASMC se transfectaron con scRNA, siMYOCD o siSRF usando lipofectamina y luego se trataron con T (10^{-7} M). El silenciamiento de MYOCD/SRF impidió el efecto miodiferenciador de T indicando que necesita de este sistema para actuar. Estos hallazgos demuestran un rol benéfico de T reestableciendo el normal fenotipo de CMLp en un microambiente inflamatorio a través de la regulación del eje MYOCD/SRF.

373. (700) CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UNA MUTACIÓN (P.A129T) EN EL GEN CYP27B1 EN UN PACIENTE CON RAQUITISMO PSEUDOCARENCIAL DE VITAMINA D (VDDR I)

Pérez Garrido, Natalia¹; Marino, Roxana¹; Baquedano, María Sonia¹; Maceiras, Mercedes¹; Ramírez, Pablo¹; Malosetti, María Del Carmen²; Viterbo, Gisella¹; Tau, Cristina¹; Juanes, Matías¹; Pasqualini, Natalia¹; Rivarola, Marco Aurelio¹; Belgorosky, Alicia¹
Hospital de Pediatría Garrahan¹ Hospital del Niño de San Justo²

Introducción: La deficiencia de 1alfa-hidroxilasa o raquitismo pseudocarencial de vitamina D (VDDR I), es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la aparición temprana de raquitismo con hipocalcemia. Se genera como consecuencia de mutaciones en el gen *CYP27B1*. La 1alfa-hidroxilasa convierte 25(OH)D3 en su forma activa 1,25-(OH)2D3. Aunque existe variabilidad fenotípica entre estos pacientes las bases moleculares de la misma permanecen desconocidas. Objetivo: Caracterizar la mutación p.A129T detectada en un paciente heterocigota compuesto con p.R432C, con síntomas clínicos en el primer año de vida pero anomalías bioquímicas inusualmente moderadas. Métodos: Por mutagénesis dirigida se obtuvieron las construcciones con el ADNc del gen *CYP27B1* para la mutación p.A129T y la mutación previamente descrita p.R432C. Se co-transfectaron en la línea celular COS7 cada una de las construcciones (wt o mutadas) y una conteniendo el gen de la luciferasa (vector PGL3); y se incubaron con 0,5 µM de 25(OH)D3 por 4 hs. Se midió por RIA la concentración de 1,25-(OH)2D3. Resultados: La mutación p.A129T se encuentra en la base de datos de SNPs (rs58915677). Los distintos ensayos *in silico* utilizados muestran resultados discordantes. La mutación p.R432C ha sido descrita con una actividad residual de un 6,9% del wt. Luego de la incubación con el sustrato las mutantes p.A129T y p.R432C retuvieron 5,20% y 6,36% de la actividad enzimática del wt respectivamente. Conclusión: Este paciente es portador de dos mutaciones que disminuyen significativamente la actividad enzimática respecto del wt, confirmando que dichas mutaciones son la causa de VDDR I. Si bien los valores de 25(OH)D3, 1,25-(OH)2D3 y calcemia están en rango normal, el diagnóstico fue considerado debido a los signos clínicos, la hipofosfatemia y los valores elevados de FAL

y PTH. Estos hallazgos demuestran que los criterios bioquímicos clásicos para el diagnóstico de deficiencia de 1alfa-hidroxilasa pueden no detectar pacientes con defectos enzimáticos parciales pero significativos. Esta variabilidad fenotípica podría deberse a otros factores modificadores con actividad de 1alfa-hidroxilasa.

374. (701) REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES HUMANAS DE LA LÍNEA H295R MEDIADA POR EL RECEPTOR OXER1
Neuman, Isabel; Dattilo, Melina; Muñoz, Mariana; Maloberti, Paula; Cornejo Maciel, Fabiana
Instituto de Biología y Medicina Experimental (INBIO-MED)- CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Previamente demostramos, con herramientas farmacológicas y de biología molecular, la participación del receptor de membrana OxeR1 en la regulación de la producción de esteroides en células de Leydig y adrenocorticales. El OxeR1 es un receptor de membrana acoplado a proteína G, mediador de las acciones del 5-oxo-ETE, 5-HETE y 5-HpETE, productos del metabolismo del ácido araquidónico a través de la 5-lipoxigenasa. En células esteroideogénicas, estos compuestos son necesarios para la inducción de la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) y la activación de la esteroideogénesis. En el presente trabajo analizamos la funcionalidad del receptor de membrana en las células adrenocorticales humanas de la línea H295R como sistema esteroideogénico. Para ello, obtuvimos las líneas H295R-vacío y H295R-OxeR1, por transfección estable de un vector de expresión vacío o conteniendo el ADNc del OxeR1, respectivamente. En estas líneas se analizó la expresión del OxeR1 por RT-PCR, western blot e inmunocitoquímica, verificando mayores niveles de ARNm y proteína en las células H295R-OxeR1 comparadas con las H295R-vacío. La estimulación con 8Br-AMPC ($5 \cdot 10^{-4}$ M) y Angiotensina II (10^{-8} M) durante 6 h produjo un aumento significativo en la producción de progesterona (evaluada por radioinmunoensayo) ($p<0,01$ H295R-OxeR1 vs H295R-vacío, para los dos estímulos) y en la inducción de la proteína StAR (evaluada por RT-PCR y western blot). Con respecto al mecanismo de acción del receptor OxeR1, la estimulación de células H295R con el 5-oxo-ETE, agonista del receptor OxeR1, produjo cambios en la fosforilación de ERK (evaluada por western blot), dependientes del tiempo y de la concentración del agonista. En conclusión, verificamos la participación del OxeR1 en la inducción de StAR activada por vías dependientes e independientes de AMPc y que la activación del receptor OxeR1 produce cambios en la fosfo/defosforilación de ERK en células esteroideogénicas humanas.

375. (702) EFECTOS TEMPRANOS DEL OLIGODEOXINUCLEÓTIDO IMT504 EN UN MODELO DE DIABETES TIPO I EN RATONES

Bianchi, Stefania¹; Montaner, Alejandro²; Martínez, Leonardo¹; Chasseing, Norma Alejandra¹; Libertun, Carlos^{1,3}; Lux-Lantos, Victoria¹; Bianchi, María Silvia¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)¹ Instituto de Ciencia y Tecnología (ICT) Milstein-CONICET² Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³

Previamente demostramos que el IMT504, un oligonucleótido inmunomodulador tipo PyNTTTTGT, induce una marcada recuperación de la diabetes tóxica inducida por una única dosis de estreptozotocina (STZ) en ratas macho, la cual se correlaciona con una expresión temprana de marcadores de células progenitoras (Diabetologia 2010,53:1184), sin alterar los parámetros inmunes (Diabetes Metab Res Rev 2012;28:156). El IMT504 también mejoró la condición diabética en un modelo de diabetes autoinmune inducido por múltiples dosis bajas de STZ en ratones (MLDZ), evaluada 25 días de finalizado el tratamiento. Acá, evaluamos los efectos tempranos del IMT504 en ratones diabéticos MLDZ y su mecanismo de acción. Ratones macho Balb/C fueron inyectados con STZ (40mg/kg, i.p.) durante 5 días consecutivos o con diluyente (control, C). Ratones STZ con glucemias >250 mg/dl y C fueron inyectados diariamente con IMT504 (20mg/kg/dosis, sc) (STZ-IMT,

C-IMT, respectivamente) o salina (STZ, C) y fueron sacrificados luego de dos disminuciones consecutivas en la glucemia de los STZ-IMT (2-5 dosis de IMT). Se realizaron estudios histológicos en páncreas. La rápida normalización observada en la glucemia de los STZ-IMT (glucemia al sacrificio (mg/dl): C=137±14, C-IMT: 103±8, STZ: 352±41*, STZ-IMT: 145±9, * diferente a todos: p<0,001) fue acompañada por una disminución en la tasa de apoptosis (células apoptóticas positivas/islotos totales: C: 0,05±0,03*, C-IMT: 0,18±0,05, STZ: 0,70±0,23*, STZ-IMT: 0,37±0,13, *: p<0,01) y un aumento en el área total de islotos (área islotos/área pancreática (%): C: 0,70±0,11*, C-IMT: 0,81±0,10*, STZ: 0,27±0,08*, STZ-IMT: 0,53±0,06, *: p<0,01) y en el área insulina-positiva en los STZ-IMT. Además se observó una clara reducción de la infiltración leucocitaria alrededor y dentro de los islotos. Estos resultados sugieren que el IMT504 promueve una rápida normalización de la glucemia modulando el sistema inmune y preservando/recuperando los islotos pancreáticos. (CONICET, UBA, ANCYPT).

376. (707) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR HIPOTIROIDISMO EXPERIMENTAL.

Valli, Eduardo¹; Sterle, Helena A¹; Méndez Huergo, Santiago²; Klecha, Alicia J^{1,3}; Paulazo, María A¹; Cayrol, María F¹; Flaqué, María C Díaz¹; Barreiro Arcos, María L¹; Rabinovich, Gabriel A²; Cremaschi, Graciela A^{1,3}
 Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET² Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³

Es sabido que las concentraciones séricas de hormonas tiroideas (HTs) modulan el sistema inmune. Con el fin de evaluar el efecto del hipotiroidismo sobre el sistema inmune, desarrollamos un modelo de hipotiroidismo en el cual ratones C57Bl/6J (r-hipo) fueron tratados con propiltiouracilo (PTU) durante dos semanas. En los ganglios y linfocitos T de dichos ratones se observó un incremento en los niveles de expresión del mRNA de las deiodinasas 1, 2 y 3 (p<0,05) y del transportador de HTs, MCT8 (P<0,01) respecto de los animales eutiroides controles (C), sin diferencias significativas en los niveles de expresión de otros transportadores (MCT10, LAT1 y LAT2). La reactividad linfocitaria y la producción de citoquinas tipo Th1 se vio reducida por el tratamiento con PTU. Este efecto se relacionó con los bajos niveles circulantes de HTs, y no a las variaciones de TSH y TRH, de acuerdo a los resultados hallados comparativamente entre r-hipo y transgénicos que sobreexpresan el gen de TRH. No observamos diferencias en la distribución de subpoblaciones linfocitarias en células provenientes de ganglios linfáticos o bazo de r-hipo vs C. Sin embargo, los r-hipo, aunque no así los animales transgénicos, mostraron un aumento significativo en el porcentaje y actividad de células T_{reg} (CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺; p<0,05). Asimismo, la inducción *in vitro* de células T_{reg} a partir de células T *naive* de r-hipo también se vio incrementada (p<0,05). Estas observaciones indicarían un rol central de las HTs en la regulación de la inmunidad ejercida por el eje HPT. La inmunosupresión del hipotiroidismo experimental no sería consecuencia de fallas en el metabolismo de HTs a nivel linfocitario, sino que estaría relacionada con el aumento del número y funcionalidad de células T_{reg}, inducido por los bajos niveles circulantes de HTs.

377. (734) EFECTOS DE LA HORMONA TIROIDEA SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN UN MODELO BIOMIMÉTICO DE CAPACITACIÓN

Rosales, Mónica¹; Ariagno, Julia²; Furlan, M. Julia²; Blanco, Guillermo²; Mendeljuk, Gabriela²
 Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)-UBA¹ Laboratorio de Fertilidad Masculina, Depto. de Bioquímica Clínica, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET³

La capacitación ocurre en el tracto femenino habilitando al espermatozoide para la fertilización natural. Implica cambios biofísicos asociados a las propiedades fusogénicas de membrana y

a la cinética espermática. Es objetivo del presente trabajo evaluar variaciones en el citoesqueleto de actina y en la movilidad objetiva en un modelo biomimético, en condiciones capacitantes y no capacitantes, en presencia o ausencia de hormona tiroidea (T4). Se fraccionó una muestra de semen normozoospermico (OMS2010) en 4 alícuotas de 0,5ml c/u a 2 de las cuales se les agregó T4 (0,02µg/ml). A todas se les realizó enriquecimiento por sobrenado empleando HAM F-10(1x) con HEPES en presencia o ausencia de albúmina (alb) (2mg/ml). Se realizaron improntas en condición basal y luego del sobrenado a 1, 5 y 18hs en las que se marcó la actina con Texas Red Phalloidin, las imágenes se analizaron con ImagePro 6.0, estableciéndose un índice de actina polimerizada (IAP: área x intensidad). La movilidad objetiva se evaluó (SCA-Microptic) en condición basal y a las 5 hs. Análisis estadístico: ANOVA-Bonferroni. Polimerización de la actina: el IAP en situación no capacitante (sin alb) fue máxima a la hora declinando luego; en condición capacitante (con alb) fue en constante incremento; en presencia de T4 a todos los tiempos estudiados ya sea con y sin alb fue menor (p<0,001). El comportamiento de la hormona pareciera ser el mismo en ambas condiciones lográndose una polimerización máxima a las 5 hs que coincidió con el aumento del batido flagelar (BCF) evaluado en n espermatozoides en condiciones: 1) basal 8,23±4,51 Hz (n:298); 2) sin alb, sin T4: 7,93±5,83 (n:57); 3) sin alb + T4: 11,19±7,46(n:135); 4) con alb, sin T4: 8,58±7,39(n:201); 5) con alb + T4: 10,79±5,47(n:131). Encontramos diferencia entre la condición 5 con 1, 2 y 4 (p<0,05), no se halló diferencia entre las condiciones 5 y 3. La hormona pareciera tener un comportamiento *per se* sobre la actividad flagelar con implicancias en la fertilización natural.

378. (741) COMPARACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD CLÍNICAS DE OSTEOFORTIL RESPECTO DE FORTEO

Farías, Javier Mauricio¹; Zanchetta, MB²; Bogado, C²; Massari, F²; Criscuolo, M¹; Papouchado, M¹; Diez, RA¹; Zanchetta, JR²
 Biosidus SA¹ Instituto de Diagnóstico e Investigaciones Metabólicas (IDIM) CR²

Introducción: Durante el desarrollo de un producto con teriparatida (un análogo de PTH empleado para tratar la osteoporosis), se comparó durante 6 meses la eficacia y seguridad del nuevo producto, Osteofortil® (Biosidus S.A., Buenos Aires, Argentina) y el de referencia, Forteo® (Eli-Lilly, IndiaNápolis, IN, EEUU), ambos a 20 µg/d. Tras su aprobación ética y por ANMAT, el ensayo se realizó en el único centro de osteoporosis en Buenos Aires. Criterios de inclusión (CI): mujeres menopáusicas entre 50 y 81 años con osteoporosis - densidad mineral ósea (DMO) < -2.5 (Tscore) en columna lumbar (CL) o fractura vertebral con una DMO <-2 en columna, cuello femoral o cadera total. De las 100 mujeres que cumplieron los CI y no los de exclusión, 95 completaron la fase comparativa. Se evaluó el nivel de osteocalcina (O), pro péptido N-terminal del procolágeno tipo1 (P1NP), C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (CTX) por Electroquimioluminiscencia Eclia Roche e411, al mes, 3 y 6 meses y DMO a los 6 meses de tratamiento con DEXA (dual-energy x-ray absorptiometry) mediante Lunar Prodigy Advance™, GE Healthcare, Madison, WI, USA. Se evaluó la aparición de anticuerpos anti-PTH mediante ELISA. Resultados: La edad media fue 65,6 años, sin diferencias en años de menopausia, uso previo de bifosfonatos, vitamina D y presencia de fractura al iniciar el estudio. A los 6 meses Osteofortil n=48 incrementó los niveles de osteocalcina 60,3 mg/ml, P1NP 146,8 mg/ml y CTX 816,2 pg/ml y Forteo 67,8 mg/ml, 179 mg/ml y 1046 pg/ml, respectivamente (p=NS). El incremento en la densidad mineral en CL a los 6 meses con Forteo fue 6,3% y de 4,2% para Osteofortil. En CL se obtuvo una potencia de 0,86 del producto en estudio respecto del producto de referencia (p=NS). No aparecieron anticuerpos anti-PTH con ningún producto. Conclusiones: ambos productos presentan similar incremento en los marcadores de resorción, formación ósea y en los niveles de densidad mineral ósea en columna lumbar.

379. (777) TESTOSTERONA INCREMENTA LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS VÍA MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN NO CLÁSICOS

Peinetti, Nahuel; Leimgruber, Carolina; Quintar, Amado Alfredo; Maldonado, Cristina Alicia
Centro de Microscopía Electrónica. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

La testosterona (T) es fundamental en el desarrollo y fisiología de la próstata. Su mecanismo de acción principal involucra su unión al receptor clásico de andrógenos (RA) y la migración al núcleo para la activación genómica. Además, puede participar una vía no clásica (VNC), para la cual se han descrito receptores en la membrana plasmática, e involucra activación de segundos mensajeros, proteínas quinasas y factores de transcripción. Las células musculares lisas prostáticas (CMLp) cumplen un rol clave en la homeostasis glandular, por lo que nos propusimos analizar si T induce efectos mediados por la VNC en ellas. Cultivos primarios de CMLp de ratas Wistar fueron estimulados con con T (10^{-7} M), T unida a BSA (T-BSA, 10^{-7} M), conjugado que es incapaz de atravesar la membrana plasmática, o sus vehículos, durante tiempos cortos (10-30 minutos) o largos (24h). Se evaluó la participación de las vías de las MAPK y de PI3K/Akt en tiempos cortos mediante western blot de pERK y pAkt, y la expresión del RA en tiempos largos. Además, se correlacionó con la proliferación celular mediante incorporación de BrdU. Luego de estímulos cortos, tanto T como T-BSA incrementaron significativamente pERK y pAkt en forma tiempo-dependiente ($p < 0,05$). Por otro lado, el estímulo largo con T-BSA produjo un incremento en la proliferación celular en comparación con el control o el tratamiento con T ($p < 0,05$). Finalmente, el estímulo largo con T-BSA no produjo diferencias en la expresión del RA con respecto al control, contrastando con el aumento que produjo T ($p < 0,05$ vs control). Estos datos constituyen las primeras evidencias de la existencia de receptores de membrana para T en las CMLp, cuya activación lleva a una VNC con participación de ERK y Akt. La activación de estos receptores induciría proliferación celular mediante una VNC, mientras que el control de la expresión del RA funcionaría de manera independiente de esta vía.

380. (814) VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL EN ADENOHIPOFISIS E HIPOCAMPO DE RATAS HEMBRAS CICLANTES
Gottardo, María Florencia; Ferraris, Jimena; Zárate, Sandra; Pisera, Daniel; Seilicovich, Adriana
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET

La técnica de PCR en tiempo real (qPCR), una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de expresión de genes, requiere la utilización de un gen de referencia adecuado para obtener conclusiones fiables. El ARNm del gen de referencia debe presentar niveles de expresión similares bajo distintas condiciones experimentales. Nuestro objetivo fue determinar la utilidad de los genes GAPDH, β -actina, HPRT y ciclofilina como controles internos durante el ciclo estral de ratas hembras. La expresión relativa de cada gen fue determinada por qPCR en ADNc obtenido de adenohipofisis o hipocampo de ratas sacrificadas en proestro (P), estro (E) o diestro (D). La expresión fue evaluada por el método de 2^{-Ct} . En la adenohipofisis, HPRT se comportó como un gen de expresión baja y β -actina como un gen de expresión media. Si bien la expresión de estos genes no varió significativamente durante el ciclo estral, mostraron gran variabilidad en cada grupo (HPRT P: $1,0 \pm 0,5$; E: $1,4 \pm 0,8$; D: $0,6 \pm 0,6$; β -actina P: $1,0 \pm 0,5$; E: $1,9 \pm 0,9$; D: $1,8 \pm 1,2$; ANOVA). La ciclofilina se comportó como un gen de expresión media en adenohipofisis, no presentó variaciones en su expresión durante el ciclo estral, y no mostró variabilidad entre individuos (P: $1,0 \pm 0,3$; E: $1 \pm 0,2$; D: $0,9 \pm 0,3$; ANOVA). En nuestras condiciones experimentales, la eficacia obtenida para GAPDH en la adenohipofisis no fue óptima. Sin embargo, se comportó como un gen de expresión media y no mostró variaciones en el ciclo estral en el hipocampo (P: $1,0 \pm 0,1$; E: $1,2 \pm 0,1$; D: $1,1 \pm 0,1$; ANOVA). En conclusión, hemos validado genes de control interno para el análisis de la expresión génica utilizando qPCR durante el ciclo estral, siendo la ciclofilina el gen más adecuado en la

adenohipofisis mientras que GAPDH lo es para el hipocampo. Nuestros datos son de utilidad para estudios de expresión génica en ratas ciclantes e indican la importancia de la validación del gen de referencia utilizado en cada modelo y cada tejido.

REPRODUCCIÓN 3

381. (557) EXPRESIÓN HIPOFISARIA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS BETA Y SU RELACIÓN CON LH Y FSH EN LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (LAGOSTOMUS MAXIMUS) DURANTE LA GESTACIÓN
Yankelevich, Lorena¹; Charif, Santiago Elías^{1,2}; Inserra, Pablo Ignacio Felipe^{1,2}; Proietto, Sofía¹; Corso, Clara¹; Vitullo, Alfredo Daniel^{1,2}; Dorfman, Verónica Berta^{1,2}
Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnósticos (CEBBAD), Universidad Maimónides¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)²

La vizcacha presenta poliovulación natural y pseudo-ovulación durante la gestación. Hemos descrito diferencias en la expresión hipofisaria de la hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) y de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en la vizcacha durante la gestación. El objetivo de este trabajo fue investigar la expresión hipofisaria del receptor de estrógenos beta (REb) durante la gestación y su relación con LH y FSH en la vizcacha. Se utilizaron hembras no preñadas no ovulando (NPNO) y ovulando (NPO), y con preñez temprana (PTem), media (PMed) y tardía (PTar), (n=5/grupo). Se realizó dosaje sérico de estradiol por ELISA y de LH por RIA, y se estudió la expresión hipofisaria de REb por inmunohistoquímica y su co-localización con LH y FSH. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y seguida del test de Newman-Keuls con significancia para $p < 0,05$. Se observó un aumento significativo de estradiol, acompañado por un aumento significativo de LH en NPO vs NPNO y en PMed vs PTem y PTar. Se identificó la expresión de REb con localización citoplasmática y distribución homogénea en la adenohipofisis de todos los grupos estudiados. Se determinaron diferencias significativas en el número de células inmunorreactivas para REb con aumento del 60% en NPO vs NPNO y disminución del 43% en PTar vs PTem, sin detectarse diferencias a nivel de densidad óptica. Estos cambios se correlacionaron con la co-expresión de REb y LH dado que se observó aumento significativo en el número de células que expresan ambas proteínas en NPO vs. NPNO y disminución en PTar vs PTem. Con respecto a FSH, se determinaron diferencias significativas en el número de células que co-expresan REb y FSH con un aumento de 10 veces en NPO vs NPNO y sin diferencias durante la preñez. Estos resultados indican que REb estaría involucrado en la expresión de LH y FSH en la ovulación, mientras que podría intervenir en la formación del cuerpo lúteo durante la preñez (PIP-CONICET 0225/2011).

382. (576) EXPRESIÓN DE LAS CITOQUINAS IL-6, IL-1 α Y TNF- α EN FOLÍCULOS OVÁRICOS BOVINOS CON PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA.
Stassi, Antonela; Díaz, Pablo; Belotti, Matías; Baravalle, María Eugenia; Salvetti, Natalia; Rey, Florencia; Ortega, Hugo
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), UNL-CONICET

La enfermedad quística ovárica constituye una de las causas más comunes de infertilidad en bovinos lecheros y la persistencia folicular es una de sus principales características. La ovulación es un proceso inflamatorio localizado y sumamente controlado cuya alteración podría contribuir a la patogenia de esta enfermedad. El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión de interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 1 α (IL1- α) y Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) en ovarios de animales con persistencia folicular inducida. Para ello, se desarrolló un modelo de persistencia folicular basado en el uso de dispositivos intravaginales de progesterona para ob-

tener concentraciones séricas subleutales de dicha hormona (1-2 ng/ml). Se realizó la ovariectomía para la obtención de ovarios con folículos dominantes que persistieron sin ovular por 5 (n=5; P5), 10 (n=5; P10) o 15 días (n=5; P15) posteriores al momento esperado para la ovulación. Los animales controles fueron sincronizados y ovariectomizados en proestro (n=5; C). Se evaluó la expresión de IL1- α , IL-6 y TNF- α mediante inmunohistoquímica en diferentes estructuras foliculares. Se determinó un aumento en la expresión de IL1- α en la granulosa de folículos antrales del grupo P5 en relación al resto de los grupos y una disminución en la expresión en la teca interna de los folículos persistentes P5 en relación al grupo P10 ($p < 0,05$). En la granulosa de los folículos antrales se observó un incremento en la expresión de IL-6 en todos los grupos en relación al control y en la teca interna aumentó la expresión en los folículos de los grupos P10 y P15 ($p < 0,05$). Finalmente, se observaron variaciones en la expresión de TNF- α en todos los estadios foliculares estudiados. Estos resultados nos permiten sugerir que existe una alteración en los mecanismos del proceso inflamatorio asociado a la ovulación y que las interleuquinas, como factores intervinientes en este proceso podrían ser parte de la patogenia de la enfermedad.

383. (586) EXPRESIÓN DE BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMP) 2, 4 Y 6 EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE ANIMALES CON ENFERMEDAD QUISTICA OVÁRICA ESPONTÁNEA E INDUCIDA CON ADRENOCORTICOTROPINA

Díaz, Pablo Uriel; Belotti, Matías; Stassi, Antonela; Gareis, Natalia; Matiller, Valentina; Amweg, Ayelén; Rey, Florencia; Salvetti, Natalia; Ortega, Hugo
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), UNL-CONICET

La enfermedad quística ovárica (EQO) es causa de infertilidad y pérdidas productivas en vacas lecheras. Las BMPs son importantes reguladores de la dinámica folicular. En bovinos BMP 2 y 6 son expresadas principalmente por células de la granulosa (CG) y la BMP 4 por células de la teca interna (CT). El objetivo del este trabajo fue estudiar la expresión de BMP 2, 4 y 6 en ovarios de vacas con EQO espontánea, inducida con ACTH y controles en proestro. Se utilizaron secciones de ovarios sobre las que se determinó la presencia de BMPs por inmunohistoquímica indirecta. Se realizó el análisis de imágenes de las distintas categorías de folículos de todos los grupos. Los tres ligandos fueron detectados en el citoplasma de CG y CT. Los folículos preantrales pequeños y antrales pequeños mostraron una mayor expresión de BMP2 en CG del grupo control en relación al grupo EQO inducida ($p < 0,05$). En CT se determinó una mayor expresión en folículos atrésicos del grupo control respecto a grupos con EQO ($p < 0,05$). En CG se observó una mayor expresión para BMP4 en los folículos del grupo EQO espontánea en relación a los demás grupos ($p < 0,05$). En CT se observó un incremento en la expresión de esta proteína en los folículos en estadios avanzados del grupo EQO espontánea en relación al grupo control ($p < 0,05$). Se determinó una menor expresión de BMP6 en CG de folículos de transición, preantrales pequeños, antrales grandes y atrésicos del grupo EQO inducida respecto a los grupos restantes. En CG de quistes espontáneos se expresó más intensamente que en relación a los quistes inducidos y a los folículos antrales del grupo control ($p < 0,05$). En CT se evidenció una mayor expresión en los folículos antrales grandes y quistes del grupo con EQO espontánea comparativamente al grupo EQO inducida ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que modificaciones en la expresión de los tres miembros de la subfamilia de BMPs estudiados ejercerían un rol importante en los mecanismos etiopatogénicos de la EQO.

384. (600) SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS Y POSIBLE RIESGO DE DESARROLLAR TUMOR DE CÉLULAS GERMINALES ANTES DE LA PUBERTAD

Berensztein, Esperanza²; Costanzo, Mariana²; Guercio, Gabriela²; Warman, Diana M.²; Ciaccio, Marta²; Vaiani, Elisa²; Aliberti, Paula²; Maceiras, Mercedes²; Marino, Roxana²;

Ramírez, Pablo²; Pérez Garrido, Natalia²; Sciarano, Roberta³; Ponzio, Roberto³; Solari, Alberto J.³; Bailez, Marcela⁴; Rivarola, Marco A.²; Belgorosky, Alicia²
Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría Garrahan¹
2° Unidad Académica de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Servicio de Cirugía, Hospital de Pediatría Garrahan³

El síndrome de insensibilidad a los andrógenos (AIS) se asocia con una tendencia a desarrollar cáncer de células germinales (CG). El OCT4 es un factor de transcripción expresado en células pluripotenciales. Acorde con literatura previa, el OCT4 se expresa en gonocitos fetales pero no a partir de los 3 meses de vida postnatal. Nuestro objetivo fue evaluar el grado de disgenesia, la presencia de gonocitos y la expresión de OCT4 en gónadas de pacientes con AIS. Estudiamos 19 gónadas de 11 pacientes, 13 gónadas CAIS (7 prepúberes (PP) (rango 1,25-10,3 años) y 6 púberes-adultos jóvenes (PU)(16,2-23,1 años) y 6 PAIS PP (2,3-8,8 años). Localización: gónadas PAIS 5/6 inguinales y 1 labioescrotal; gónadas CAIS 7/13 inguinales y 6/13 abdominales. El diagnóstico de AIS se basó en características fenotípicas, estudios hormonales y estudio del gen del receptor de andrógenos (AR). Control (C): 12 gónadas de pacientes sin enfermedad endocrino-metabólica 10 PP (0,006-10 años) y 2 PU (13-16 años). La descripción histológica fue hecha por dos observadores independientes. Todas las gónadas presentaron signos de disgenesia testicular. En CAIS PP: fibrosis intersticial, cordones seminíferos en anillo, microliquis, CG grandes y vacuoladas, CG apoptóticas. En CAIS PU: hiperplasia de células de Leydig, escasas CG, células de Sertoli acidófilas, membrana basal engrosada y ausencia de espermatozoides I. En PAIS PP: CG multinucleadas. Se observó expresión de OCT4 y presencia de gonocitos en CAIS PP (5/7 y 6/7), en CAIS PU (2/6 y 1/6) y en PAIS PP (2/6 y 2/6, respectivamente), $p = NS$, test de Fisher. Por ultramicroscopía se confirmó la presencia de abundantes gonocitos de localización basal o parabasal en dos gónadas CAIS (1.8 años). En el grupo C no se encontró expresión de OCT4 ni presencia de gonocitos. En conclusión, la expresión de un marcador de riesgo de cáncer de CG, y la presencia de CG anormalmente inmaduras en testículos inguinales de pacientes PP AIS sugieren la necesidad de un cuidadoso seguimiento de estos pacientes.

385. (606) LAS FAMILIAS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF) Y DE LAS ANGIOPOYETINAS (ANGPT) SE ENCUENTRAN ALTERADAS EN EL SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO.

Scotti, Leopoldina¹; Di Pietro, Mariana¹; Irusta, Griselda¹; De Zúñiga, Ignacio²; Bisioli, Claudio²; Tesone, Marta¹³; Parborell, Fernanda¹; Abramovich, Dalhia¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ PREGNA Medicina Reproductiva² Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires³

El Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS) es la patología endocrinológica más común en mujeres en edad fértil. Es un síndrome heterogéneo caracterizado, entre otras cosas, por anomalías en la angiogénesis ovárica. Mientras que el VEGF promueve la migración y proliferación de células endoteliales, existen factores involucrados en la estabilidad y permeabilidad vascular, como las ANGPTs y los PDGF. En pacientes PCOS, la expresión ovárica de VEGF está aumentada. Sin embargo, no han sido estudiados otros factores angiogénicos en estas pacientes. Nuestra hipótesis fue que además del VEGF, otros factores angiogénicos están alterados en los ovarios de pacientes PCOS. Primero, estudiamos el sistema de PDGF en un modelo de PCOS desarrollado en rata. Luego estudiamos los niveles de PDGFB, PDGFD, ANGPT 1, 2 y su receptor soluble TIE2 (sTIE2), en fluidos foliculares (FF) de pacientes PCOS y control sometidas a técnicas de fertilización asistida. Además, analizamos el efecto de incubación de células endoteliales en presencia de estos FF sobre los niveles de proteínas de uniones adherentes y estrechas. Encontramos una disminución en la expresión de PDGFB, D y del receptor

PDGFR β en ovarios de ratas PCOS. Corroboramos esta disminución de los ligandos en los FF humanos. También encontramos un aumento en los niveles de ANGPT1 en pacientes PCOS, sin observarse cambios en los niveles de ANGPT2 y sTIES. Claudina 5 aumentó en las células endoteliales incubadas por 24 hs en presencia de los FF PCOS respecto a FF control. Los niveles de p-VE-caderina, p- β -catenina y ZO1 fueron similares en todos los tiempos analizados. Los resultados sugieren que las alteraciones observadas en los sistemas de ANGPTs y PDGFs podrían prevenir la permeabilidad vascular inducida por VEGF en el ovario. El mecanismo sería en parte a través de la regulación de las proteínas de uniones intercelulares en el endotelio. La normalización de los niveles de factores angiogénicos podría considerarse como una nueva estrategia terapéutica en pacientes PCOS.

386. (607) LA TOXINA SHIGA-2 RESPONSABLE DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO PRODUCE PÉRDIDA FETAL EN RATAS EN ESTADO TEMPRANO DE PREÑEZ POR ACCIÓN DIRECTA SOBRE LA UNIDAD FETO-MATERNOPLACENTARIA POTENCIADA POR EL ESTADO INFLAMATORIO

Sacerdoti, Flavia¹; Amaral, María Marta¹; Franchi, Ana²; Ibarra, Cristina¹

Laboratorio de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET²

Las infecciones sintomáticas o asintomáticas por *E. coli* productor de toxina Shiga tipo 2 (Stx2) durante el embarazo podrían causar daños maternos y fetales mediados por la toxina. Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que la administración de dosis subletales de Stx2 a ratas en estado temprano y tardío de preñez produce daño y pérdida fetal. En el presente trabajo estudiamos los mecanismos involucrados en la acción de Stx2 sobre la unidad feto-materno-placentaria (UFMP) en ratas Sprague Dawley de 8 días de preñez. Las ratas se inyectaron por vía intraperitoneal con 0,5 ng de Stx2/g de peso corporal y se sacrificaron a distintos tiempos post-inyección. La localización de Stx2 en la UFMP se detectó por inmunohistoquímica (IHQ) con un anticuerpo anti-Stx2A. Para evaluar los daños producidos por la toxina sobre el endotelio vascular y sus efectos sobre la perfusión sanguínea se estudió la hipoxia tisular por la presencia de pimonidazole en la UFMP revelado por IHQ (Hypoxyprobe-1). También se estudió los niveles de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por western blot. Para evaluar el estado inflamatorio se midió el factor de necrosis tumoral (TNF- α) por ELISA y se cuantificó el infiltrado leucocitario en la UFMP. Los resultados muestran que Stx2 se localiza y daña la microvasculatura uterina lo que llevaría a una disminución de la perfusión sanguínea, un aumento de hipoxia y una disminución de VEGF. A su vez, el aumento de TNF- α ($p < 0,05$, $n=4$) en la UFMP se correlaciona con el aumento del infiltrado leucocitario. Estos resultados sugieren una acción directa de Stx2 en la UFMP que podría estar potenciada por el desarrollo de un estado inflamatorio.

387. (611) RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGFRs) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS: EVIDENCIAS DE SU ACTIVACIÓN Y PARTICIPACIÓN EN LA MOTILIDAD

Saucedo, Lucía¹; Góngora, Adrián¹; Muncu, María José²; Vázquez Levin, Mónica¹; Marín Briggiler, Clara¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Repronlab, Sanatorio Británico de Rosario²

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) y sus receptores han sido caracterizados en células somáticas; se conoce que la exposición a FGFs desencadena la fosforilación de los FGFRs y la activación de vías de señalización intracelular, que llevan a la transcripción génica. En estudios previos identificamos la presencia de FGFRs en el flagelo y en la cabeza de espermatozoides humanos, aunque aún no hay evidencias de su funcionalidad ni

de su participación en la regulación de la fisiología espermática. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la activación de los FGFRs espermáticos relacionada al proceso de capacitación y en respuesta al ligando FGF2, y analizar su rol en la regulación de la motilidad. Se utilizaron espermatozoides humanos no capacitados e incubados en condiciones que promueven la capacitación, que fueron expuestos a diferentes concentraciones de FGF2. Se evaluó la fosforilación de los FGFRs y la activación de las vías de ERK y Akt por inmunocitoquímica y Western immunoblotting. Se analizaron los porcentajes de motilidad y parámetros cinemáticos utilizando el sistema computarizado ISAS v1. Los resultados mostraron que la incubación en condiciones capacitantes por 4 h produjo un aumento significativo ($P < 0,01$) en la fosforilación de los FGFRs flagelares con respecto a la observada en espermatozoides no capacitados, indicando la fosforilación de los FGFRs asociada a la capacitación espermática. La exposición de los espermatozoides capacitados al FGF2 (10 y 100 ng/ml) por 15 min condujo a un aumento significativo en la fosforilación de los FGFRs y de las quinasas ERK y Akt. Estos efectos fueron bloqueados con el inhibidor de FGFRs BGJ398. La incubación con FGF2 100 ng/ml produjo un incremento significativo en los porcentajes de motilidad total y progresiva, así como en la cinemática espermática. En conclusión, los FGFRs presentes en los espermatozoides humanos son funcionales y el sistema FGF2/FGFRs participa en la regulación de la motilidad.

388. (619) EFECTO DE SPINK3 EN EL MEJORAMIENTO DE PARÁMETROS SEMINALES DE ESPERMATOZOIDES CRIOCONSERVADOS DE CARNERO

Zalazar, Lucía¹; Ledesma, Alba²; Hozbor, Federico²; Cesari, Andreina¹

Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB)-CONICET, Universidad Nacional de Mar del Plata¹ Depto. de Producción Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Balcarce²

La congelación del semen es una herramienta biotecnológica que tiene un rol importante en la conservación de germoplasma de individuos de especies con alto valor genético, de interés productivo y reproductivo. Los espermatozoides de algunas especies como los de carnero, presentan gran sensibilidad a sufrir daños durante el proceso de congelación/descongelación y en consecuencia, su eficiencia se ve comprometida por la reducción en la capacidad fertilizante luego de la descongelación. Con el objetivo de mejorar la calidad de espermatozoides crioconservados de carnero, se ha estudiado el efecto de ciertas proteínas como posibles agentes que revierten el daño causado por la congelación. Se conoce que SPINK3 (*Serin Protease Inhibitor Kazal-type 3*) es un inhibidor de serina proteasas secretado por la próstata y la vesícula seminal que se libera de la superficie espermática en el tracto reproductor femenino. Reportes previos de nuestro grupo indican que además de inhibir el ingreso de calcio al espermatozoide de ratón, disminuye los porcentajes de reacción acrosomal inducida por progesterona. Así, para este estudio, se generó como herramienta de trabajo la proteína SPINK3 recombinante de ratón. Los espermatozoides crioconservados de carnero fueron descongelados, incubados con SPINK3 y distintos parámetros espermáticos como capacitación, reacción acrosomal y movilidad fueron analizados. Nuestros resultados muestran que SPINK3 tiene un efecto significativamente mejorador sobre la movilidad total y progresiva de espermatozoides descongelados a partir de los 30-45 minutos de incubación con la proteína. Por otro lado, se observó una tendencia a disminuir el número de espermatozoide reaccionados. Por el contrario cuando la proteína se agregó al medio de congelación, no se observó ningún efecto. Estas evidencias sostienen que SPINK3 sería capaz de revertir el efecto de la congelación en espermatozoides de carnero y se especula que esta proteína podría emplearse como herramienta de aplicación biotecnológica en la congelación del semen de carnero.

389. (637) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC) EN EL AUMENTO DE PESO EN UN MODELO DE OBESIDAD MATERNA

Bariani, María Victoria; Domínguez Rubio, Ana Paula; Salazar, Ana Inés; Aisemberg, Julieta; Franchi, Ana María
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial considerada uno de los principales problemas de la salud pública. La prevalencia de la obesidad materna está en aumento y se asocia directamente con resultados perinatales adversos. El SEC está profundamente involucrado en aspectos asociados al control del balance energético, facilita la ingesta de energía y mejora su almacenamiento en el tejido adiposo. La disregulación del balance energético por endocannabinoides puede contribuir a la obesidad y a enfermedades asociadas a esta. Nuestro objetivo fue evaluar el desarrollo de obesidad materna por ingesta de una dieta alta en grasas (DAG) en ratones deficientes del receptor de cannabinoides tipo1 (KO CB1) y los posibles efectos sobre la gestación y el desarrollo de las crías. Hembras CD1 silvestres (WT) y KO CB1 de 1 mes de edad fueron alimentadas durante 3 meses con alimento estándar (control) o con una dieta alta en grasas (alimento estándar + 30% grasa). Observamos que la ganancia en peso es mayor en las hembras KO CB1 respecto a las WT ($p < 0,05$) a pesar de no haber diferencias en la ingesta promedio de kilocalorías/día entre los grupos. El peso del tejido adiposo abdominal fue mayor ($p < 0,05$) en las hembras alimentadas con la DAG, tanto en WT como KO CB1. Además, observamos un aumento ($p < 0,05$) en los niveles sanguíneos de colesterol en las hembras obesas, siendo mayor en las KO CB1, sin encontrar diferencias en ningún caso en los niveles de glucosa en sangre. Hembras obesas 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 grupos. Sin embargo, las crías nacidas de madres obesas, tanto WT como KO CB1, presentaron mayor peso durante la lactancia. Estos resultados nos sugieren que el SEC participaría en desarrollo de la obesidad materna y que la misma produce consecuencias en las crías.

390. (651) ¿ES EL TSPY UN MARCADOR PREMALIGNO DE TUMORES GERMINALES?

Aliberti, Paula; Marino, Roxana; Saraco, Nora; Chirico, Diego; Juanes, Matías; Rivarola, Marco; Belgorosky, Alicia; Berensztein, Esperanza
Hospital de Pediatría Garrahan

El factor de transcripción OCT3/4 se expresa en tumores de células germinales (CG) con características pluripotenciales (Cools, 2006). El TSPY (testis-specific protein Y-encoded) tendría una función normal en la proliferación de CGs, aunque predispondría a tumorigénesis en testículo disgenético (Li, 2007). TSPY, junto con OCT3/4, se utilizan como marcadores biológicos de tumores de CG en gónadas disgenéticas. No obstante, la expresión de TSPY en testículo normal prepúberal apenas se conoce. Decidimos estudiar la expresión de TSPY y OCT3/4 en testículos humanos controles prepúberes y púberes. Se utilizaron tejidos testiculares obtenidos de necropsia o biopsia de pacientes pediátricos sin enfermedad metabólica ni endocrinológica (controles). Se analizó por RT-PCR la expresión del ARNm del TSPY en 17 testículos prepúberes, de edad cronológica (EC): 1 año (a) (1 día-7,9 a) (mediana, M, y rango). Se estudió la expresión proteica de TSPY y OCT3/4 por inmunohistoquímica (IHQ) en 17 muestras de testículo embudadas en parafina de 14 controles prepúberales, de EC: 0,33 a (1 día-12,8 a), y 3 púberales, de EC 12,5 a (12 a-13,8 a). La presencia de TSPY por RT-PCR se observó en un 76% de las muestras (13/17), y la ausencia en 4/17. Expresión de TSPY por IHQ se halló en un 60% (9/15) de las muestras prepúberes y ausencia en 6/15. No se encontró diferencia significativa entre las M y rangos EC. El 100% de las muestras púberes (3/3) marcaron positivamente para TSPY. Se encontró una amplia variabilidad en la distribución de túbulo seminíferos positivos tanto en prepúberes, M 57,5% (20-86,4), como en púberes, M 63,6% (48-90) (mediana y rango). En contraste con los datos publicados (Cools, 2005), se observó gran variabilidad entre tejidos de pacientes de la misma EC. Ninguna muestra tiñó positivamente para OCT3/4.

En conclusión, consideramos que la utilización del TSPY como marcador premaligno para los tumores de GCs no es confiable.

391. (655) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BAX, BCL-2 Y VEGF EN GLÁNDULA MAMARIA DE HEMBRAS ADULTAS DE LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (*LAGOSTOMUS MAXIMUS*) A LO LARGO DE LOS DISTINTOS ESTADIOS REPRODUCTIVOS

Corso, María Clara¹; Inserra, Pablo Ignacio Felipe^{1,2}; Charif, Santiago Elías^{1,2}; Giménez, Juliana^{2,3}; Vitullo, Alfredo Daniel^{1,2}; Halperín, Julia^{1,2}
Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico, Universidad Maimónides¹ CONICET² Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³

La glándula mamaria (GM) remodela su estructura de manera continua durante la vida reproductiva de las hembras. Mientras que la preñez trae aparejada proliferación, elongación y ramificación tubular, el destete gatilla un proceso de involución con apoptosis masiva que remodela la GM a un estado de pre-preñez. Previamente hemos analizado la expresión de receptores de estrógeno α y β (ER α y ER β), de progesterona (PR) y de prolactina (PRLR) durante la morfogénesis de la GM de vizcachas. Con el objetivo de estudiar la remodelación de la GM de vizcacha se caracterizó la inmunexpresión de Bax, Bcl-2 y VEGF durante los estadios de reposo, preñez, lactancia e involución calculando el porcentaje de área inmunoreactiva sobre el total del área glandular ($n=5$ /grupo, Image-Pro Plus Software). Mientras que la expresión de Bax es constante durante el reposo y la preñez, la misma disminuye casi 90% en la lactancia y repunta al inicio de la involución ($p < 0,05$). Bcl-2 se expresa en GM en reposo pero se reprime un 85% en la preñez y la lactancia en contraposición al patrón de expresión del PRLR ($p < 0,05$). Más aún, la relación en la expresión Bax/Bcl-2 en GM en reposo aumenta marcadamente durante la preñez y disminuye en la lactancia acompañando al perfil de expresión de ER β ($p < 0,05$). Por último, la expresión de VEGF se incrementa desde el reposo hasta el fin de la preñez y luego disminuye en la lactancia y la involución de la GM acompañando el perfil de expresión de ER α . Los resultados apoyan al modelo de GM cuyo crecimiento durante la preñez viene acompañado de un aumento en la angiogénesis que se evidenciaría con la expresión aumentada de VEGF. Asimismo, la apoptosis post-destete se encontraría regulada por el balance en la expresión de Bcl-2 y Bax aunque los perfiles de expresión de los mismos presentan algunas variaciones respecto a otros roedores que podrían estar relacionadas con el perfil hormonal atípico de estos animales. (PIP-CONICET 0272)

392. (658) REDISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA EGFP EN EL ACROSOMA COMO INDICADOR PREVIO A LA EXOCITOSIS ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES MURINOS

La Spina, Florenza Antonella¹; Romarowski, Ana¹; Puga Molina, Lis Del Carmen¹; Vitale, Alejandra Mariel¹; Hirohashi, Noritaka²; Buffone, Mariano Gabriel¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Education and Research Center for Biological Resources, Shimane University²

El espermatozoide de mamífero adquiere la capacidad fecundante luego de residir un tiempo finito en el tracto reproductor femenino, en un proceso denominado capacitación. Uno de los cambios más importantes que ocurre durante este proceso es el desarrollo de la capacidad para realizar la reacción acrosomal (RA), el cual es fundamental para penetrar la zona pelúcida (ZP) del ovocito. Antecedentes previos han demostrado que el espermatozoide que llega al sitio de fertilización reacciona antes de contactar con la ZP y a pesar de que diferentes estimulantes de la RA fueron reportados, el verdadero inductor fisiológico aún no ha sido identificado. En este contexto, se piensa que la progesterona producida por las células del cúmulus podría ser el promotor natural de la RA. En este trabajo, utilizando un modelo transgénico, mostramos que el espermatozoide realiza un rea-

rreglo dinámico del acrosoma durante la capacitación *in vitro*, el cual se visualiza a través de la relocalización de la proteína EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), desde la región acrosomal anterior hacia el segmento ecuatorial de la cabeza espermática. Esta relocalización se observó en mayor magnitud luego de 4 h en condiciones capacitantes. Los espermatozoides que exhibían el patrón ecuatorial fueron más sensibles a reaccionar por la progesterona. Con el fin de evaluar la importancia fisiológica de este cambio en el acrosoma se realizaron apareos con ratones transgénicos para analizar el estado acrosomal *in vivo*, observándose los mismos patrones en el oviducto que los obtenidos *in vitro*. Nuestro trabajo sugiere que la relocalización de EGFP en el acrosoma puede ser indicador de estadios pre-exocíticos, seleccionando aquel espermatozoide que está preparado para la RA. Esto propone una nueva herramienta que junto con la transgénica permite identificar a los espermatozoides que sufren la RA *in vivo*, y así poder dilucidar dónde y cuándo ocurre este fenómeno dentro del tracto reproductor femenino.

- 393. (675) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN ENTRE PROLACTINA Y LH, Y SUS RECEPTORES, EN LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (*LAGOSTOMUS MAXIMUS*) ADULTA DURANTE EL CICLO REPRODUCTIVO**
 Proietto, Sofía¹; Yankelevich, Lorena¹; Corso, María Clara¹; Inserra, Pablo Ignacio Felipe^{1,2}; Charif, Santiago Elías^{1,2}; Villarreal, Federico¹; Vitullo, Alfredo Daniel^{1,2}; Dorfman, Verónica Berta^{1,2}; Halperin, Julia^{1,2}
Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)²

El eje hipotalámico-hipofisario-gonadal de la vizcacha se mantiene activo durante la gestación permitiendo el desarrollo de folículos ovulatorios y cuerpos lúteos secundarios. Con el objetivo de estudiar la expresión de prolactina (PRL) y hormona luteinizante (LH) y su relación con la poliovulación, folículo-génesis y luteinización durante la gestación en vizcachas, se realizó inmunohistoquímica cuantificando densidad óptica (DO) y área celular inmunorreactiva (ACI) de PRL y LH en hipofisis y de sus receptores en ovarios en distintos estadios del ciclo reproductivo: no preñadas no ovulando (NPNO), ovulando (NPO), lactancia (LAC), preñez temprana (PTem), media (PMed) y tardía (PTar), (n=5/grupo). Los datos se analizaron mediante ANOVA (p<0,05). Se determinaron diferencias significativas en la expresión de PRL durante el ciclo reproductivo con mayor DO y ACI en los animales NPO y LAC y menor en PTar. La expresión de LH también mostró un incremento significativo en PMed y NPO para ambos parámetros. No se observó co-localización dado que la expresión PRL predominó en células de la periferia glandular mientras que LH se localizó en gonadotrofos del centro de la glándula. En cuanto a RPRL y RLH, ambos se expresan en las células de granulosa (CG) durante todo el crecimiento folicular y en las células luteales (CL) con complejos perfiles de expresión que estarían íntimamente relacionados tanto con el estadio reproductivo del animal como con el estadio de desarrollo folicular. En particular, el CL mostró un incremento paulatino y desfazado en la expresión de ambos receptores a medida que las hembras transitan desde el estadio NPNO hacia la PTar, mostrando el RPRL su máxima expresión en hembras NPO mientras que el pico de RLH se detectó en hembras Ptemp. La presencia de ambos receptores en CG y CL junto con perfiles hipofisarios de expresión hormonal semejantes indicarían una íntima relación de ambos sistemas hormonales en los procesos de folículo-génesis y luteinización

- 394. (755) EFECTO DEL ACETATO DE ULIPRISTAL (UPA) SOBRE LA CAPACIDAD FERTILIZANTE DEL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN *IN VITRO* E *IN VIVO***
 Gómez Elías, Matías Daniel¹; Munque, María José²; Bahamondes, Luis³; Cuasnicú, Patricia S.¹; Cohen, Debora J.¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) CONICET¹ Laboratorio de Medicina Reproductiva, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Na-

cional de Rosario² Área Ginecología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil³

El acetato de ulipristal (UPA) es un modulador selectivo del receptor de progesterona introducido recientemente al mercado como anticonceptivo de emergencia (AE). Si bien su principal mecanismo de acción es inhibir la ovulación, aún se conoce poco acerca de sus efectos post-ovulatorios. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del UPA, a concentraciones similares a las utilizadas para AE, sobre la fertilización *in vitro* e *in vivo* utilizando el modelo murino. Para los ensayos *in vitro*, los espermatozoides fueron capacitados en presencia de distintas concentraciones de UPA (0,01 – 1 ug/ml) y utilizados para inseminar ovocitos con (OCC) o sin (OSC) cumulus en presencia de UPA durante la co-incubación de gametas, evaluándose, luego, el porcentaje de ovocitos fertilizados (%F). En paralelo, se evaluó la reacción acrosomal (RA) espontánea e inducida por progesterona. La presencia de UPA no afectó ninguno de los parámetros evaluados (c/1ug/ml UPA vs s/UPA:%F OCCs: 52±8 vs 67±5;%F OSC: 56±14 vs 60±10;% RA espontánea: 34±4 vs 34±3;% RA inducida: 47±5 vs 49±9, n=5). Para los ensayos *in vivo*, hembras en proestro fueron superovuladas (por inyección de PMSG y hCG), puestas en apareo por 40 min en el momento de la ovulación e inyectadas con vehículo o UPA (40 mg/kg) al inicio o al final del apareo, determinando luego el%F. Como control de la actividad del UPA, un grupo de hembras recibió la droga junto a la hCG, evaluándose el número de ovocitos ovulados. Mientras que la inyección de UPA produjo una disminución significativa en el número de ovocitos ovulados respecto del control (34±9 vs 18±5, p< 0,05), no se observaron diferencias en el%F en ninguno de los esquemas ensayados (UPA inicio: 70±2 vs 80±17; UPA final: 85±4 vs 82±10, n=3). En conjunto, nuestros resultados apoyan que el mecanismo de acción de UPA no involucraría un efecto sobre la interacción de gametas y que, por lo tanto, estaría principalmente relacionado al efecto inhibitorio sobre la ovulación.

- 395. (775) DIETAS EXCEDIDAS EN ÁCIDO LINOLEICO (ω 6) PUEDEN MODIFICAR EL ÉXITO REPRODUCTIVO Y EL DESARROLLO GESTACIONAL DE RATONES ALBINO SWISS.**
 Solís, María Del Rosario¹; Bianconi, Santiago¹; Szlabi, Susana²; Mazzuduli, Gina²; Stutz, Graciela¹; Santillán, María Emilia^{1,2}
Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Rioja²

Los ácidos grasos esenciales intervienen en la reproducción y el desarrollo neurobiológico postgestacional de crías de ratón. Objetivo: evaluar los efectos de dietas con exceso de ácido linoleico (18:2 α 6 AL) en el desarrollo gestacional de ratones. Hembras con tapón mucoso vaginal (día gestacional 0,5= DG-0,5; n=75), se asignaron a tres grupos: control (C, dieta comercial, AL=1,6% n=25) o C con 10% de aceites de soja o girasol (S, AL=6,68% n=24 y G, AL=7,68% n=26, respectivamente). En los DG-6,5; 12,5 y 16,5 se evaluó: éxito reproductivo (ER), número de fetos totales (FT) y reabsorbidos (FR), peso (PF), longitud (LF) y características físicas fetales (CF), fetos con meconio (M). Al DG 16,5: vitalidad fetal (VF) y saco vitelino graso (SVG). Se realizó histopatología (H/E) placentaria y fetal. Estadística: ANOVA, Chi-cuadrado, Kruskal-Wallis. ER menor al DG-12,5 en G(47%) vs C(69%) y al DG-16,5 en S(47% vs C(67%); p<0,05. Al DG-16,5 PF fue menor en S y G vs C, con reducción de VF (69,6% n=115 y 73,9% n=84 vs 92,8% n=52; p<0,05) y LF. Las CF fueron similares en todos los grupos. Al DG 16,5 M fue mayor en G y S vs C (49,5% n=96 y 58,9% n=67 vs 21,1% n=51; p<0,05). SVG mayor en G y S vs C al DG 16,5 (100% n=65 y 83% n=42 vs 33% n=19; p=0,05). En C, mayor vascularización del laberinto placentario vs G y S, p<0,05. Al DG 12,5 órganos fetales primitivos y al DG 16,5, órganos desarrollados, tejidos óseo y cartilagenoso. El ER disminuido en S y G podría deberse al exceso de AL que incrementa la PGF2 α con efecto luteolítico y al déficit de ácido α -linoléico,

asociado a folículos ováricos pequeños y poco eficaces para la fecundación. La menor vascularización placentaria y el mayor porcentaje de SVG y M también justificarían la reducción del ER, de la vitalidad y del crecimiento fetal en los grupos tratados. El poco tiempo de exposición a las dietas podría explicar la ausencia de cambios en órganos, tejidos y reabsorciones fetales. Subs: SECyT-UNC, CICyT-UNLaR

396. (839) INYECCIÓN INTRA-CITOPLASMÁTICA (IIC) DEL GEN PARA LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) EN CIGOTAS PORCINAS GENERADAS POR FIV PRE-TRATADAS CON IONOMICINA

Luchetti, Carolina Griselda; Bevacqua, Romina Jimena; Salamone, Daniel Felipe
Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA)

Con el objetivo de obtener embriones porcinos por FIV expresando GFP, se realizaron dos experimentos (Exp): en el Exp1 se trataron los ovocitos con ionomicina previo a la FIV. En el Exp2 se testeó la IIC de vesículas ooplásmicas co-incubadas con el transgen. Todas las incubaciones se realizaron a 39°C con 5% CO₂ y 100% humedad. Exp1: ovocitos porcinos fueron madurados *in vitro* 44-48 h en TCM199 + fluido folicular porcino (10%), FGF (3,6ng/mL) y FSH (30µg/mL). A continuación fueron desnudados. Un grupo fue tratado 4 min con ionomicina (*Io+*) 5 µM y el control no (*Io-*). Luego fueron fecundados por incubación 30 min con semen fresco (1x10⁶espermatozoides/mL) en medio BO modificado. Exp2: cigotas *Io+* fueron IIC con vesículas ooplásmicas co-incubadas con plásmido pcx-EGFP (30 ng/ul) linealizado con la enzima HindIII (*ves*), con plásmido desnudo (*des*), o no inyectadas (*Ctrl*). Se registró el porcentaje de clivados (%cl), de blastocistos (%bl) y de embriones GFP+ bajo luz azul (%GFP). Los datos fueron analizados por el test de Fisher (p<0,05). Exp1: se observó mayor%cl en *Io+* (N=108): 51%cl frente a *Io-* (N=212): 26%cl. Exp2: no se observaron diferencias en el%GFP entre *ves*: 51% y *des*: 36%. Se observó mayor%cl en los grupos IIC *ves* (N=94): 84%cl y *des* (N=44): 91%cl que en el *Ctrl* (N=79): 52%cl. Concluimos que el tratamiento de los ovocitos con ionomicina previo a la FIV mejora el desarrollo embrionario *in vitro*. La IIC de las cigotas podría tener un efecto activador adicional ya que aumenta el%cl y se mantiene el%bl. La IIC del gen *gfp*, tanto desnudo como co-incubado con vesículas ooplásmicas, resulta útil en la obtención de embriones GFP+.

METABOLISMO/NUTRICIÓN 3

397. 566) FKBP51, ¿UNA NUEVA PROTEÍNA INVOLUCRADA EN EL PROCESO DE LIPÓLISIS?

Lombardi, Antonella; Piwien-Pilipuk, Graciela; Toneatto, Judith
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

La inmunofilina (INM) de alto peso molecular, FKBP51, posee una alta expresión en el tejido adiposo. Recientemente hemos demostrado, usando como modelo de diferenciación a los preadipocitos 3T3-L1, que FKBP51 cumple un rol muy importante a lo largo del proceso de diferenciación adipogénico. Sin embargo, su función en el adipocito aún no ha sido dilucidada. Se conoce que las vesículas lipídicas contenidas en los adipocitos proporcionan un mecanismo homeostático para regular los niveles de lípidos intracelulares, a través de un proceso denominado lipólisis, en el cual están involucradas numerosas proteínas, entre ellas Perilipina, quien cumple un rol central, junto con PKA y la lipasa sensible a hormona (LSH), entre otros cofactores. En el presente estudio demostramos que en adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales, FKBP51 colocaliza con Perilipina observándose pequeños anillos de intensidad poco homogénea alrededor de las vesículas lipídicas de menor tamaño ubicadas próximas a la membrana plasmática. En cambio, cuando los adipocitos son estimulados con Forskolina e IBMX (Isobutilmetil xantina), lo que causa aumento intracelular

de AMPc, activación de PKA y la fosforilación de Perilipina y LSH, FKBP51 presenta una marcada colocalización con la forma fosforilada de LSH como así también con PKA, observándose en ambos casos pequeños acúmulos en torno a las vesículas lipídicas. Además, la INM continúa colocalizando parcialmente con Perilipina. Debido a que FKBP51 interactúa con PKA-c, quinasa clave en la regulación del proceso de lipólisis, estos hallazgos sugieren que la INM podría participar en la regulación de dicho proceso, el cual es selectivo de vesículas de pequeño tamaño. Para ahondar en el mecanismo molecular que controla la lipólisis nos encontramos evaluando por ensayos de inmunoprecipitación la posible interacción de FKBP51 con las diferentes proteínas involucradas en dicho proceso como así también la importancia funcional de dichas interacciones a través de ensayos de lipólisis.

398. (640) METABOLISMO OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN CORTEZA RENAL DE RATAS DEFICITARIAS EN ÓXIDO NÍTRICO: EFECTO DE (-)-EPICATEQUINA (EC) DIETARIA

Prince, Paula Denise¹; Fischerman, Laura¹; Elesgaray, Rosana²; Fraga, César Guillermo¹; Galleano, Mónica¹
*Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*¹ *Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*²

La (-)-epicatequina (EC) pertenece al grupo de los flavonoides, fitoquímicos ampliamente estudiados por sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración dietaria de EC en ratas deficitarias en óxido nítrico (NO). Ratas Sprague-Dawley se trataron 4 d según los siguientes grupos: control (C: dieta control y agua corriente de bebida); L-NAME (L: dieta control y L-NAME 360 mg/L en agua de bebida) y L-NAME + EC (LE: dieta suplementada con EC (4 g/kg de dieta) y L-NAME 360 mg/L en agua de bebida). La actividad de óxido nítrico sintasa (NOS), medida por la técnica de arginina marcada, fue significativamente menor en L con respecto a C, mientras que el grupo LE mostró valores similares a los del grupo C (C=172±5; L=72±5*; LE=183±4 pmol [¹⁴C] L-citrulina/g de tejido/min). La producción de anión superóxido, estimada como la quimioluminiscencia de lucigenina NADPH-dependiente e inhibible por SOD, y medida en muestras libres de mitocondrias, se asoció a la actividad de NADPH oxidasa (NOX). Este parámetro resultó significativamente mayor en L con respecto a los otros grupos experimentales (C=2,7±0,9; L=9±2*; LE=3±1 UA/mg de prot). Se midieron indicadores de estrés oxidativo (TBARS) y nitrosativo (proteínas nitrosiladas por western blot). Se encontró un aumento significativo en TBARS en los grupos L y LE respecto al C (C=181±9; L=222±12*; LE=217±2* nmol/mg de prot), mientras que no hubo variaciones significativas en la nitrosilación de proteínas. Los resultados indican que la administración dietaria de EC se asoció a un restablecimiento en la producción de NO en corteza renal. La modulación en la producción de anión superóxido sería uno de los mecanismos involucrados. Experimentos adicionales se requerirán para establecer los efectos sobre expresión y modificaciones post-traduccionales de NOS y NOX. (*p<0,05 respecto a C y LE, #p<0,05 respecto a C). UBACyT 0659 y 0177, PIP0612, PICT-2012-0765.

399. (659) EFECTOS DE LA INGESTA ORAL DE FB1 EN RATAS

Echarte, Stella Maris^{1,2}; Chisari, Andrea^{1,2}; Reynoso, Marcela³; Resnik, Silvia³; Motta, Estela¹
*Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata*¹ *Depto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata*² *Depto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata*³

Las fumonisinas son micotoxinas producidas por *Fusarium verticilloides*, *Aspergillus niger* y *Fusarium proliferatum* que contaminan principalmente el maíz y los alimentos derivados del maíz. La fumonisina B₁ (FB₁) es la más común y abundante de todas las fumonisinas; inhiben la enzima ceramida sintetasa produciendo

una disrupción del metabolismo de los esfingolípidos que es la base del mecanismo de patogénesis y toxicidad. La ingesta de maíz contaminado puede ser de riesgo en grupos más expuestos como pacientes celíacos y niños. Objetivos: Poner a punto un modelo en rata con ingesta de fumonisina y determinar la concentración de FB_1 en plasma; y evaluar parámetros bioquímicos a distintos tiempos (30 min y 24 hs) después de una ingesta oral de FB_1 (aislada de cultivo de *Fusarium proliferatum*) y crónicos (10mg/kg/día, durante 28 días). Se utilizaron ratas Wistar macho de 1 mes de edad. Los respectivos controles recibieron solución salina. Todas las ratas fueron sacrificadas en cámara de CO_2 y por punción cardíaca se extrajo sangre, para estudios de parámetros hematológicos, hepáticos y renales y, cuantificación de la FB_1 . Para la determinación de FB_1 en plasma se utilizó el método de Shepard y col (1992) con algunas modificaciones. La exactitud del método fue evaluada por análisis de plasma fortificado con FB_1 , a nivel de 200 ng/ml con una recuperación de 148%. El límite de detección fue de 50 ng/ml. La concentración plasmática promedio en las ratas tratadas con FB_1 de muestras plasmáticas a los 30 minutos de la dosis oral fue de $5,18 \pm 0,28$ μ g/ml. Los parámetros bioquímicos mostraron una disminución significativa vs controles, en el número de plaquetas ($464.10^3 \pm 6,4 \cdot 10^3$ vs $893.10^3 \pm 68.10^3$ /mm³), urea ($38,0$ mg% $\pm 1,5$ vs $58,7$ mg% $\pm 6,7$) y creatinina ($0,57$ mg% $\pm 0,01$ vs $0,97$ mg% $\pm 0,11$). Estos resultados confirman la toxicidad de FB_1 y nos permiten disponer de un método analítico para en análisis de FB_1 en plasma.

- 400. (680) LA HORMONA OREXIGÉNICA GHRELINA SE UNE IN VITRO A ALBÚMINA SÉRICA DE RATA Y HUMANA**
Lufrano, Daniela¹; Frassa, Victoria²; Salgueiro, Mariano³; Llovera, Ramiro Esteban³; Ermácora, Mario^{2,3}; Perelló, Mario²
Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (Li-ProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata¹ Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-CONICET² Grupo de Biología Estructural y Biotecnología (GBEYB), Universidad Nacional de Quilmes, vinculado al IMBICE.³

La ghrelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos esterificada con ácido n-octanoico y sintetizada principalmente por el estómago; entre sus acciones se destacan la estimulación de la secreción de la hormona de crecimiento y su potente efecto orexigénico. Los valores de ghrelina en plasma aumentan a diario antes de una ingesta de alimentos y también en situaciones como restricción calórica o ayuno prolongado. Luego de la ingesta, la concentración de ghrelina plasmática desciende rápidamente, sugiriendo que los mecanismos de control de la cantidad de hormona circulante son críticos para su función fisiológica. A pesar de que la ghrelina es un potencial blanco farmacológico para tratar diferentes trastornos de la alimentación, la biología de la biodisponibilidad de la ghrelina plasmática resulta aún desconocida. El objetivo de este trabajo fue identificar la/s proteína/s plasmática/s capaces de unir ghrelina a fin de avanzar en el conocimiento de este sistema. Para ello se utilizó un trazador fluorescente constituido por los primeros 18 aminoácidos de ghrelina con fluoresceína covalentemente unida al extremo C-terminal. El trazador se incubó con plasma de rata y posteriormente la mezcla se separó por cromatografía de exclusión molecular. La detección de fluorescencia emitida a 512 nm en las fracciones cromatográficas se empleó como criterio de selección de proteínas candidatas a unir ghrelina in vitro. Plasma sin trazador y plasma preincubado con fluoresceína se incluyeron como control. Nuestros resultados mostraron que el derivado fluorescente de ghrelina se unió a la fracción plasmática correspondiente a albúmina. Esta interacción se confirmó empleando albúmina sérica humana purificada. En ambos casos, la fluorescencia asociada a albúmina se correlacionó con concentraciones de ghrelina supra-fisiológicas (10 nM). En conclusión, estos resultados indican que la albúmina es capaz de unir la totalidad de ghrelina presente en plasma.

- 401. (695) EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA AGOMELATINA SOBRE EL PERFIL METABÓLICO EN RATAS**

HEMBRAS TRATADAS CON FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA.

Busch, Germán¹; Contreras Rolón, Nicolás¹; Torres Batán, Javier¹; González De Sampaio, Eduardo³; Scacchi Bernasconi, Pablo Antonio^{1,2}; Reynoso, Roxana María^{1,2}
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Facultad de Medicina, Universidad Católica Argentina.² Laboratorio, Hospital Británico de Buenos Aires.³

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por hipertensión, hiperglucemia, sobrepeso y alto riesgo de infarto cerebral y de miocardio. La melatonina (MT), hormona producida por la pineal, tiene propiedades cronobiológicas, inmunológicas, citoprotectoras y metabólicas, entre ellas, disminución de la tensión arterial (TA), disminución de triglicéridos (TG) y colesterol plasmáticos. La agomelatina (AGOM) es agonista de los receptores MT1, MT2 y 5-HT tipo 2c con efectos anti-depresivos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar cambios de TA y parámetros bioquímicos, producidos por la administración de fructosa a ratas hembras y si la MT y la AGOM son capaces de impedir dichos cambios. Ratas hembras adultas recibieron en el agua de bebida durante 60 días los siguientes tratamientos: FRUC, fructosa al 10% p/v; MT, 25 μ g/ml de melatonina; AGOM, 50 μ g/ml de agomelatina. Los grupos estudiados fueron (n= 8): CONTROL, MT, AGOM, FRUC, FRUC-MT, FRUC-AGOM. Se midió la TA y se efectuó una curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (CTGip, 2g glucosa/kg). Se recolectó sangre troncal y se determinaron TG, colesterol total (COL) y c-HDL. La TA aumentó en FRUC (148 ± 2 mmHg, $p < 0,001$) vs. CONTROL (118 ± 1) y disminuyó en FRUC-MT (132 ± 2 , $p = 0,001$) y FRUC-AGOM (128 ± 3 , $p < 0,001$). La CTGip mostró una tendencia a disminuir las glucemias a los 30 minutos en FRUC (319 ± 26 mg/dL) y una disminución en AGOM (259 ± 26) vs CONTROL (365 ± 37). Los niveles de TG se incrementaron en FRUC (127 ± 24 mg/dL, $p = 0,037$ vs CONTROL 85 ± 13) y la MT los disminuyó (FRUC-MT, 66 ± 7 , $p = 0,004$). Tanto la FRUC (factor metab, $p < 0,001$), como MT y AGOM (factor protección $p = 0,05$) produjeron un aumento del COL de manera global. En comparación con el CONTROL (37 ± 1 mg/dL), FRUC (45 ± 2 , $p = 0,007$), MT (44 ± 1 , $p = 0,02$) y AGOM (43 ± 2 , $p = 0,05$) incrementaron el c-HDL. Los resultados sugieren que la FRUC 10% altera algunos parámetros bioquímicos y la TA en la rata hembra, efectos que podrían ser impedidos por MT y AGOM.

- 402. (715) LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL TEJIDO ADIPOSO PRESENTA UN PERFIL OSCILATORIO SOBRE EL CUAL LA MELATONINA EJERCE EFECTOS BENÉFICOS EN LA RATA CON SÍNDROME METABÓLICO.**

Ávila, Matías Nicolás; Kim, Angélica; Santiago, Celeste F; Scacchi Bernasconi, Pablo; Trígila, Anabella P; Cardinali, Daniel P; Pagano, Eleonora S
Universidad Católica Argentina

Trabajos previos de este laboratorio demuestran que la melatonina es capaz de contrarrestar algunos de los efectos provocados por una dieta alta en grasas, como la obesidad. Dada la epidemia mundial de Diabetes, Obesidad y Síndrome Metabólico (SM), el estudio de los posibles tratamientos preventivos y/o correctivos resulta de particular interés. El SM es un fenómeno de naturaleza multifactorial asociado al desajuste entre nuestro estilo de vida y los ciclos naturales de luz-oscuridad. La inhibición de la producción de melatonina en una sociedad privada de sueño atenta contra los procesos naturales de reparación oxidativa. En el modelo de SM en ratas Wistar inducido por fructosa, establecimos 4 grupos exp.: control(C), fructosa 10%(F), melatonina(M) y fructosa + melatonina(FM). Controlamos la progresión del SM por parámetros metabólicos y evaluamos el perfil circadiano del estado oxidativo lipídico de los panículos adiposos blanco abdominal WAT y pardo interescapular BAT por el método de TBARS. La presión arterial, el peso corporal, el colesterol LDL y los triglicéridos, incrementados en el SM, mostraron valores cercanos al control por el tratamiento con melatonina. Dado que anteriormente demostramos que la peroxidación lipídica del tejido adiposo es mayor en animales con SM, y que la melatonina previene este incremento, en este

trabajo estudiamos el sistema a diferentes tiempos (n=6). Mientras que durante el día el nivel de daño oxidativo (nmolTBARS/mg prot) de la F es más evidente y siempre mayor que el C (t=8hs en BAT: C 0,99±0,2, F 1,78±1,74, M 1,15±0,40, FM 0,78±0,42), durante la noche se observa una disminución con respecto al C (t=20hs en BAT: C 9,86±7,44, F 7,13±1,84, M 5,75±3,22, FM 10,35±1,49), la M presenta siempre niveles comparables o menores que el C. Los valores de TBARS tienden a ser más altos durante la tarde y la noche, revelando un perfil de tipo oscilatorio, o circadiano para la peroxidación lipídica.

403. (730) DEFICIENCIA CRÓNICA DE ANDRÓGENOS Y EFECTO SOBRE EL PULMÓN

Biaggio, Verónica; Piguille, Silvana; Escobar Correas, Sophie Melanie; Ciminari, María Eugenia; Álvarez, Silvina; Gómez, Nidia; Pérez Chaca, María Verónica
Universidad Nacional de San Luis

Los andrógenos juegan un importante rol en la función pulmonar. Sumado a ello hemos encontrado que la castración afecta marcadamente la histoarquitectura pulmonar a tiempos cortos e incrementa el estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la castración sobre el balance prooxidante-antioxidante y sus manifestaciones en la estructura del pulmón en un proceso crónico. Ratas macho de la cepa Wistar (200 ± 20 g) fueron separadas en tres lotes: controles (Co), castradas (Ca) y el grupo de ratas castradas a las que se les administró Testosterona (Ca+T) los cinco días previos al sacrificio. A los 60 días se procedió a la extracción de los pulmones, se obtuvo ARN total y se realizó RT-PCR para el RA, NrF-2, y NOX2; empleando como control interno S28. Se obtuvieron lavados broncoalveolares (LBA) y se realizó el recuento de células. Se determinó el grado de lipoperoxidación por cuantificación de TBARS y se midió la actividad de Catalasa (CAT). Se analizaron también cortes histológicos de pulmón a los cuales se los tiñó con Hematoxilina-Eosina. En Ca se observó un aumento de linfocitos y neutrófilos en el LBA, mientras que en Ca+T los polimorfonucleares disminuyeron con respecto a Co. Los niveles de TBARS bajaron en el grupo Ca+T (p<0,001), mientras que la actividad de CAT no se modificó. RA aumentó significativamente en Ca (p<0,005) y nrF-2 aumentó significativamente en Ca+T (p<0,05) y NOX2 disminuyó significativamente en Ca (p<0,01). La histología reveló infiltración de polimorfonucleares en el parénquima pulmonar y espacios alveolares expandidos, en Ca, mientras que en Ca+T la infiltración fue menor. Nuestros resultados demuestran que la ausencia crónica de andrógenos altera el balance oxidantes-antioxidantes, situación que se ve reflejada también a nivel de la histoarquitectura pulmonar como un proceso inflamatorio crónico. El suministro de testosterona mejora en algunos aspectos el panorama fisiológico del órgano.

404. (769) EXPRESIÓN Y METILACIÓN DE INTERLEUQUINA 1 BETA (IL-1 β) Y RECEPTORES DE TIPO TOLL 4 (TLR4): INFLUENCIA DE LA COMPENSACIÓN METABÓLICA EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 (DM2) DESCOMPENSADA

Iglesias Molli, Andrea Elena¹; Büttner, Karina Andrea¹; Bergonzi, Fernanda¹; Spalvieri, Mónica¹; Linari, María Amelia²; Cerrone, Gloria Edith¹; Frechtel, Gustavo Daniel¹
Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Sección de Endocrinología y Nutrición, UOM Vicente López²

Introducción: La DM2 presenta un estado de inflamación subclínica, relacionada con un aumento de la expresión de IL-1 β y TLR4 en monocitos. Situaciones ambientales como la hiperglucemia, incrementan dicha expresión. En enfermedades metabólicas, los mecanismos epigenéticos responden a cambios en el ambiente. Objetivos: Analizar la influencia de la hiperglucemia sobre la expresión y metilación de IL-1 β y TLR4 en pacientes con DM2. Metodología: Población: 20 pacientes con DM2 con descontrol metabólico (HbA1c>8%); y los mismos compensados metabólicamente (HbA1c<7%) luego de 6 meses de tratamiento.

Expresión de IL-1 β y TLR4: Aislamiento de mononucleares de sangre periférica por centrifugación en Ficoll; extracción del ARN con TRIzol; retrotranscripción a cDNA; y amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó el método del Ct comparativo, usando como control al gen de GAPDH. Metilación de IL-1 β y TLR4: Extracción del ADN de sangre periférica; tratamiento con bisulfito; amplificación por PCR; y secuenciación. Los resultados se analizaron estadísticamente con un nivel de significación de 0,05, en SPSS 17.0 y GraphPad Prism 5, por Test t de una muestra y correlación de Pearson y Spearman. Resultados: Se verificó una disminución en la expresión génica, estadísticamente significativa para TLR4 (p=0,008); y tendencia para IL-1 β (p=0,057). Se halló una correlación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de TLR4 y la HbA1c (p=0,010), y tendencia con la glucemia (p=0,083); y entre la expresión de IL-1 β y la glucemia (p=0,043). Hasta el momento no se evidenciaron patrones de metilación que se correlacionen con las diferencias observadas en la expresión de estos genes. Conclusiones: Se evidenció una disminución estadísticamente significativa en la expresión de TLR4 y una tendencia en la expresión de IL-1 β , en pacientes con DM2 descompensada luego del tratamiento. Se halló una correlación positiva entre la expresión de dichos genes y los niveles de glucemia y HbA1c.

405. (795) ASPECTOS MORFOHISTOLÓGICOS DEL HÍGADO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY TRATADAS POR DIEZ MESES CON UNA DIETA SEMISINTÉTICA ISOCALÓRICA CON CHÍA (SALVIA HISPÁNICA)

Rocha De Freitas, Maykon; Montes Chañi, Evelyn; Aquino, Marlen; Martínez, Gustavo; Simón, Eduardo; Olivera Da Silva Pacheco, Sandaly; Pacheco, Fabio Juliano
Universidad Adventista del Plata

Introducción: El hígado es el mayor órgano interno cuyas funciones incluyen el metabolismo lipídico, sea la producción de lípidos o sustancias grasas como colesterol, triglicéridos y lipoproteínas. La semilla de chíá es una fuente del ácido α -linolénico, precursor del ω -3. Estudios han reportado que el ω -3 en la dieta ayuda a prevenir estados hepáticos como la esteatosis hepática. Objetivo: Evaluar la morfohistología hepática de ratas S. Dawleys tratadas por diez meses con una dieta con chíá. Materiales y métodos: Se dividieron 16 ratas macho en dos grupos que recibieron una dieta isocalórica semisintética, siendo una incrementada con chíá y la otra con aceite de soja según las recomendaciones del AIN-93 M. Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética para la realización del estudio. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 22 ± 2°C y humedad 50-70%, con ciclos de luz-oscuridad (12h) y con acceso *ad libitum* (comida y agua). Luego de anestesiadas y pesadas, se realizó la incisión abdominal para la extracción del hígado que fue pesado y fijado en solución fijadora para posterior análisis histológico. Resultados: El promedio de peso de las ratas al fin de los 301 días de tratamiento fue de 779,5g. Los animales alimentados con chíá presentaron un menor peso del hígado cuando comparados con el otro grupo, con una tendencia estadísticamente significativa donde el valor de p fue igual a 0,05. En el análisis histológico se observaron estructuras conservadas de los lobulillos hepáticos con distribución característica de los vasos en el espacio portal y en la vena centrolobulillar. En el grupo tratado con aceite de soja se encontró en la región perilobulillar, hepatocitos marcados por inclusiones citoplasmáticas en espuma típicas de acumulaciones lipídicas y sugestivos de un proceso de esteatosis. Conclusión: La administración de chíá luego de diez meses impidió la formación de acumulaciones en el citoplasma de los hepatocitos.

406. (820) EVALUACIÓN DEL CONSUMO Y CRECIMIENTO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY TRATADAS CON DIETAS PELETIZADAS, SEMISINTÉTICAS E ISOCALÓRICAS ELABORADAS CON SEMILLA DE CHÍA (SALVIA HISPÁNICA) Y ACEITE DE SOJA

Montes, Evelyn; Aquino, Marlen; Martínez, Gustavo; Rocha, Maykon; Simón, Eduardo; Olivera Da Silva Pacheco, Sandaly; Pacheco, Fabio Juliano
Universidad Adventista del Plata

Introducción: Las tendencias actuales con respecto a la alimentación indican un marcado interés de los consumidores en ciertos alimentos que además de nutrir aportan beneficios al organismo. Una de las semillas con gran potencial nutricional es la chía (*S. hispanica*), con fuente de proteínas (19-23%), fibras (30-36%), lípidos (32-39%) y elevado contenido de ácidos grasos omega-3, calcio, fósforo y antioxidantes. **Objetivo:** Elaborar una dieta peletizada, semisintética, isocalórica con semillas de chía y aceite de soja y determinar el patrón de consumo y el crecimiento de ratas Sprague Dawley alimentadas por un periodo de 43 semanas. **Materiales y métodos:** Se formularon y elaboraron 2 dietas semisintéticas isocalóricas con diagrama de flujo a nivel piloto basado en el AIN-93 M, la fórmula original se modificó empleando chía y aceite de soja en lugar del aceite de maíz. Se utilizaron 18 ratas macho, luego de 15 días de aclimatación que fueron divididas al azar en 2 grupos, alimentadas durante 43 semanas. El primer grupo recibió una dieta con carbohidratos 70%, proteínas 15% y aceite de soja como fuente de grasa 15% (grupo control); el otro grupo recibió la misma dieta con chía y aceite de soja como fuente de grasa, administradas *ad libitum*. La ingesta y ganancia de peso de cada grupo se determinó a diario en todo el periodo experimental. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. **Resultados y conclusiones:** Se elaboró el alimento con buenas prácticas organolépticas para la formación de pellets con características de color y tamaño parecidas a los comerciales. El peso corporal promedio es de 585g para el grupo dietario con chía y 474g para el grupo control ($p < 0,0009$). El consumo promedio de alimento por el grupo control fue de $23 \pm g/día$ y del grupo chía $29 \pm g/día$, siendo la diferencia estadísticamente significativa $p = 0,007$, el consumo de agua tuvo un rango de variabilidad proporcional a la dieta.

407. (830) EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE LA GRASA DIETARIA POR SEMILLA DE CHIA EN LOS VALORES DE GLUCEMIA DE AYUNA Y PERFIL LIPÍDICO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY

Montes, Evelyn; Aquino, Marlen; Martínez, Gustavo; Rocha, Maykon; Simón, Eduardo; Oliveira Da Silva Pacheco, Sandaly; Pacheco, Fabio Juliano
Universidad Adventista del Plata

Introducción: La semilla de chía, *Salvia hispánica*, es una de las principales fuentes del ácido α -linolénico (ALA), un ácido graso poliinsaturado precursor de los ω -3, ácido docosahexaenoico (DHA) y del ácido eicosapentaenoico (EPA). Se consume en diversas preparaciones y el aceite como suplemento dietético. Además, la chía posee gran cantidad de fibra en la forma de carbohidratos complejos y minerales. **Objetivo:** Determinar el efecto de sustitución de la grasa dietaria por la semilla de chía (*S. hispanica*) en los valores de glucemia de ayuna y perfil lipídico de ratas Sprague Dawley. **Materiales y métodos:** Se incluyeron 16 ratas macho, mantenidos en temperatura de $22 \pm 2^\circ C$, humedad 50-70% y ciclos de luz-oscuridad (12h), con acceso *ad libitum* a la comida. Se obtuvo el consentimiento del Comité Institucional de Ética. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos recibiendo una dieta semisintética isocalórica elaborada según AIN-93, siendo una dieta cuya principal fuente de lípidos fue la chía y la otra el aceite de soja, preparadas semanalmente y mantenidas a $4^\circ C$ hasta el consumo. Los animales fueron anestesiados y muestras sanguíneas fueron extraídas y colocadas en tubos con EDTA 3K, para determinar valores de glucemia, triglicéridos, colesterol total y HDL enzimáticamente. Se utilizó el test "t" de Student con un nivel de confianza de 95% para los análisis estadísticos. **Resultados y conclusión:** Después de 301 días, los niveles de triglicéridos y HDL estaban más bajos en el grupo alimentado con chía con respecto al grupo control, $p < 0,0003$ y $p < 0,0048$ respectivamente. No se encontró diferencias estadísticamente significativas en los valores de colesterol total y glucemia de los animales alimentados con ambas dietas. Este estudio aporta nuevas informaciones considerando el largo periodo experimental en que los animales fueron alimentados con una dieta conteniendo semillas de chía.

INFECTOLOGÍA, INFLAMACIÓN E INMUNOLOGÍA 1

408. (40) ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA VACUNA CANDID#1

Saavedra, María Del Carmen; Riera, Laura Marisa; Botalle, Alejandro Javier; Mariani, Mauricio Andrés; Ambrosio, Ana María

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr Julio I. Maiztegui"

Candid#1 es la primera vacuna a virus vivo atenuado producida y registrada en Argentina. Se utiliza para prevenir la Fiebre Hemorrágica Argentina y se produce en el INEVH desde el año 2003. Se obtiene por cosecha de sobrenadantes de cultivos de células diploides infectadas con virus Junin y posterior liofilización. La estabilidad de esta vacuna es un factor crucial para asegurar su efectividad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad de Candid#1, mediante la prueba de potencia, sometida a diferentes temperaturas en periodos variables de tiempo. Se estudiaron tres lotes de Candid#1 producidos en el año 2003 con el siguiente esquema:

Condición de la vacuna	Temperatura de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Frecuencia de la muestra
Reconstituida	(2 a 8) $^\circ C$	8 días	1 vial por día
Liofilizada	(2 a 8) $^\circ C$	6 meses	1 vial por mes
Liofilizada	(-18 a -20) $^\circ C$	5 años	1 vial cada 6 meses/1 año
Liofilizada	(-28 a -30) $^\circ C$	5 años	1 vial cada 6 meses/1 año

La prueba de potencia fue realizada en monocapas de células Vero bajo agar y el título fue expresado en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). Los resultados obtenidos fueron: a) Candid#1 liofilizada fue estable 2 meses entre (2 y 8) $^\circ C$ y 5 años entre (-18 y -20) $^\circ C$ y (-28 y -30) $^\circ C$ b) Candid#1 reconstituida fue estable 8 días entre (2 y 8) $^\circ C$. Estos resultados permitieron establecer, con la autorización de ANMAT, las siguientes condiciones de almacenamiento para Candid#1: a) Liofilizada: 5 años entre (-18 y -20) $^\circ C$; 30 días entre (2 y 8) $^\circ C$. b) Reconstituida: 12 horas entre (2 y 8) $^\circ C$. En base a estos resultados, se generaron cambios favorables en las condiciones de transporte, almacenamiento y distribución de la vacuna a su población blanco. Se implementó la instalación de freezers domésticos en centros estratégicamente distribuidos, permitiendo preservar stocks de vacuna y así poder distribuir las dosis necesarias a vacunatorios. Los estudios de estabilidad entre (-18 y -20) $^\circ C$ aún continúan, con la finalidad de definir una fecha de vencimiento mayor a 5 años.

409. (60) EL MICROAMBIENTE TUMORAL MODULA LA MIGRACIÓN, PERO NO EL CRECIMIENTO DEL MELANOMA

Rodríguez, Yamila I; Castro, Melina G; Campos, Ludmila E; Álvarez, Sergio E

Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO)-CONICET, San Luis

El melanoma representa menos del 5% de los casos de cáncer de piel, sin embargo como consecuencia de su elevada capacidad metastásica y resistencia a terapias, es el responsable de más del 90% de las muertes asociadas a esta patología cutánea. En los últimos años se ha demostrado que el microambiente cumple una función importante en el desarrollo de diversos tumores. Para estudiar su participación en la progresión del melanoma, utilizamos como modelo ratones C57BL/6 *wild type* (wt) y knock-out para el receptor I de TNF (TNFR1 KO). Células de melanoma murino B16F1 fueron inyectadas vía subcutánea en ratones y el volumen tumoral determinado cada tres días. Si bien existe una tendencia de mayor crecimiento en ratones TNFR1 KO las diferencias no fueron significativas. Por otro lado, medios condicionados recolectados de cultivo de macrófagos peritoneales y medio tumoral obtenido de lesiones malignas extraídas quirúrgicamente de ratones fueron usados como quimioatrayentes en ensayos de migración en cámara modificada de Boyden. Interesantemente, los medios de

ratones TNFRI KO inducen mayor migración que los respectivos medios wt. Es destacable que la migración obtenida en presencia de medio tumoral fue significativamente mayor que la inducida por medio de macrófagos peritoneales, lo cual refuerza nuestra hipótesis de que el microambiente cumple un rol importante en el melanoma. Considerando el rol del factor NF-kB en cáncer e inflamación estudiamos su participación en el mecanismo. Tanto la migración como la proliferación celular disminuyeron en presencia del inhibidor Bay11-7082, sugiriendo que NF-kB es importante para la progresión de la enfermedad. En su conjunto nuestros resultados indican que, si bien el microambiente diferencial de ratones wt y TNFRI KO no modula el crecimiento tumoral, juega un rol fundamental en la migración de células de melanoma.

410. (103) EL ESTRÉS CRÓNICO ALTERA LA PROGRESIÓN TUMORAL DEL LINFOMA T MURINO EL-4 IN VIVO. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA INMUNE Y NEUROENDOCRINO.

Di Rosso, María Emilia¹; Pascuan, Cecilia Gabriela¹; Sterle, Helena²; Cremaschi, Graciela Alicia²; Genaro, Ana María¹ *Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET-UBA, 1º Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires* *Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-CONICET-UCA*²

Previamente observamos que el estrés crónico induce un aumento en el crecimiento del linfoma LBC en ratones BALB/c afectando la inmunidad mediada por células T. Dada la respuesta diferencial al estrés entre las cepas BALB/c y C57bl/6, en el presente trabajo estudiamos la influencia del estrés sobre la progresión tumoral del linfoma EL-4 y los mecanismos neuroendócrinos implicados en ratones C57bl/6. Para ello, ratones singéneos fueron sometidos (E) o no (C) a un modelo heterotrópico de estrés durante 5 semanas. En estos animales se midió la proliferación de linfocitos T estimulados mitogénicamente por incorporación de [3H]-timidina. Los animales E mostraron una disminución en la respuesta proliferativa respecto de los C (índice de estimulación (I.E) C: 8,5±1,16; E:4,1±0,2; p<0,05). Además se analizó la actividad de células NK mediante la lisis de células YAC-1 marcadas con [3H]-timidina. Los animales E mostraron una menor actividad citotóxica respecto de los C (% lisis C: 30,2±0,58; E:18,4±1,37; p<0,05). Además, el estrés crónico indujo un aumento en los niveles de corticosterona (p<0,05) sin observarse diferencias entre C y E en los niveles de catecolaminas. Animales C y E fueron inyectados s.c. con células EL-4 para generar un tumor sólido. Los animales E mostraron una mayor velocidad de crecimiento tumoral evidenciada a partir de los 12 días p.i. (vol. tumoral (cm³) C: 0,3±0,1; E: 1,1±0,3; p<0,05). Análisis por qRT-PCR a partir de ARNm de tumores sólidos indicaron un incremento en la expresión génica de las ciclinas B1 y D1 y del marcador de proliferación PCNA en los ratones E (p<0,05). La expresión génica de las metaloproteasas (MMPs) 2 y 9 también aumentó en tumores de animales E, junto con una disminución en la expresión de sus inhibidores. Nuestros resultados indican que el estrés crónico altera el desarrollo tumoral modulando al sistema inmune y neuroendócrino y alterando la regulación del ciclo celular y capacidad invasiva de las células tumorales.

411. (105) LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN BRAFV600E MODULA LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA EN HIPOXIA.

Castro, Melina G; Campos, Ludmila E; Rodríguez, Yamila I; Álvarez, Sergio E *Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO)-CONICET, San Luis*

Aproximadamente la mitad de los pacientes con melanoma, el cáncer de piel de mayor mortalidad, presentan la mutación BRAF^{V600E}, lo cual promueve la proliferación tumoral. Recientes ensayos clínicos con inhibidores de BRAF muestran resultados alentadores, pero la respuesta es de escasa duración por cuanto los tumores se vuelven resistentes. Se ha sugerido que el microambiente hipóxico es un factor clave en la agresividad del

tumor, modulando cambios intracelulares que resultan en inestabilidad genética, proliferación, metástasis y posiblemente resistencia a quimioterapia. En el presente trabajo nos propusimos evaluar el rol de hipoxia sobre la proliferación y migración de células de melanoma SkMel2 (BRAF^{WT}) y Lu1205 (BRAF^{V600E}). Interesantemente, hipoxia acelera la proliferación de células Lu1205, pero inhibe el crecimiento de células SkMel2. Mediante el ensayo de "wound healing" observamos que hipoxia favorece la migración, pero el efecto solo es significativo en células SkMel2. Por otro lado, esfingosina-1-fosfato (S1P), un lípido que está relacionado a procesos inflamatorios y tumorales incrementa la migración en células de melanoma Lu1205. A nivel mecanístico, células SkMel2 cultivadas en hipoxia presentan mayores niveles de fosforilación de ERK. La inhibición de ERK con UO126 reduce la proliferación de células de melanoma. En resumen, nuestros resultados demuestran que la activación de ERK, migración y proliferación en condiciones hipóxicas difieren de acuerdo a la presencia de la mutación BRAF^{V600E}. Si bien esta claro que un ambiente hipóxico regula la progresión tumoral, nuevos estudios son necesarios para definir su rol definitivo en potencial resistencia a quimioterapia.

412. (115) ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PRESENTES EN LA VACUNA ANTI-MELANOMA CD-APO/NEC PARA ESTIMULAR LINFOCITOS T CD8+

Byrne, Alana¹; Mac Keon, Soledad²; Wainstok, Rosa¹ *Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET* *Fundación Instituto Leloir (IIBBA)-CONICET*²

En el laboratorio se ha desarrollado la vacuna CD-Apo/Nec contra el melanoma murino B16-F1. Consiste en células dendríticas (CDs) cargadas con células apoptóticas y necróticas de melanoma, y otorga protección antitumoral al 60-80% de los ratones vacunados. Experimentos previos han demostrado una migración del 0,8% de las células CD-Apo/Nec al ganglio drenante a 24 horas post-inyección. Con el fin de determinar si los antígenos provenientes de células B16-F1 son eficientemente presentados en el ganglio drenante de ratones vacunados, se realizó la vacunación utilizando como fuente de antígenos la línea B16-F1 establemente transfectada con el vector de expresión de ovoalbúmina (OVA). Mediante la transferencia adoptiva de linfocitos T CD8⁺ OVA-específicos marcados fue posible determinar la proliferación en el ganglio drenante del 48±24%. Se combinó la vacuna CD-Apo/Nec con la aplicación tópica de Imiquimod, un agonista del receptor de tipo toll 7, observándose un aumento del 22% en la protección antitumoral *in vivo*. Para evaluar el efecto del Imiquimod sobre la capacidad inmunoestimuladora de las CDs se realizaron ensayos *in vitro* de reacción linfocitaria mixta, enfrentando linfocitos T CD8⁺ alogéneos a CDs estimuladas con pulsos cortos de 3µg/ml, 6µg/ml y 10µg/ml de Imiquimod. Con las tres concentraciones de Imiquimod la proliferación de T CD8⁺ fue significativamente mayor al control de CDs no estimuladas (P < 0,05). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con Imiquimod y CDs estimuladas con LPS. Estos resultados demostrarían que los antígenos provenientes de células B16-F1 son eficientemente presentadas a linfocitos T CD8⁺ en los ganglios drenantes. El Imiquimod sería capaz de aumentar significativamente la capacidad de las CDs utilizadas para la generación de la vacuna CD-Apo/Nec y estimular la proliferación de linfocitos T CD8⁺.

413. (124) PRESENCIA DE AUTO-ANTICUERPOS INDUCIDOS POR T. CRUZI EN PACIENTES CON MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA Y SU RELACIÓN CON EL PERFIL CLÍNICO.

Vicco, Miguel Hernán¹; Bontempi, Iván¹; Rodeles, Luz¹; Marcipar, Iván¹; Bottasso, Oscar² *Laboratorio de Tecnología Inmunológica* *Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario*²

Objetivo: Diversos estudios sugieren que los patrones clínicos de la enfermedad de Chagas podrían estar relacionados a

la respuesta inmune inducida por el protozoo. En este contexto, evaluamos si la presencia de auto-anticuerpos anti-p2B y anti-B13 se relacionan con el perfil clínico o bioquímico de pacientes con Miocardiopatía Chagásica Crónica (MCC). Por otra parte, a pesar de que existen diversos *scores* para realizar diagnóstico clínico de insuficiencia cardíaca, y ésta es la principal causa de mortalidad en MCC, ninguno de ellos ha sido evaluado. Material y Métodos: Llevamos a cabo un trabajo transversal en pacientes con serología positiva para *T. cruzi*. Se hizo valoración clínica-cardiológica a todos los pacientes. Las personas incluidas fueron categorizadas acorde a la clasificación de Storino et al. y se aplicó también el *score* clínico de Boston de insuficiencia cardíaca. Se valoraron los anticuerpos anti-p2 β y anti-B13. Resultados: El área debajo de la curva del *score* de Boston para la predicción de insuficiencia cardíaca sistólica fue de 85,7% para un punto de corte de 7 ($p=0,026$), sensibilidad de 67,19% y especificidad de 78,42%. Por su parte, los pacientes con fracción de eyección presentaron mayor nivel de anti-B13 ($p<0,001$). La correlación entre anti-B13 y el *score* de Boston mostró una asociación importante (coeficiente de correlación de rango de Spearman = 0,76; $p<0,001$). Finalmente, anti-p2 β se correlacionó inversamente con la concentración de triglicéridos y el índice aterogénico. Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que el *score* de Boston es aplicable en pacientes con MCC, y que los anticuerpos anti-p2 β y anti-B13 se correlacionan con el perfil clínico y bioquímico. Dada la relación entre el *score* de Boston y anti-B13, la determinación de este último podría ser de utilidad para el diagnóstico de pacientes con insuficiencia cardíaca sistólica.

414. (158) EFECTOS DEL ESTRÉS SONORO SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE MUCOSA INTESTINAL DE RATÓN

Sánchez, Laura Antonella; Roux, María Estela; Miranda, Silvia
Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Dr. A. Taquini" CONICET-UBA

En trabajos previos reportamos que un estímulo de 24hs de estrés sonoro induce en ratones ruptura y alteraciones morfológicas de vellosidades intestinales con leucocitosis, hiperplasia e incremento de células calcificiformes, efectos que se agravan espontáneamente o por estímulos a repetición. El objetivo del presente trabajo es investigar el mecanismo inmunopatológico involucrado. Para ello se emplearon ratones hembras CBA/J de 3 meses de edad, se dividieron en grupos control y estrés (300Hz, 24hs) y luego en subgrupos: I-sacrificados post-estrés, II- sacrificados 3 semanas después y III- sometidos a estrés 1 día/semana durante 1 mes ($n=7$). Se aislaron los intestinos delgados y se estudió la expresión de: 1-TNF α , VCAM y Ki67 mediante inmunohistoquímica (IHQ); 2- IL-17 y CCL25 (TECK) por inmunofluorescencia y microscopía confocal; 3- factor de transcripción ROR γ t por IHQ y western-blot (WB) y 4- recombinasas Rag1 y Rag2 mediante dot-blot semicuantitativo y WB. Los resultados obtenidos indicaron que a las 24hs post-estrés (I) se induce expresión de ROR γ t a nivel de criptas y un incremento preferencial de la expresión de IL-17 por células epiteliales (CE), células de lámina propia y criptas, comparada con la de TNF α . Tres semanas más tarde (II) y frente a estrés crónico (III), la relación IL-17/TNF α se invierte y se incrementa la expresión de ROR γ t y de Ki67 especialmente en zonas localizadas de la capa de CE. La expresión de Rag1 y Rag2 fue similar y alta en los tres protocolos analizados en contraste a su ausencia en las muestras control. La expresión de CCL25 por CE y de VCAM por endotelio se incrementó notablemente en los lotes sometidos a estrés. Los datos experimentales indican que el estrés sonoro induce una respuesta inflamatoria en mucosa intestinal con daño tisular que se perpetúa con diferenciación linfocitaria *in situ*. Sugerimos que el modelo de estrés sonoro podría representar un modelo de estudio para enfermedades inflamatorias intestinales crónicas.

415. (183) PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE HEPATITIS C: DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES PEDIÁTRICOS Y ADULTOS

Ríos, Daniela Alejandra¹; De Matteo, Elena¹; Caldrola, María Soledad²; Hail, Fernanda²; Gaillard, Isabel²; Bezrod-

nik, Liliana²; Mullen, Eduardo³; Lezama, Carol⁴; Casciato, Paola⁵; Galdame, Omar⁵; Gadano, Adrián⁵; Valva, Pamela¹; Preciado, María Victoria¹

Laboratorio de Biología Molecular, División Patología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"¹ Servicio de Inmunología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"² Anatomía Patológica, Hospital Italiano de Buenos Aires³ Servicio de Hepatología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"⁴ Servicio de Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires⁵

En la infección crónica por el virus de hepatitis C (HCV) el daño hepático involucra al virus y a la respuesta inmune. Dadas las diferencias en la severidad y progresión del daño en niños y adultos, el objetivo fue evaluar la infección viral, la apoptosis y el infiltrado portal/periportal como mecanismo de patogenia y comparar la frecuencia de ciertas poblaciones linfocitarias en hígado y sangre periférica (SP). En biopsia hepática de 27 niños y 32 adultos con infección crónica por HCV se cuantificaron por inmunohistoquímica: hepatocitos infectados (NS3⁺), en apoptosis temprana [caspasa-3 activa (casp3a⁺) y tardía (TUNEL⁺) y se caracterizó el infiltrado [linfocitos (L) totales, LTCD4⁺, LTCD8⁺, LTFoxp3⁺ y LBCD20⁺]. En SP se midió por citometría de flujo la frecuencia de LTCD4⁺, LTCD8⁺, LTFoxp3⁺ y LBCD20⁺. En niños el número de hepatocitos NS3⁺ fue mayor que en adultos ($p=0,008$) y correlacionó con los apoptóticos (casp3a⁺ $r=0,74$; $p<0,0001$. TUNEL⁺ $r=0,606$; $p=0,002$). Los hepatocitos NS3⁺ ($p=0,026$) y apoptóticos ($p=0,03$) se asociaron a fibrosis severa. En adultos, los hepatocitos casp3a⁺ estuvieron elevados en hepatitis severa ($p=0,01$). En ambos grupos de pacientes los LTCD4⁺, LTCD8⁺, LTFoxp3⁺ y LBCD20⁺ estuvieron elevados en hígado, mientras que en SP su frecuencia fue similar a la de la población sana. La frecuencia hepática de dichas células fue mayor en adultos ($p<0,05$). En niños, los LTCD8⁺ correlacionaron con los hepatocitos NS3⁺ ($r=0,495$; $p=0,04$) y los TUNEL⁺ ($r=0,474$; $p=0,04$). En adultos los LTCD8⁺ correlacionaron con las células casp3a⁺ ($r=0,387$; $p=0,04$), la actividad inflamatoria ($r=0,639$; $p=0,0003$) y se asociaron a la hepatitis severa ($p<0,0001$). El virus, la apoptosis y la respuesta inmune están involucrados en la patogenia en ambos grupos. Sin embargo, en niños el daño hepático estaría principalmente asociado a la actividad citopática viral mediada por apoptosis, mientras que en adultos se encontraría mayormente asociado a una respuesta inmune hepática exacerbada.

416. (223) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARN NO CODIFICANTE DE ORIGEN TELOMÉRICO EN RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

Galigiana, Natalia M.¹; Susperreguy, Sebastián¹; Cabanillas, Ana María²; Piwien-Pilipuk, Graciela¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)- CONICET¹ Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET, Depto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba²

Los genomas de células eucariotas poseen un gran número de secuencias intragénicas e intergénicas que no codifican para proteínas. Una fuente abundante de dichos ARN no codificantes son los elementos repetitivos presentes en el ADN satelital y el telomérico. Se ha reportado que la inflamación crónica *in vivo* induce disfunción telomérica por sobreproducción de especies reactivas del oxígeno vía COX-2, lo cual es revertido por tratamiento anti-inflamatorio o antioxidante. A partir de estas evidencias, hipotetizamos que el estrés oxidativo es capaz de modular los niveles de los ARN no codificantes que se transcriben a partir del ADN telomérico, conocidos como TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*). Para abordar el estudio, realizamos curvas de tiempo incubando a las células renales embrionarias humanas HEK-293T en presencia de H₂O₂ o de arsenito de sodio, y evaluamos la expresión de TERRAs mediante PCR empleando primers específicos y revelando los productos de amplificación en gel de agarosa. Observamos que el H₂O₂ induce los niveles de TERRA a partir de las 2h de tratamiento. Obtuvimos un perfil diferente al utilizar arsenito de sodio, donde la inducción se observó a los

30 min de tratamiento. Realizamos curvas dosis-respuesta para evaluar si dichas diferencias podrían deberse a la capacidad diferencial de inducir estrés oxidativo de cada compuesto bajo las condiciones empleadas. Preliminarmente, encontramos que los niveles de TERRA disminuyen al tratar a las HEK-293T durante 2h con concentraciones crecientes de H₂O₂. Concluimos entonces que las células aumentan la expresión de TERRAs en respuesta al estrés oxidativo, posiblemente como mecanismo de protección de la integridad de los telómeros, y proponemos que la relación inversa entre su nivel de expresión y la concentración del agente oxidante reflejaría una menor capacidad de las células para responder a dicho estrés, en cuya condición tal vez prevalezca la activación de vías de señalización pro-apoptóticas.

417. (248) LAS PLAQUETAS POTENCIAN LA FORMACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE ADN (NETS)

Carestia, Agustina¹; Rivadeneyra, Leonardo¹; D'Atri, Lina Paola¹; Kaufman, Tomás¹; Fondevila, Carlos²; Negrotto, Soledad¹; Schattner, Mirta¹

Laboratorio de Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Clínica Bazterrica²

Los Neutrófilos (N) liberan NETs las cuales además de eliminar patógenos son proinflamatorias y protrombóticas. Las plaquetas (PI), particularmente en sepsis, serían clave en la formación de NETs (NETosis). En este trabajo profundizamos el rol de la PI en la NETosis inducida por componentes de bacterias Gram-Negativas (lipopolisacárido, LPS) o positivas (lipopéptido Pam(3)CSK(4), Pam). Estudios de microscopía y la cuantificación de ADN libre (fluorimetría) mostraron que las PI, pero no sus sobrenadantes, potencian la formación de NETs mediada por LPS (2,5µg/ml) o Pam (1ng/ml), (pH7,4;37°C, N+LPS:0,4±0,1; N+PI+LPS:0,8±0,1*; N+Pam:0,3±0,1; N+PI+Pam:0,6±0,1*; µg/ml de ADN, X±ESM, ANOVA, n=8, *p<0,05 vs N+LPS/N+Pam). Los niveles de ADN fueron mayores en hipermia en PI estimuladas con LPS (40°C: 1,5±0,1*; 42°C: 1,6±0,3*) o Pam (40°C: 0,7±0,1; 42°C: 1,2±0,2*, n=3, *p<0,05 vs 37°C) y disminuyeron en acidosis (LPS: pH 7: 0,5±0,1*; pH 6,5: 0,3±0,03*; Pam: pH 7: 0,7±0,1; pH 6,5: 0,3±0,03*, n=3, *p<0,05 vs pH 7,4). En condiciones extremas (42°C, pH 6,5) no se observaron diferencias respecto al control. Estos efectos no fueron asociados a cambios en la expresión de proteínas involucradas en la NETosis (CD18 en N y CD102 en PI) ni a la unión del LPS a las PI. La generación de NETs en presencia de un anticuerpo anti-P-selectina fue similar al control. La preincubación de las PI con PGI₂ (3nM), nitroprusiato de sodio (SNP, 10µM) o aspirina (1mM) resultó en una marcada inhibición de la NETosis (PGI₂: 76±24* y 65±4*, SNP: 95±5* y 82±12* y aspirina: 87±13* y 35±10* de inhibición para LPS y Pam, respectivamente, n=3, *p<0,05 vs N+PI+LPS/N+PI+Pam). En conclusión, la NETosis gatillada por LPS o Pam es mayor en presencia de plaquetas, requiere del contacto celular y es P-selectina independiente. La hipermia y la acidosis regulan la generación de NETs de forma opuesta y en ambas condiciones los efectos son compensados. La inhibición de la activación plaquetaria podría ser un blanco para evitar la NETosis exacerbada.

418. (298) SITUACIÓN DE BIOSEGURIDAD EN TRABAJADORES DE LA SALUD EN LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

Stanganelli, Carmen Graciela^{1,2,4}; Fink, Susana^{1,3,4}
Academia Nacional de Medicina (ANM)¹ Instituto de Investigaciones Hematológicas (IHEMA)-ANM² Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM³ Comité de Bioseguridad-ANM⁴

Se inició una encuesta sobre Bioseguridad a dos grupos de trabajadores de la Salud (TS) de la ciudad de Buenos Aires (CABA), uno de TS de Hospitales Públicos y otro de médicos residentes de nuestra Institución. Hasta ahora, se encuestaron 45 personas: 88,4% médicos, 4,7% fonoaudiólogos, 2,3% psiquiatras, 4,7% técnicos de laboratorio. El número de preguntas no respondidas (NR) se indica entre paréntesis. Por ley en Argentina se debe ofrecer la vacuna contra Hepatitis B (HBV) a los TS, el 93,3% fue vacunado

(3 NR) para HBV. El 4,9% recibió 1 dosis, 12,2% 2 dosis, 80,5% 3 dosis y 2,4% 7 dosis (4 NR). Sólo 61% efectuó control post-vacunación (4 NR). En los hospitales públicos de la CABA se da la vacuna contra Hepatitis A a los TS: 31,1% de los TS (31 NR) fueron vacunados. Otras vacunas fueron: Difteria +Tétanos (DT) 6,7%, tétanos: 82,2%, influenza: 82,2%, rubeola+fiebre amarilla: 6,7%, fiebre amarilla+DT 7,2%. Recibieron entrenamiento en Bioseguridad 57,8% y en otros riesgos 48,9%. El 84,4% (2 NR) de los encuestados tiene procedimientos de registro de accidentes, el 46,7% sufrió accidentes, siendo 33,3% con exposición biológica, el 73,3% reportó accidentes de otros en el entorno laboral siendo 61,4% con material biológico. Elementos de protección personal (EPP): 84,4% (1 NR) usa el guardapolvo abotonado, 29,5% (1 NR) usa ropa de trabajo desde la casa (inclusive en transporte público), 34,1% (1 NR) lleva el guardapolvo colgado del brazo, 46,7% (1 NR) usa el guardapolvo en cafeterías, 24,4% (4 NR) usa el mismo guardapolvo en hospital y práctica privada, 60% (2 NR) usa EPP y 68,9% (3 NR) desinfecta regularmente el lugar de trabajo. El 84,4% (7 NR) usa guantes cuando sus manos toman contacto con fluidos biológicos. No se observó asociación estadística entre accidentes y sexo o edad. Aunque la muestra es pequeña, los resultados muestran que puede haber mejoras en varias áreas, muchas veces modificando comportamientos sin requerir inversiones.

419. (324) FORMACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE ADN (NETS) EN PACIENTES SÉPTICOS Y QUEMADOS

Datri, Lina P¹; Kaufman, Tomás¹; Carestia, Agustina¹; Etulain, Julia¹; Magosevich, Debora²; Fondevila, Carlos²; Pálizas, Fernando²; Guzmán, Alejandra³; Schattner, Mirta¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, ANM¹ Clínica Bazterrica² Instituto del Quemado³

El rol de las NETs en la respuesta inflamatoria aún presenta interrogantes. La desregulación de la formación de NETs puede generar trombos en la microcirculación y daño tisular. En este estudio piloto analizamos la formación de NETs (*in vitro*) y los niveles plasmáticos de nucleosomas (*in vivo*) en dos patologías con respuesta inflamatoria marcada: sepsis y quemados graves. En sepsis la falla multiorgánica es la principal causa de muerte. En quemados un severo síndrome de respuesta inflamatoria cede protagonismo a la infección. Se analizaron 5 pacientes sépticos al día 1 postadmisión (dpa), 3 pacientes fueron re-estudiados 7 dpa, de los cuales 2 evolucionaron favorablemente y 1 falleció. Los polimorfonucleares (PMN, 2x10⁵), fueron incubados durante 3 horas a 37°C; el ADN se marcó con yoduro de propidio y la elastasa con un anticuerpo. La microscopía reveló que los PMNs de todos los sépticos formaban NETs de manera basal a diferencia del grupo control (dadores normales). El aumento basal de NETs se acompañó del aumento plasmático de nucleosomas (2,8±0,5 vs 0,2±0,01 µg/ml de ADN, ELISA). Interesantemente, 7 dpa no hubo formación basal de NETs en los 2 pacientes que evolucionaron favorablemente pero sí en el que falleció. Este hallazgo correlacionó con un descenso significativo de los nucleosomas. Se evaluaron 4 pacientes quemados graves a 1 dpa, de los cuales 3 se reanalizaron 7 dpa (1 falleció). Los 3 pacientes quemados mostraron formación basal de NETs tanto 1 como 7 dpa. Ninguno mostró aumento de nucleosomas en plasma 1 dpa y sólo 1 mostró aumento 7 dpa. En conclusión, los PMNs de sépticos y quemados graves mostraron desde 1 dpa formación espontánea de NETs. A diferencia de los quemados, que no mostraron nucleosomas en plasma, los sépticos mostraron niveles elevados de nucleosomas. La persistencia, 7 dpa, de NETs basales y nucleosomas correlacionó con mortalidad. Estas diferencias podrían explicar, en parte, diferencias en la evolución clínica y falla orgánica.

420. (326) EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN MACHOS Y HEMBRAS BALB/C. CONSECUENCIAS FRENTE AL ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO EN LA VIDA ADULTA

Pascuan, Cecilia Gabriela; Di Rosso, María Emilia; Genaro, Ana María

Centro de estudios farmacológicos y botánicos (CEFYO-CONICET-UBA), 1º Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El estrés prenatal (EP) se ha asociado con alteraciones inmunológicas en la vida adulta. En este trabajo investigamos si el EP es capaz de inducir alteraciones en la respuesta inmune y/o afecta esta respuesta frente al estrés agudo (EA) y crónico (EC) en la vida adulta. Para ello, hembras preñadas fueron sometidas o no, a estrés por inmovilización 2 horas al día, desde el día 14 de gestación hasta el parto. A los 2 meses de edad, ratones EP o controles fueron expuestos a EA o EC por inmovilización (2h por 1 ó 21 días, respectivamente). Observamos que tanto en hembras como en machos el EP no indujo cambios significativos ni en la respuesta proliferativa, ni en el título de anticuerpos (Ac) frente a un desafío antigénico. Sin embargo, el efecto del EA en la respuesta inmune fue diferente. El EA indujo un aumento de la respuesta proliferativa ($p < 0,01$) y del título de Ac ($p < 0,05$) en los animales no expuestos a EP, mientras que los ratones EP presentan una disminución en la respuesta proliferativa ($p < 0,05$) y en el título de Ac ($p < 0,05$). Los niveles basales de corticosterona y catecolaminas fueron similares entre animales EP y controles, tanto para machos como para hembras. Sin embargo frente al EA, el aumento de corticosterona fue menor en animales EP en comparación con los controles (% de aumento: 680 ± 77 y 1205 ± 138 , respectivamente) siendo similar el observado para catecolaminas. Por otra parte, el EC indujo una disminución en la respuesta proliferativa y el título de Ac que fue mayor para los animales EP. Estos efectos se asociaron a un aumento en los niveles de mRNA y proteicos de receptores para corticosterona (% de aumento: 40 y 30%; respectivamente) sin cambios en los receptores para catecolaminas. Estos resultados señalan que el EP induce una incrementada vulnerabilidad a los efectos del estrés agudo y crónico que se correlaciona con un aumento en la expresión de receptores para corticosterona tanto en hembras como en machos.

421. (383) ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE ESTEROIDES ADRENAL SOBRE LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA ANTI-TUBERCULOSA EN EL CONTEXTO DE LA CO-INFECCIÓN TUBERCULOSIS-HIV-1

Vecchione, María Belén¹; Angerami, Matías¹; Suárez, Guadalupe¹; Sued, Omar³; Pérez, Héctor³; Ben, Graciela³; Bruttomesso, Andrea²; Quiroga, Florencia¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS)-CONICET¹ Depto. de Química Orgánica y Unidad de Microanálisis y Métodos. Físicos aplicados a la Química Orgánica (UMYMFOR)- CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires² Hospital General de Agudos "Dr Juan A. Fernández"³

La coinfección del HIV y de tuberculosis (TB) acelera y agrava ambas infecciones. El eje hipotálamo-pituitario-adrenal, mediante la producción alterada de glucocorticoides y dehidroepiandrosterona (DHEA), complejiza el problema. Nuestros estudios previos señalan que DHEA modula la respuesta inmune específica contra *M. tuberculosis* (*Mtb*). Estudiamos el rol de DHEA y sus metabolitos Androstenediol (AED), Androstenetriol (AET) y 7-oxo-DHEA sobre la respuesta *Mtb*-específica en el modelo de coinfección TB-HIV. Los compuestos fueron sintetizados a partir de DHEA. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con *Mtb* (H37Rv) en individuos HIV-1+ con TB activa (HIV-TB) y dadores sanos (DS) ($n=7$) en presencia/ausencia de las hormonas ($1.10^{-9}M$ - $1.10^{-6}M$). Se midieron la proliferación celular (1) y la producción de las citoquinas IFN-g e IL-10 (2), mediante incorporación de timidina H³ y ELISA, respectivamente. En (1), DHEA ($1.10^{-9}M$) indujo un aumento significativo respecto de la respuesta Ag-específica solo en HIV-TB ($p < 0,05$). AED mostró tendencia al aumento en (1) a mayor concentración para HIV-TB y DS. No observamos efecto modulador de AET. 7-oxo-DHEA promovió el aumento significativo de (1) a $1.10^{-9}M$, $1.10^{-7}M$ y $1.10^{-6}M$, sólo en HIV-TB ($p < 0,05$), mostrando la mayor diferencia

a $1.10^{-6}M$ ($p < 0,05$ comparando con $1.10^{-9}M$ y $1.10^{-7}M$). Para (2) DHEA tiene tendencia a tener valores más altos en HIV-TB, para ambas citoquinas respecto a *Mtb* ($p < 0,05$ en IL-10 $1.10^{-9}M$). AED mostró una tendencia a aumentar IFN-g en ambos grupos a concentraciones altas ($p < 0,05$ $1.10^{-6}M$ vs *Mtb* en DS). AET reveló tendencia al aumento de IFN-g para HIV-TB. 7-oxo-DHEA indujo un aumento en la producción de IFN-g *Mtb*-específica para los HIV-TB ($p < 0,05$). Nuestros resultados sugieren que 7-oxo-DHEA, un metabolito de DHEA poco estudiado, poseería una capacidad inmunomoduladora superior a AED y/o AET, proporcionando nuevas herramientas para el manejo de la infección tuberculosa en personas con HIV.

422. (389) VARIANTES DE LA PROTEÍNA X DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B GENOTIPO F INDUCEN LA APOPTOSIS Y LA AUTOFAGIA DE HEPATOCITOS HUMANOS

Elizalde, Mercedes¹; Campos, Rodolfo¹; Barbini, Luciana^{1,2}
Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra Microbiología Clínica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata²

La proteína X del virus de la hepatitis B (HBV-X) se asocia a la patogénesis de la enfermedad hepática en la infección crónica. Las mutaciones BCP afectan a HBV-X en los aa 130-131. Se desconoce el rol de estas mutaciones en su actividad biológica en relación a la patogenia de la infección. Objetivo: Analizar el efecto de distintos aa en 130-131 de HBV-X en su capacidad de inducir la apoptosis y/o la autofagia en hepatocitos en cultivo. Métodos: Se utilizaron líneas de hepatoma humano con expresión transiente de HBV-X genotipo F *wild type* y mutado. La viabilidad celular se cuantificó por tinción con Azul Tripán. La apoptosis se detectó por *laddering* de DNA y tinción con naranja de acridina-bromuro de etidio (NA-BE). Se estudió la expresión de proteínas anti (Bcl-2, Bcl-X) y pro-apoptóticas (Bax) por *Western Blot*. La autofagia se analizó mediante la detección de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica y conversión de LC3 por *Western Blot*. Resultados: En comparación con las células control, la expresión de ambas HBV-X aumentó significativamente la mortalidad celular. Se detectó fragmentación del DNA y un aumento significativo en el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía en las células transfectadas, respecto al control. Además, se observó disminución en la expresión de Bax y Bcl-2 y aumento en los niveles de Bcl-X en las células transfectadas con ambas HBV-X. Ambas HBV-X también indujeron la formación de vacuolas autofágicas y disminuyeron los niveles de LC3-I, por formación de LC3-II de menor peso molecular, en las células transfectadas. Conclusión: La expresión de las distintas HBV-X de genotipo F induce la apoptosis y la autofagia de hepatocitos humanos en cultivo. Estos resultados aportan a la descripción de los mecanismos moleculares mediante los cuales distintas variantes de la proteína contribuyen a la patogenia en el hígado infectado.

423. (396) PREVALENCIA DEL GENOMA DEL HERPESVIRUS HUMANO TIPO 8 (HHV-8) EN DISTINTAS POBLACIONES LATINOAMERICANAS

Hulaniuk Wolaniuk, María Laura¹; Pontoriero, Ana¹; Fortuny, Lisandro²; Burgos Pratz, Leandro²; Frías, Analía³; Torres, Oscar³; Núñez, Félix²; Corach, Daniel⁴; Caputo, Mariela⁴; Trinks, Julieta¹
Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano¹ Servicio de Medicina Transfusional, Hospital Italiano de Buenos Aires² Servicio de Medicina Transfusional, Hospital Materno Infantil "Ramón Sardá"³ Servicio de Huellas Digitales Genéticas (SHDG), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴

El HHV-8 es el agente causal del sarcoma de Kaposi. Si bien su seroprevalencia ha sido ampliamente estudiada describiéndose una distribución geográfica y étnica característica; aún se desconoce la frecuencia del genoma viral en poblaciones latinoamericanas y su relación con la composición étnica. Para determinar la prevalencia del genoma del HHV-8 en Latinoamérica

ca, se obtuvieron 561 muestras de ADN de donantes de sangre no relacionados: argentinos (200), bolivianos (187), paraguayos (98) y peruanos (76). La composición étnica se determinó en 271 muestras mediante análisis de haplogrupos del ADNmt e Y-SNPS por PCR en Tiempo Real seguida de *melting* de alta resolución. La prevalencia del HHV-8 se estableció por amplificación parcial del ORF-26 por *Nested* PCR. El análisis estadístico se realizó por test de Fisher. Se determinó que 42% de los argentinos, 94,7% de los bolivianos, 94,2% de los peruanos y 98,2% de los paraguayos presentaron linaje materno nativo americano ($p < 0,0001$); mientras que 1% de los argentinos, 71,1% de los bolivianos, 38,5% de los peruanos y 17,9% de los paraguayos mostraron linaje paterno nativo americano ($p < 0,01$). La prevalencia del HHV-8 fue mayor en los paraguayos (7,1%) y peruanos (6,6%) en comparación con los argentinos (3,5%) y bolivianos (3,2%) ($p > 0,05$). Con respecto a la ancestralidad materna, el HHV-8 fue detectado en 9,9% de los que mostraron linaje nativo americano en comparación con el 7,2% de los no nativo americanos ($p > 0,05$); mientras que en el linaje paterno, el genoma viral se amplificó en 6,2% de los que presentaron haplogrupos nativo americanos en comparación con el 5,8% de los no nativo americanos ($p > 0,05$). La mayor prevalencia del HHV-8 en peruanos y paraguayos no estaría asociada con linajes nativo americanos por lo tanto respondería a eventos migratorios más recientes. El estudio de la distribución del HHV-8 en poblaciones latinoamericanas requerirá de futuros análisis epidemiológicos, históricos y genéticos.

424. (421) FORMACIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE ADN (NETS) EN DIABETES. CORRELACIÓN CON MARCADORES INFLAMATORIOS.

Carestia, Agustina¹; Frechtel, Gustavo²; Cerrone, Gloria²; Linari, Marime³; González, Claudio⁴; Schattner, Mirta¹; Casais, Patricia¹

Laboratorio de Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM¹ Genética y Biología Molecular, Depto. de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² Sección Nutrición y Endocrinología, NORMED/UOM³ Depto. de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁴

La NETosis es un mecanismo por el cual los neutrófilos (Neu) eliminan patógenos y ejercen actividades proinflamatorias y protrombóticas. La diabetes se caracteriza por un estado de inflamación crónica, disfunción endotelial y un aumento del riesgo de infección y de enfermedades cardiovasculares. El objetivo de este trabajo fue determinar si la capacidad de los Neu de formar NETs difiere entre diabéticos y dadores sanos y si existe relación entre la presencia de NETs y marcadores proinflamatorios. Se estudiaron 18 pacientes diabéticos recién diagnosticados y 18 dadores sanos. La formación de NETs se estudió por microscopía y fluorometría. Los niveles de nucleosomas y del factor von Willebrand (FvW) en plasma se determinaron por ELISA y la expresión de P-selectina (P-sel), por citometría de flujo. Los estudios de microscopía y la cuantificación de ADN mostraron que los Neu de dadores sanos sin estimular no formaron NETs, mientras que los niveles basales de los pacientes aumentaron significativamente (sanos: $0,2 \pm 0,1$ vs diabéticos: $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$). La estimulación de los Neu de los dadores sanos con TNF-alfa resultó en una mayor liberación de ADN ($0,6 \pm 0,1$), pero los Neu de los diabéticos no respondieron al estímulo (Neu: $0,5 \pm 0,1$ vs Neu+TNF-alfa: $0,5 \pm 0,1$). En comparación con los dadores sanos, los niveles de nucleosomas en plasma son mayores en los diabéticos (sanos: $0,07 \pm 0,03$ vs diabéticos: $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$). La expresión de P-sel (sanos: 10 ± 2 vs pacientes: $6 \pm 2\%$ de células positivas) y los niveles de FvW (sanos: $5,2 \pm 0,8$ vs diabéticos: $4,7 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$) fueron similares en ambas poblaciones. Este estudio piloto demostró que, en comparación a los dadores sanos, los diabéticos presentan una formación de NETs espontánea con un aumento estadísticamente significativo de nucleosomas en plasma. Otros marcadores inflamatorios, como la expresión de P-sel y los niveles de FvW, no difirieron entre las dos poblaciones. La significancia clínica de estas observaciones requiere mayor investigación.

425. (424) EFECTO DE BAJAS DOSIS DE BENZNIDAZOL SOBRE LA PARASITEMIA, SUPERVIVENCIA Y MEDIADORES INFLAMATORIOS, EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON *TRYPANOSOMA CRUZI*.

Cevey, Ágata Carolina¹; Mirkin, Gerardo Ariel¹; Penas, Federico Nicolás¹; Goren, Nora Beatriz¹
Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET-UBA

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. La etapa aguda de esta enfermedad se caracteriza por presentar elevada parasitemia y alta respuesta inflamatoria en diversos tejidos, incluyendo el corazón. La droga empleada actualmente para su tratamiento es el Benznidazol (Bz), que causa efectos adversos en el 40% de los pacientes, obligando muchas veces a la suspensión del tratamiento. A fin de encontrar una dosis de Bz más baja que la habitual, con igual eficacia parasiticida, ratones BALB/c de 2 meses de edad fueron inoculados con 500 parásitos de la cepa RA por vía ip. Los ratones fueron tratados durante un mes con 10, 25 y 100 mg/Kg/día siendo la última, la dosis de referencia. El tratamiento con 10 mg no modificó la parasitemia con respecto al control sin tratar ($[7,5 \pm 1] \times 10^5$ vs $[7,2 \pm 1,7] \times 10^5$ parásitos/ml, respectivamente, ns), muriendo todos al día 13 postinfección. Ese día la parasitemia de los ratones tratados con 25 fue de $[0,94 \pm 0,20] \times 10^5$ y la de los tratados con 100 fue indetectable ($p < 0,0001$)*. Al finalizar el tratamiento, la supervivencia de los tratados con 25 y 100 fue similar (80 vs 85%, ns), siendo la parasitemia indetectable en ambos casos. Se evidenció mediante q-RT-PCR que el tratamiento con 100 mg inhibe la expresión de ARNm de la enzima proinflamatoria NOS2, de mediadores inflamatorios como IL-1, IL-6 y TNF- α , así como de IkBa ($p < 0,05$)*, en cambio la dosis de 25 no inhibe la expresión de los mismos.*(Respecto al control sin tratar). Podemos concluir que una dosis menor que la de referencia es igualmente eficaz como parasiticida, ya que logra llevar la parasitemia a niveles indetectables, consiguiendo una supervivencia semejante. Sin embargo, esta dosis no es capaz de modular mediadores inflamatorios, que en exceso podrían perjudicar al huésped. Dado que los altos efectos adversos producidos por Bz están relacionados con la dosis, encontrar una dosis menor con igual efecto parasiticida evitaría la suspensión del tratamiento.

426. (432) PAPEL DE LIGANDOS DE PPAR γ Y PPAR α EN LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON *TRYPANOSOMA CRUZI*

Penas, Federico Nicolás¹; Vera, Marcela¹; Cevey, Ágata¹; Mirkin, Gerardo Ariel¹; Sales, María Elena²; Goren, Nora Beatriz¹
Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET-UBA¹ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET-UBA²

Los macrófagos (M) juegan un papel crítico en el transcurso de la infección con *T. cruzi* (Tc). Estas células, al ser infectadas, producen grandes cantidades de citoquinas y mediadores proinflamatorios que, aparte de intervenir en el control del parasitismo tisular, pueden provocar daños en los tejidos. Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPAR) α y PPAR γ han sido implicados en la regulación inflamatoria y en la polarización de M hacia un perfil M2. Sin embargo, su papel en la enfermedad de Chagas aún no ha sido abordado completamente. En este trabajo estudiamos el papel de 15-Deoxi- $\Delta^{12,14}$ P Δ 2 (15d) y Wy14643 (Wy), ligandos de PPAR γ y α respectivamente, en la modulación de la respuesta inflamatoria y en el perfil de activación de M peritoneales de ratones BALB/c infectados con Tc. Determinamos, mediante Western blot (Wb), que la infección induce la expresión de NOS2 y aumenta la producción de NO (μM) (Tc vs. Control, $p < 0,05$) que son inhibidas tras el tratamiento con 15d o Wy (Tc vs Tc+15d o Tc+Wy, $p < 0,05$). Además, comprobamos que el tratamiento con uno u otro ligando disminuye los niveles de ARNm de IL-6, TNF- α e IL-1 β , evaluados por Q-RT-PCR, a las 24h post-infección (Tc vs. Tc+15d o Tc+Wy; $p < 0,05$). Al determinar si Wy o 15d producían cambios en el perfil de los M infectados con

Tc, observamos que ambos aumentaban la expresión de arginasa I, y disminuían la de NOS2 (Wb) ($p < 0,05$). Además, comprobamos por Q-RT-PCR que dichos tratamientos aumentaban la expresión de otros marcadores de perfil M2 como receptor de manosa, Ym1 y TGF- β (Tc vs. Tc+15d y Tc+Wy; $p < 0,01$) en los M infectados. Por último, en condiciones de silenciamiento de PPAR γ y PPAR α , el tratamiento con los ligandos específicos no logró inhibir la expresión de NOS2 (Wb), ($p < 0,05$). Nuestros datos sugieren que el tratamiento con agonistas de PPAR α y PPAR γ dirige a los macrófagos hacia un perfil M2, inhibiendo marcadamente la expresión de mediadores inflamatorios.

CARDIOVASCULAR 1

427. (21) INFLUENCIA DE PATOLOGÍAS ASOCIADAS SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CREATINA QUINASA TOTAL Y CREATINA QUINASA MB EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO

Joison, Agustín; Baiardi, Gustavo; Barcudi, Raúl
Universidad Católica de Córdoba

La isquemia del miocardio provoca un incremento de la creatina quinasa (CK) plasmática entre las 12 a 24 hs luego del comienzo del dolor, siendo CK un marcador de uso clínico en el diagnóstico del daño isquémico. Con el objeto de evaluar la influencia de las patologías asociadas al evento isquémico sobre la variación temporal de los niveles de la creatina quinasa total (CK total) y creatina quinasa MB (CK-MB), se midieron los niveles plasmáticos de estos marcadores en 150 pacientes de ambos sexos y edades de 31 a 92 años con diagnóstico de síndrome coronario agudo (SCA). Los valores se obtuvieron al ingreso a la unidad coronaria (0 hs) y luego de 8, 12 y 24 hs. Los pacientes fueron divididos en 7 grupos: A, sin enfermedades asociadas (grupo control, n=8) y B-G pacientes con diabetes, tabaquismo, insuficiencia renal crónica, dislipidemia, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, obesidad, hipertensión arterial, cáncer e infarto agudo de miocardio, n=142. Los datos fueron analizados por ANOVA II. Los valores de CK-MB a las 0 hs del grupo A (control) y de los grupos con patologías asociadas (B-G) se hallaron elevados con respecto a los valores de referencia (25 UI/l) y no fueron significativamente diferentes entre sí, pero en el grupo control se incrementaron a las 8 hs con respecto a los valores al ingreso ($273,8 \pm 124,4$ vs $105,6 \pm 50,29$, $p < 0,05$). Este incremento no se produjo en los grupos que tienen patologías asociadas, mostrando que éstas disminuyen la respuesta de CK-MB al daño isquémico. Los niveles de la CK-total a las 0 hs fueron levemente elevados con respecto al valor de referencia y no se encontró un aumento de los niveles de CK-total a las 8 hs en el grupo control ni en los que tienen patologías asociadas, posiblemente, debido a la pequeña contribución de la CK-MB (2,5%) a la CK-total. En conclusión, hallamos que el conjunto de patologías que acompaña al SCA son un factor importante para evaluar el uso clínico de la CK-MB.

428. (26) EL BLOQUEO CRÓNICO DEL RECEPTOR DE ENDOTELINAS A (ET-A) REGULA LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA TIROSINA HIDROXILASA (TH) HIPOTALÁMICA EN RATAS HIPERTENSAS DOCA-SAL

Cassinotti, Luis R¹; Guil, MJ¹; Morales, VJ¹; Noceti, GM¹; Álvarez, CD¹; Bianciotti, LG²; Vatta, MS¹
Catedra de Fisiología, Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA¹ Cátedra de Fisiopatología, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA²

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la administración aguda del antagonista del receptor ETA (BQ-610), administrado vía intracerebro-ventricular, provocaba una caída de la presión arterial (PA) en ratas hipertensas DOCA-sal. Además, en hipotálamo anterior y posterior (HP) este protocolo experimental produjo cambios en la actividad y expresión de la TH. Sabiendo que existen diferencias entre la regulación aguda

y crónica de la PA, el objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos crónicos de la infusión de BQ-610 (100ng/ μ l, flujo constante de 12ng/h) en los animales hipertensos DOCA-sal. Durante cinco semanas se evaluó la PA y la frecuencia cardíaca de los animales. Los dos grupos experimentales, uno normotenso y otro hipertenso fueron subdivididos a la cuarta semana en dos subgrupos; uno recibió líquido cefaloraquídeo artificial y el otro BQ-610 durante 7 días. Finalizada la semana 5 los animales se sacrificaron y se aisló el HP para la evaluación de los niveles de TH total y su variante fosforilada en la serina 40 (THser40p) como marcador de la actividad de la enzima. Los resultados mostraron que el BQ-610, administrado crónicamente, en las ratas DOCA-sal disminuyó la PA en 15mmHg. Además, en HP los niveles de TH total y THser40p disminuyeron al administrarse BQ-610 tanto en los animales normotensos como hipertensos, siendo en estos últimos su efecto más marcado. Estos resultados muestran que el bloqueo crónico central del receptor ETA disminuye la PA en los animales hipertensos DOCA-sal y produce la disminución de los niveles de THtotal y THser40p en el HP que podría relacionarse con una reducción en el efecto simpatoexcitatorio de esta región hipotalámica.

429. (41) PROLONGACIÓN DEL INTERVALO QT ASOCIADO AL USO DE DOMPERIDONA EN NEONATOS

Molina, Gabriel; Caraballo, Lucía; Weitz, Darío; Ávila, Aylén; Piskulic, Laura; Marzi, Marta
Universidad Nacional de Rosario

Domperidona es un agente procinético utilizado frecuentemente en neonatos para el tratamiento del reflujo gastroesofágico. Se han reportado casos de prolongación del intervalo QT, arritmia ventricular y muerte súbita cardíaca tras su utilización en adultos. Se realizó una revisión sistemática de la literatura científica para determinar si hay evidencia de prolongación del intervalo QT asociado a la administración oral de domperidona en neonatos. Para ello se consultaron las bases de datos electrónicas MEDLINE, LILACS, ScIELO y la Biblioteca Cochrane, sin límite de fecha ni de idioma, utilizando una combinación de términos indexados y de términos libres. Dos de los siete artículos recuperados satisfacían los criterios de inclusión preestablecidos. Se trató de estudios pilotos realizados en unidades de neonatología de Francia uno (Djeddi *et al*) y de Turquía el otro (Günlemez *et al*). Ambos tuvieron en cuenta la edad gestacional (EG) de los infantes y realizaron mediciones del intervalo QT corregido en función de la frecuencia cardíaca (QTc) antes y durante la administración oral de 1mg/kg/día de domperidona. Fueron evaluados un total de 71 neonatos y se observó prolongación del intervalo QTc en 11 (15,5%). En tres de ellos (4,2%) el intervalo QTc superó el rango normal. En relación a la edad gestacional de los neonatos, el estudio de Djeddi *et al* reveló prolongación del intervalo QTc en el grupo con EG \geq 32 semanas que incluía a 20 infantes y no entre los 11 neonatos con EG < 32 semanas. El estudio de Günlemez *et al*, en cambio, sólo estudió niños nacidos entre las semanas 24 y 33 de gestación, observando 2 casos en 40 (5%) con intervalo QTc superior al rango normal. Aunque se encontró evidencia de prolongación del intervalo QTc en neonatos tratados con domperidona oral, se necesitan más estudios para cuantificar el riesgo asociado a la droga en esta población. Si la administración de domperidona no puede evitarse, deberá acompañarse con mediciones periódicas del intervalo QTc.

430. (53) BIOMARCADORES ASOCIADOS A ESTRÉS OXIDATIVO EN MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA

Caffaratti, Julia Marina¹; Lioi, Susana¹; Gerrard, Gabriela¹; Diviani, Romina¹; Ceruti, María José¹; Beloscar, Juan²; D Arrigo, Mabel¹
Área Química Analítica Clínica, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de Rosario¹ Carrera de Cardiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario²

Muchos esfuerzos han intentado comprender los intrigantes mecanismos patogénicos de la Miocardiopatía Chagásica Crónica

(MCC). Sin embargo, los factores fisiopatológicos que controlan la formación y la perpetuación de la inflamación cardíaca en los pacientes chagásicos aún no fueron totalmente aclarados. El curso de la enfermedad dependería de varios factores como carga parasitaria, grupo genético y cepa del parásito, reinfección y estado inmunológico del hospedero entre otros. La persistencia parasitaria en el tejido cardíaco se relacionaría con la agresión miocárdica. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el parásito causa daño en el corazón en la fase crónica es desconocido. En la actualidad, se sugiere que el estrés oxidativo constante en el corazón contribuiría a la MCC. Estudios indican que reacciones inflamatorias en el corazón se relacionarían con mayor producción de citoquinas que inducirían una mayor generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS/RNS). El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio descriptivo de biomarcadores de estrés oxidativo como actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), medición de punto final de la oxidación lipídica es el ensayo SRAT (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico, tBARS) y antioxidantes totales. Se analizaron 3 grupos: controles (CN=55), chagásicos sin MCC (ECsinMCC=28) y MCC=35 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 CAT por método espectrofotométrico (Kits Ransel Labs), tBARS y antioxidantes totales (Randox). Para el estudio estadístico se realizó análisis de varianza a un criterio de clasificación, para cada enzima, se aplicó Kruskal Wallis. Los resultados obtenidos fueron: CAT(K/gHb): MCC 316±68, CsinC 332±41, CN 185±28; SOD(USOD/gHb): MCC 3270±833, CsinC 2590±188, CN 895±314; MDA/tBARS(nmol/ml): MCC 4,04±1,82, CsinC 3,56±1,22, CN 2,30±0,62. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) de la actividad de biomarcadores asociados al estrés oxidativo en los pacientes estudiados, lo que significaría a nivel celular, una alteración de la capacidad antioxidante. La determinación de estos biomarcadores serían potencialmente útiles en el diseño de modelos predictivos para identificar pacientes chagásicos con riesgo de desarrollar complicaciones clínicas.

431. (149) EL INHIBIDOR DE LA AUTOFAGIA, 3-METILADENINA (3-MA), EJERCE EFECTOS NOCIVOS EN AURÍCULAS AISLADAS DE RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA SIMULADA-REPERFUSIÓN (IS-RS)

Hermann, Romina; Mestre Cordero, Victoria; Fernández Pazos, María De Las Mercedes; Rusiecki, Tatiana; Velez, Débora; Marina Prendes, María Gabriela; Savino, Enrique; Varela, Alicia
Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Instituto de Química y Metalurgia del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET

Trabajos anteriores mostraron que en la aurícula izquierda aislada de rata sometida a 75min Is-75min Rs, la 3-MA (5mM) disminuyó la expresión de marcadores de autofagia, generó aparición de arritmias severas en la Rs y disminuyó la respuesta contráctil a la estimulación β -adrenérgica y a dosis crecientes de Ca^{2+} al finalizar la Rs. A su vez, micrografías electrónicas mostraron un mayor deterioro mitocondrial en aurículas sometidas a Is-Rs en presencia de 3-MA, efecto que se acompañó de una menor producción de ATP en mitocondrias aisladas. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la 3-MA afecta el contenido tisular de ATP. A su vez, con la finalidad de investigar si el canal aniónico de la membrana interna mitocondrial (IMAC), que se abre en situaciones de estrés metabólico, contribuye a la generación de arritmias en las presentes condiciones experimentales, se estudiaron los efectos del PK11195 (50 μ M), inhibidor de dicho canal. Se emplearon aurículas izquierdas aisladas de ratas (SD) estimuladas a 1Hz e incubadas isométricamente en Krebs-Ringer (glucosa 10 mM, O_2 95%- CO_2 5%, pH 7,4). En la Is, se reemplazó el O_2 por N_2 y la glucosa por 2-desoxiglucosa 10mM, pH 6,8. Se empleó ANOVA (n=8). Los resultados muestran que el contenido

tisular de ATP disminuyó significativamente al final de la Rs, siendo esta disminución mayor cuando la Is-Rs se realizó en presencia de 3-MA (pre-isquémico:1,10±0,20; Is-Rs:0,60±0,02**; Is-Rs+3-MA:0,34±0,10*** nmol/mg prot tisular; ** $p < 0,01$ vs pre-isquémico; * $p < 0,05$ vs Is-Rs). La incidencia de arritmias fue atenuada en presencia del PK11195 (Is-Rs:0%***; Is-Rs+3-MA:47%***; Is-Rs+3-MA+PK11195:29%***; ** $p < 0,01$ vs Is-Rs; * $p < 0,05$ vs Is-Rs+3-MA). Los resultados muestran que los efectos nocivos de la 3-MA, inhibidor de la autofagia, en la aurícula aislada de rata sometida Is-Rs, se acompañan de un menor contenido tisular de ATP y sugieren que las mitocondrias podrían estar implicadas en la generación de las arritmias inducidas por este inhibidor.

432. (151) ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA EN EL SÍNDROME METABÓLICO: VLDL ALTERADAS Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Lucero, Diego¹; López, Graciela I¹; Gorzalczy, Susana²; Alonso, Inés³; Duarte, Mariano⁴; González Ballerga, Esteban³; Sordá, Juan³; Zago, Valeria¹; Schreier, Laura¹
Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Depto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)-UBA¹ Depto. de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.² División de Gastroenterología. Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, UBA.³ División Cardiología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.⁴

La esteatosis hepática no-alcohólica (EHNA) es uno de los componentes del síndrome metabólico (SM), que constituiría otro factor de riesgo aterogénico. En trabajos previos observamos VLDL grandes y sobrecargadas en triglicéridos (TG) en pacientes con SM+EHNA. Objetivo: Estudiar el efecto de las VLDL alteradas en el SM asociado a EHNA sobre la función endotelial mediante modelos humano e *in vitro*. Modelo humano: 40 pacientes con SM+EHNA sometidos a la prueba funcional de velocidad de onda de pulso (VOP) que los subdividió en los que conservaron la función endotelial (n=19) y los que mostraron disfunción endotelial (n=21). En suero en ayunas se determinó perfil lipídico, se caracterizó VLDL aislada ($\delta < 1.006$ g/L) y se calculó HOMA-IR. Modelo *in vitro*: bioensayos de función endotelial en presencia de VLDL aisladas (0,15 mg de proteína) de pacientes con SM, con EHNA (n=6) -tomadas al azar del modelo humano- y sin EHNA (n=6). Las VLDL se incubaron con anillos de aorta torácica de ratas machos S. Dawley (~250 g). Se evaluó la relajación inducida por acetilcolina (10^{-9} - 10^{-6} M) del endotelio pre-contráido con noradrenalina (10^{-8} M), en ausencia y presencia de VLDL, y se expresó como% de inhibición de dicha relajación. En el modelo humano, los pacientes con EHNA que presentaron disfunción endotelial fueron más insulino-resistentes ($p=0,01$) y además presentaron VLDL con mayor contenido en TG (59,1±4,8 vs. 54,1±4,7% $p=0,04$), aún después de ajustar por HOMA-IR, colesterol, c-LDL y edad ($p < 0,05$). En el modelo *in vitro* las VLDL de SM con EHNA tendieron a una mayor inhibición de la relajación en comparación a SM sin EHNA (28,9±9,1 vs 18,3±9,6%, $p=0,06$). El% de inhibición correlacionó con TG-VLDL% ($r=0,60$; $p=0,05$). Se interpreta que VLDL ricas en TG producidas en SM+EHNA, inducirían disfunción endotelial. La presencia de EHNA acentuaría el riesgo cardiovascular en el SM.

433. (156) EL AUMENTO DEL SECUESTRO DE Ca^{2+} DISMINUYE LA VULNERABILIDAD A ARRITMIAS PRODUCIDA POR FOSFORILACIÓN DE LOS RECEPTORES DE RIANODINA CARDÍACOS (RYR2). ESTUDIO EXPERIMENTAL Y SIMULACIÓN EN UN MODELO DE MIOCITO CARDÍACO HUMANO

Lascano, Elena¹; Felice, Juan Ignacio²; Valverde, Carlos²; Sommese, Leandro²; Villarreal, Mara²; Palomeque, Julieta²; Weherens, Xander³; Mattiazzi, Alicia²; Negroni, Jorge C.¹
Universidad Favaloro¹ Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata² Baylor College, USA³

Ratones con pseudo-fosforilación constitutiva del RyR2 (S2814D), aumentan la probabilidad de apertura de los RyR2 y la liberación de Ca^{2+} en diástole, fenómeno que acentúa su propensión a arritmias frente a situaciones de estrés. Nuestra hipótesis es que un aumento del secuestro de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático (RS) a través de la bomba de Ca^{2+} (SERCA2a) es capaz de rescatar a los ratones S2814D de la pérdida diastólica de Ca^{2+} y de las arritmias por estrés. Se usaron ratones S2814D y ratones resultantes de la cruce de éstos con otros con ablación de PLN (SDKO) que determina un aumento de la actividad de la SERCA2a. En miocitos aislados de ratones S2814D se observó una pérdida diastólica espontánea de Ca^{2+} (frecuencia de destellos de Ca^{2+} al microscopio confocal, expresada como eventos/seg/100 μm) de $5,3 \pm 2,0$ en S2814D, significativamente mayor a la de los ratones no modificados genéticamente ($1,8 \pm 0,9$). Dicha pérdida disminuyó a $1,8 \pm 0,3$ en los SDKO. En experimentos *in vivo*, los ratones S2814D con inyección de cafeína y noradrenalina, presentaron extrasístoles ventriculares y complejos bidireccionales en el 100% de los casos (n=5), que no aparecieron en los SDKO (n=4). En un modelo matemático de miocito humano, se simuló un aumento de la liberación de Ca^{2+} por el RyR2 (Irel) y del secuestro de Ca^{2+} por la SERCA2a (Iup). Se comprobó un aumento de eventos espontáneos (PAe) en respuesta a 25% de aumento de Irel (5 PAe en control vs. 13 PAe con Irel aumentado), y la cancelación total de los PAe cuando al incremento de Irel se agregó un 200% de aumento de Iup. Conclusiones: El aumento del secuestro de Ca^{2+} por el RS es capaz de disminuir la pérdida de Ca^{2+} espontánea producida por la fosforilación del RyR2 y las arritmias ventriculares relacionadas con esta alteración. La buena representatividad de las experiencias que tuvo el modelo, permitiría la exploración por medio de simulación de los mecanismos implicados en la generación de eventos espontáneos.

434. (186) COMPORTAMIENTO DE METALOPROTEASAS EN EL TEJIDO ADIPOSO EPICÁRDICO Y SU ASOCIACIÓN CON EL RIESGO CARDIOMETABÓLICO

Miksztoiwicz, Verónica¹; Morales, Celina²; López, Graciela¹; Póveda, Ricardo³; Schreier, Laura¹; Gelpi, Ricardo²; Rubio, Miguel³; Berg, Gabriela¹
Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Depto. de Bioquímica Clínica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)-UBA, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires¹ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² División Cirugía Cardiaca. Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³

El tejido adiposo visceral epicárdico (TAE), por su aposición con el corazón podría estar relacionado al riesgo cardiometabólico. Las metaloproteasas (MMPs), están implicadas en el remodelamiento del TA; sin embargo, su comportamiento es desconocido en TAE. Objetivos: evaluar la localización y la actividad de MMP-2 y -9 y las características inflamatorias del TAE en enfermedad coronaria (EC). Sujetos y métodos: se obtuvo TAE y TA subcutáneo (TAS) de pacientes con EC (n=17) sometidos a cirugía de revascularización y pacientes derivados a cirugía cardiovascular no coronaria (control, n=15), en el momento de la cirugía. Se evaluó localización y actividad de MMP-2 y -9, densidad vascular (DV) y presencia de células inflamatorias. Resultados: se evidenció por inmunohistoquímica presencia de MMP-2 y -9 en el estroma conectivo perivascular, en la membrana basal de los adipocitos y en células inflamatorias en TAE y TAS de ambos grupos. El TAE de EC presentó mayor actividad relativa (AR) de ambas MMPs que TAE de controles (MMP-2: $1,73 \pm 0,52$ vs $1,42 \pm 0,20$; MMP-9: $1,53 \pm 0,61$ vs $1,25 \pm 0,32$ $p < 0,05$), y mayor DV (54 ± 10 vs 40 ± 8 vasos/ mm^2 , $p = 0,015$), sin diferencias en TAS entre grupos. En EC, la actividad de MMP-2 y -9 fue mayor en TAE que en TAS ($p = 0,025$ y $p = 0,05$ respectivamente), así como la DV (54 ± 10 vs 37 ± 12 vasos/ mm^2 , $p = 0,014$). TAE y TAS de controles no mostraron diferencias en actividad de MMPs. La actividad de MMP-2 y -9 correlacionó positivamente con DV en TAE ($r = 0,694$ $p = 0,006$ y $r = 0,634$ $p = 0,02$, respectivamente). Finalmente, en

EC, TAE presentó mayor infiltrado de células inflamatorias que TAS, principalmente de linfocitos T y macrófagos. No se observó retención celular en TAE y TAS de controles. Conclusiones: La mayor actividad de MMPs en TAE de EC sería un factor responsable de su mayor DV. La presencia aumentada de MMPs y el mayor infiltrado inflamatorio en el TAE de EC, podría vincularse al mayor riesgo cardiometabólico afectando directamente la vulnerabilidad de la placa.

435. (189) EL ESTRÉS PSICOSOCIAL SE RELACIONA CON PARÁMETROS LÍPIDICOS EN UNA POBLACIÓN CON INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Fernández Machulsky, Nahuel Hernán¹; Gagliardi, Juan³; Fabre, Bibiana²; Miksztoiwicz, Verónica¹; García Escudero, Alejandro³; Gigena, Gerardo³; Blanco, Federico³; Schreier, Laura¹; Berg, Gabriela¹
Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Depto. de Bioquímica Clínica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)-UBA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Laboratorio de Endocrinología, Depto. de Bioquímica Clínica, INFIBIOC-UBA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² Sección Hemodinamia, División Cardiología, Hospital "Cosme Argerich"³

Introducción. El infarto agudo de miocardio (IAM) es la principal causa de muerte en la sociedad occidental. Los factores de riesgo tradicionales no siempre predicen nuevos eventos cardiovascularmente. Factores psicosociales se han asociado a mayor IAM, siendo importante el estudio de su impacto sobre mediadores bioquímicos. Objetivo. Estudiar la relación entre el perfil lipídico-lipoprotéico, la hostilidad y el apoyo social en una población con IAM. Materiales y Métodos. Se evaluaron 76 pacientes que ingresaron al Hospital Argerich con IAM, posteriormente derivados a angioplastia priMaría. Se midieron parámetros hemodinámicos y perfil lipídico-lipoproteico y se calcularon diferentes índices lipídicos al ingreso y 3 meses post-IAM. A las 24 horas del ingreso, se registraron datos clínicos y se realizaron encuestas para evaluar hostilidad y apoyo social. Resultados. La hostilidad correlacionó directamente con col no-HDL ($r = 0,244$ $p = 0,043$) y col-LDL ($r = 0,280$ $p = 0,029$) al ingreso. El apoyo social correlacionó inversamente con col-total ($r = -0,386$ $p = 0,004$), ApoB ($r = -0,469$ $p = 0,001$), índice ApoB/ApoA ($r = -0,355$ $p = 0,015$) y col no-HDL a los 3 meses ($r = -0,372$ $p = 0,007$). Todas las correlaciones fueron independientes de edad, índice de masa corporal y circunferencia de cintura. El apoyo social también correlacionó inversamente con el número de vasos afectados ($r = -0,260$ $p = 0,039$) y directamente con la fracción de eyección inicial ($r = 0,453$, $p = 0,009$). Los pacientes con mayor score de hostilidad tuvieron mayor col-total ($p = 0,047$), col-LDL ($p = 0,036$) y ApoB ($p = 0,043$) al ingreso, mayor TG ($p = 0,039$) y TG/col-HDL a los 3 meses ($p = 0,051$). Conclusiones. A través de un trabajo prospectivo se observó, en esta población, que la hostilidad y el apoyo social correlacionaron desfavorablemente con factores hemodinámicos y distintos parámetros del perfil lipídico-lipoproteico. El perfil lipídico aterogénico podría ser un mediador entre factores psicosociales adversos y el IAM.

436. (201) LA EXPOSICIÓN AGUDA A PARTÍCULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL INDUCE LA EXTRAVASACIÓN DE LEUCOCITOS POR ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y MIELOIDES

Marchini, Timoteo^{1,2}; Anto Michel, Nathaly²; Tasat, Deborah³; Wolf, Dennis²; Bode, Christoph²; Evelson, Pablo¹; Zirlik, Andreas²
Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-UBA-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Atherogenesis Research Group, University Heart Center, Universidad de Freiburg, Alemania² 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 afecciones cardiovasculares. Una respuesta inflamatoria sistémica, producto de la inhalación de MP, ha sido señalada como participe fundamental en este contexto. El objetivo del presente trabajo fue clarificar los mecanismos subyacentes a dicha respuesta inflamatoria, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de exposición aguda a MP derivadas de la combustión del petróleo (ROFA), y mediante técnicas basadas en la microscopía intravital, ELISA y citometría de flujo. En ratones C57BL/6 expuestos a ROFA (1 mg/kg peso), se observó un incremento significativo en el rodamiento y la adhesión de leucocitos en el lecho mesentérico 3 h luego del tratamiento, junto con aumentos del 25% y 21% en los marcadores plasmáticos de activación del endotelio sI-CAM (control: 90 ± 4 ng/mL, $p < 0,01$) y sV-CAM (control: 158 ± 8 ng/mL; $p < 0,05$), respectivamente. Asimismo, se observó un aumento significativo del 25% en el nivel de activación de CD11b en neutrófilos (IFM control: 42 ± 3 , $p < 0,05$), y del 61% en monocitos Gr-1+ (IFM control: 61 ± 7 , $p < 0,05$). Estos resultados se acompañaron de incrementos significativos en los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-6 y MCP-1 en los ratones expuestos a ROFA con respecto al grupo control. Experimentos *in vitro* confirmaron que las citoquinas proinflamatorias presentes en el plasma de los ratones instilados con ROFA inducen la activación de células endoteliales y mieloides. Por otro lado, la depleción de monocitos, pero no de linfocitos T y B, limitó la respuesta inflamatoria local y sistémica *in vivo*. Estos resultados muestran que la exposición aguda a ROFA induce una respuesta inflamatoria sistémica a través de la activación de células de la serie mieloide y del endotelio, lo que podría encontrarse relacionado con los efectos adversos sobre el sistema cardiovascular producidos por la inhalación de MP.

437. (253) IMPACTO DEL ESTADO REDOX DEL RYR2 EN LA ARRITMOGÉNESIS Y LA RECUPERACIÓN CONTRÁCTIL POST-ISQUÉMICA

Herrero, Marcia Agustina; Román, Bárbara; Becerra, Romina; Cracco, Miguel; Di Carlo, Mariano Nahuel; Salas, Margarita; Mundiña-Weilenmann, Cecilia; Vittone, Leticia; Said, Matilde

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Centro Científico Tecnológico (CCT)- CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Fosforilar el canal de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (RS) o receptor de rianodina (RyR2), por la quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina, genera arritmias durante la reperfusión del miocardio sometido previamente a isquemia. El aumento del estrés oxidativo en la etapa post-isquémica, también podría afectar al RyR2 y contribuir a la aparición de arritmias y a la disfunción contráctil presentes en el atontamiento. El presente trabajo se propuso examinar modificaciones redox del RyR2 producidas por especies reactivas del O_2 y N_2 y su incidencia en la recuperación contráctil del corazón de rata sometido a isquemia y reperfusión (I/R). Corazones aislados y perfundidos (Langendorff) se sometieron a I/R (20min/30min), en presencia y ausencia de inhibidores de la óxido nítrico sintasa (L-NAME) y de la NADPH oxidasa (Apocinina). Se evaluaron parámetros mecánicos y potenciales monofásicos determinándose por inmunodetección cambios redox del RyR2 en homogenatos de tejido ventricular. A R1min ($n = 3$ a 6) hubo aumentos significativos de: 1) S-nitrosilación del RyR2 ($131 \pm 9\%$ de Preisquemia, PI); 2) S-glutacionilación del RyR2 ($129 \pm 6\%$ PI); 3) arritmias, evaluadas como latidos prematuros (LP) en los 3 min iniciales de R (45 ± 4 vs 3 ± 1 PI). El tratamiento con L-NAME y Apocinina disminuyó la S-nitrosilación y la S-glutacionilación del RyR2 respectivamente ($100,0 \pm 8\%$ y $87 \pm 2\%$ PI, $p < 0,05$). Ambos tratamientos aumentaron los LP (58 ± 3 y 64 ± 6 $p < 0,05$), empeoraron la recuperación contráctil a R30min ($13 \pm 5,7\%$ y $11,3 \pm 2,2\%$ vs $48,4 \pm 6,4\%$ sin tratamiento, $p < 0,05$) y aumentaron la presión diastólica final (en mmHg: $75,6 \pm 9,1$ y $70,0 \pm 10,5$ vs $41,7 \pm 4,9$ sin tratamiento). Los resultados muestran que en el atontamiento, el RyR2 sufre oxidaciones reversibles (S-nitrosilación y S-glutacionilación) y que impedir las deteriora la recuperación contráctil y favorece la arritmogénesis. Estas modificaciones redox protegerían al miocardio limitando la pérdida excesiva de Ca^{2+} del RS durante la reperfusión. PIP 0463.

438. (265) MODULACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR ENDOTELIAL POR LOS PROTEOGLICANOS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR FRENTE A LA INJURIA.

Oberkersch, Roxana Elena¹; Barakian, Benjamín¹; Yuschak, Sonia²; Calabrese, Graciela C¹

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Servicio de Obstetricia del Complejo Médico Churrucá-Visca²

La matriz extracelular vascular (MEXv) juega un rol importante en la aterogénesis. La injuria ocasionada por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) podría desencadenar una respuesta diferencial dependiendo del fenotipo endotelial. Nuestro objetivo fue estudiar la producción de los proteoglicanos (PRGs) de la MEXv y la respuesta celular asociada en el endotelio humano venoso y arterial (HUVEC Y HUAEC, respectivamente) frente a VLDL humana. Los endotelios fueron tratados con VLDL ($75 \mu\text{g/ml}$) durante 24 hs y luego se analizó: la producción de PRGs por inmunoblot y RT-PCR; actividad de metaloproteinasas de matriz (MMPs) por gelatina/caseína zimografía; proliferación celular por citometría de flujo; translocación del factor NF κ B y fosforilación de ERK por inmunoblot e inmunofluorescencia. Las HUAEC tratadas con una concentración fisiológica de VLDL mostraron un descenso significativo en la producción de decorina y versicano (0 vs $75 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,01$; $n = 3$. Mann-Whitney) sin modificaciones en la producción de perlecano y actividad de MMPs. No se registró diferencias en la relación núcleo/citoplasma (N/C) del NF κ B ($N/C_{VLDL0} = 0,20 \pm 0,02$ y $N/C_{VLDL75} = 0,51 \pm 0,03$). Mientras que las HUVEC frente al mismo tratamiento registraron un aumento significativo en la producción de decorina y versicano (0 vs $75 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,01$; $n = 3$. Mann-Whitney) y un incremento en la actividad de sólo la MMP-9 (0 vs $75 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$; $n = 3$. Mann-Whitney). La translocación de NF κ B se incrementó siete veces luego del tratamiento ($N/C_{VLDL0} = 0,15 \pm 0,06$ y $N/C_{VLDL75} = 1,11 \pm 0,3$) (0 vs $75 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$; $n = 3$. Mann-Whitney). No se detectaron modificaciones significativas en la fosforilación de ERK y proliferación celular para ambos endotelios. Los resultados obtenidos sugieren que las HUVEC son capaces de reaccionar a la injuria por VLDL ejecutando una respuesta de características inflamatorias dependiente de la vía del NF κ B y de la modulación autócrina y parácrina de los pequeños PRGs. La diferente respuesta evidenciada en las HUAEC podría justificar su característica pro-aterogénica.

439. (271) LA CARDIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR LA TIORREDOXINA-1 SE ABOLE EN LA EDAD MEDIA DE LA VIDA INVOLUCRANDO LA AKT Y LA GSK-3B

Mazo, Tamara¹; Pérez, Virginia¹; Gómez, Anabella¹; Llamas, Clara¹; Nicolosi, Liliana²; Rubio, María Del Carmen²; D'annunzio, Verónica¹; Gelpi, Ricardo J.¹

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular¹ División de Cardiología, Hospital Español y Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²

Previamente demostramos que la tiorredoxina-1 (Trx1) disminuye el tamaño de infarto en ratones jóvenes, pero esto no sucede en la edad media de la vida. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la protección por Trx1 no están del todo dilucidados. El objetivo fue evaluar si en la reducción del tamaño de infarto en los ratones transgénicos (TG) Trx1 jóvenes (3 meses), está involucrada la activación de la si la Akt y la GSK3b, en comparación con los ratones no transgénicos (NTG) jóvenes y de edad media (12 meses). Se utilizaron ratones TG con sobreexpresión cardiaca de Trx1 jóvenes (TG-J $n = 6$) y de edad media (TG-EM: $n = 7$) con sus respectivos controles NTG (NTG-J: $n = 7$ y NTG-EM: $n = 6$), sometidos a 30 min de isquemia y 120 min de reperfusión (Langendorff). Se midió el tamaño de infarto (trifenil tetrazolio) y la expresión de Akt, Akt fosforilada, GSK3b y GSK3b fosforilada (western blot). Además se estudió la actividad de Trx1 (ensayo de reducción de la insulina) y se evaluó la nitración cardiaca (western blot). El tamaño de infarto en los TG-J fue menor que en los NTG-J (NTG-J: $42,8 \pm 6,1\%$ vs TG-J: $27,6 \pm 3,5\%$, $p < 0,05$), sin cambios en los ratones de edad media (NTG-EM: $49,1 \pm 6,3$ vs TG-EM: $52,6 \pm 5,2\%$, ns). La falta de protección en los ratones TG-EM se

acompañó por una disminución de la actividad del $57,9 \pm 0,6\%$ de Trx1 con un incremento en la nitración del $17,1 \pm 0,2\%$ en los TG-EM. La protección en los ratones TG-J involucró un aumento en la fosforilación de Akt durante la reperusión (TG-J: $47,2 \pm 2,4\%$; NTG-J: $12,3 \pm 1,7\%$, $p < 0,05$) y de la GSK3b (TG-J: $38,1 \pm 1,1\%$; NTG-J: $13,1 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$) comparados con sus respectivos valores preisquémicos. No se evidenciaron cambios en los ratones en edad media de la vida. Nuestros datos sugieren que los ratones TG-J presentan un menor tamaño de infarto involucrando la fosforilación de la Akt y la GSK3b, mientras que en los ratones TG-EM ésta protección no se evidenció debido a una inactivación por incremento de la nitración de Trx1.

440. (325) PARTICIPACIÓN DE LA CARNITINA PALMITOIL-TRANSFERASA-1 (CPT-1) EN LOS EFECTOS DE LA ROSUVASTATINA (R) EN CORAZONES DE RATA SUJETOS A ISQUEMIA REPERFUSIÓN.

Velez, Débora; Hermann, Romina; Barreda Frank, Mariángeles; Savino, Enrique; Varela, Alicia; Marina Prendes, María Gabriela

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

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron que la administración aguda de R posee efectos beneficiosos en corazones de rata perfundidos Langendoff sujetos a isquemia-reperusión (I-R). En este trabajo nos propusimos estudiar la participación de la CPT-1 en los efectos cardioprotectores de la R. Se trabajó con ratas hembras wistar alimentadas *ad libitum* con un peso de 230-250gr. Se empleó oxfenicina (OX) 2mM, inhibidora de la CPT-1. La misma se administró 15 minutos antes de la isquemia global total hasta el final de la reperusión, mientras que la R 3uM se suministró en el medio de perfusión 10 minutos antes de la isquemia global total. Se trabajó con 4 grupos experimentales: control (C), R, control + OX (C+OX) y R+OX. Se determinó presión x frecuencia cardíaca (PxF), velocidad de contracción y de relajación ($\pm dP/dT$), presión diastólica final (PDF), liberación de creatina kinasa (CK) durante los primeros 10 minutos de la reperusión (RP) posterior a isquemia y el contenido tisular de ATP al finalizar la RP. El empleo de OX no generó cambios significativos en la recuperación postisquémica del grupo R ni en los niveles de CK (UI/g), sin encontrarse diferencias entre los controles (C, C+OX) a los 10min de RP: PxF(%): C $57,8 \pm 5$, R $115 \pm 16^*$, C+OX $65,4 \pm 7$, R+OX $95 \pm 14^*$; $+dP/dT$ (%): C 70 ± 10 , R $120 \pm 15^*$, C+OX 90 ± 13 , R+OX $106 \pm 17^*$; $-dP/dT$ (%): C 65 ± 10 , R $100 \pm 18^*$, C+OX 75 ± 9 , R+OX $115 \pm 20^*$; PDF (%) a los 5 min de RP: C $20,0 \pm 7$, R $5,9 \pm 3^*$, C+OX 17 ± 3 , R+OX $7 \pm 3^*$; CK(UI/g): C 62 ± 5 , R $29,1 \pm 3^*$, C+OX 55 ± 4 , R+OX $30,2 \pm 4^*$, * $p < 0,05$ vs C, C+OX. El contenido tisular de ATP (nmoles/ps) fue superior para el grupo R ($4,4 \pm 0,2^*$) frente a los controles (C: $1,9 \pm 0,2$, C+OX, $2,1 \pm 0,3$), no habiendo diferencias significativas con el grupo R+OX ($5,0 \pm 0,5^*$), * $p < 0,05$ vs C, C+OX. La estadística se hizo con ANOVA ($n=6$ /grupo). Los resultados sugieren que la CPT-1 no estaría involucrada en las acciones cardioprotectoras de la R en el presente modelo experimental.

441. (348) VALORACIÓN GLOBAL Y REGIONAL DE LA INSUFICIENCIA CARDÍACA AGUDA POR HALOTANO

Negróni, Jorge Antonio; Lascano, Elena C.; Wray, Sandra; Cabrera Fischer, Edmundo I.
Universidad Favaloro

La insuficiencia cardíaca produce deterioro hemodinámico y mecánico, el cual puede agravarse debido a un evento coronario. El estudio de los efectos de ambas patologías asociadas requiere de modelos bien caracterizados para el ensayo de intervenciones o drogas que las alivien. El modelo experimental de insuficiencia cardíaca aguda por sobredosis de halotano ha sido descrito hemodinámicamente. Sin embargo, no se conoce su efecto sobre la mecánica cardíaca global y regional y su impacto durante la isquemia regional. El propósito de este estudio es el desarrollo de un modelo de insuficiencia cardíaca con halotano en ovejas para

estudiar su efecto sobre índices de mecánica global (diámetro ventricular izquierdo) y regional (espesor parietal) con microcristales. Resultados: En 23 ovejas estudiadas, después de 15 minutos de administración de halotano 3-4%, hubo un descenso de la presión arterial media (PAM, cateterismo arterial) que llevó su valor basal (100%) al $74,2 \pm 10,2\%$ ($p < 0,01$), el volumen minuto (VM, Swan-Ganz) al $73,0 \pm 17,5\%$ ($p < 0,01$), la fracción de acortamiento de diámetro intraventricular (FAD) al $90,0 \pm 25,8\%$ ($p < 0,05$) y la fracción de engrosamiento parietal (FE) al $71,0 \pm 27,1\%$ ($p < 0,01$). En estas condiciones, la isquemia regional (oclusión durante 5 minutos de la descendente anterior en el sitio de colocación de los cristales parietales) aumentó el deterioro cardíaco respecto de la condición basal con halotano (100%), con una caída adicional de la PAM al $87,1 \pm 11,5\%$ ($p < 0,01$), del VM al $78,5 \pm 14,9\%$ ($p < 0,01$), y de la FE al $4,21 \pm 56,4\%$ ($p < 0,01$). Conclusión: Los resultados indican la bondad del modelo para el estudio de la insuficiencia cardíaca experimental por halotano, siendo la FE el índice más específico de deterioro mecánico y el más sensible a la isquemia regional.

442. (366) ADAPTACIÓN CARDIOVASCULAR EN RATAS CON TRASTORNOS TIROIDEOS EN LA HEMORRAGIA: IMPLICANCIA DEL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO.

Rodríguez, María De Lourdes^{1,3}; Detomaso, Florencia^{1,3}; Braga, Paula^{1,3}; Cernadas, Gustavo³; Balaszczuk, Ana^{1,2,3}; Fellet, Andrea^{1,2,3}

Facultad de Farmacia y Bioquímica¹ Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET² Universidad de Buenos Aires³

El presente trabajo evalúa la participación del óxido nítrico (NO) en los cambios hemodinámicos ante una depleción aguda de volumen en ratas jóvenes con trastornos tiroideos. Métodos: Ratas macho Sprague-Dawley eutiroides(E), hipotiroideas(h) e hipertiroideas(H) de 2 meses de edad fueron divididas en control(C); hemorragia(H) (hemorragia del 20% de la volemia); control con L-NAME(CL-NAME) y hemorragia con L-NAME (HL-NAME); ($n=7$ /grupo). El hipotiroidismo se indujo mediante la administración de metimazol 0.02% en el agua de bebida durante 28 días. El hipertiroidismo se indujo mediante la administración de triiodotironina (T3, 60ug/kg animal i.p.) cada 2 días durante 28 días. Se utilizó L-NAME (inhibidor inespecífico de la NOS), 1 mg/kg iv seguido de 0,5 mg/kg.h $iv=100 \mu l/h$. La presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC) se monitorearon durante 120 minutos. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics 17.0 (IBM). Los datos se expresaron como la media (X) \pm error estándar de la media (ESM). Se consideró significativo el 5% de probabilidad (* $p < 0,05$ vs valores basales; & $p < 0,05$ vs sin L-NAME). Resultados: La hemorragia indujo una hipotensión inmediata seguida de una estabilización en valores de alrededor de 50mmHg en todos los animales. El sangrado indujo una inmediata bradicardia seguida de un incremento gradual de la FC en todos los grupos hasta alcanzar valores taquicardizantes a los 120 min. El L-NAME favoreció la recuperación de los valores de PAM luego de 120 min del sangrado y anuló los cambios en la FC en animales eutiroides e hipotiroideos. Conclusión: La hipotensión inmediata inducida por la hemorragia sería independiente del NO y dependiente del estado tiroideo. Sin embargo, el NO estaría implicado en la regulación de la presión arterial en las fases más tardías del estado hipovolémico. La modulación que ejerce el NO sobre la actividad marcapaso ante una hipovolemia aguda dependería del estado tiroideo.

TOXICOLOGÍA 1

443. (98) EVALUACIÓN DEL ESTADO REDOX EN CÉLULAS DE CONJUNTIVA HUMANA EXPUESTAS A PARTÍCULAS DIESEL

Lasagni Vitar, Romina Mayra¹; Tau, Julia²; Reides, Claudia Gabriela¹; Berra, Alejandro²; Ferreira, Sandra María¹; Llesuy, Susana Francisca¹

Cátedra de Química General e Inorgánica, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL), Facultad de Far-

macia y Bioquímica, UBA¹ Laboratorio de Investigaciones oculares, Depto. de Patología, Facultad de Medicina, UBA²

La contaminación ambiental es un problema mundial, que provoca efectos adversos sobre la salud humana. Los ojos son vulnerables a los efectos de la polución ambiental al estar expuestos al medio ambiente. El objetivo del trabajo fue evaluar el estado redox en células de conjuntiva humana incubadas con diferentes concentraciones (10, 50 y 100 µg/mL) de partículas diesel (DEP) durante 24 hs. Se evaluaron los siguientes parámetros: generación de especies activas del oxígeno y del nitrógeno; actividad de enzimas antioxidantes: superóxido dimutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST); niveles de antioxidantes no enzimáticos y daño a proteínas. Las células expuestas a 50 y 100 µg/mL mostraron un aumento significativo de las especies activas del oxígeno (24%, $p < 0,01$ y 45%, $p < 0,001$, respectivamente) y del nitrógeno (257%, $p < 0,01$ y 514%, $p < 0,001$, respectivamente) respecto al grupo control. La actividad de la enzima SOD se incrementó (84% y 108%, $p < 0,001$, respectivamente), al igual que la GPx (41%, $p < 0,05$ y 50% $p < 0,01$, respectivamente) y la GST (42% y 45%, $p < 0,01$, respectivamente). En los mismos grupos, se observó una disminución en los niveles de antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles (42%, $p < 0,05$ y 58%, $p < 0,01$, respectivamente). Las proteínas oxidadas aumentaron en el grupo DEP 100 µg/mL (58%, $p < 0,05$), pero no se encontraron diferencias significativas en el grupo DEP 50 µg/mL con respecto al grupo control. No se observaron cambios significativos en ningún parámetro evaluado en el grupo DEP 10 µg/mL. Las células de la conjuntiva expuestas a las partículas diesel mostraron un aumento en la producción de especies activas del oxígeno y del nitrógeno, una depleción de las defensas antioxidantes no enzimáticas y un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes. Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo podría ser uno de los posibles mecanismos de daño en las células de la conjuntiva humana cuando son expuestas a estos contaminantes ambientales.

444. (100) LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A MODIFICA LA ABUNDANCIA DE TRANSCRIPTOS CON REGIONES 5'UTR ALTERNATIVAS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS α EN EL ÚTERO DE RATAS CON TERAPIA ESTROGÉNICA

Vigezzi, Lucía; Bosquiazzo, Verónica L.; Ramos, Jorge G.; Muñoz-De-Toro, Mónica M.; Luque, Enrique H.
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)-CONICET-Universidad Nacional del Litoral

Se sabe que compuestos con actividad estrogénica (xenoestrógenos) pueden interferir en la regulación de la transcripción del receptor de estrógenos α (RE α) en tejidos sensibles. Nuestro objetivo fue investigar el efecto de la exposición perinatal al xenoestrógeno Bisfenol A (BPA) sobre la expresión del RE α en el útero de ratas adultas con terapia hormonal de reemplazo con 17 β -estradiol (E2). Ratas preñadas (*Wistar*) fueron expuestas a través del agua de bebida al vehículo (control) o BPA (50µg/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 para incluirlos en parafina o conservarlos a -80°C. Por inmunohistoquímica se cuantificó la expresión del RE α en el estroma subepitelial del útero. Por RT-PCR en tiempo real se evaluó la expresión de: a) ARNm total del RE α y de sus transcritos con exones 5'UTR alternativos, originados por el uso de diferentes promotores (RE α -ON, -OS, -O, -OT y -E1) b) DNA metiltransferasas (Dnmt3a y 3b). En el estroma subepitelial se observó una disminución del RE α en BPA (control: 13,03±0,41 vs. BPA: 10,83±0,51; $p < 0,05$) que se correspondió con menor expresión del ARNm total. La expresión de los transcritos 5'UTR asociados a los promotores O y OT fue menor en las hembras expuestas a BPA (RE α -O: control 1 vs. BPA 0,69; RE α -OT: control 1 vs BPA 0,66; $p < 0,05$). La expresión de Dnmt3a y 3b fue mayor en el grupo de BPA (Dnmt3a: control 1 vs. BPA 2,32; Dnmt3b: control 1 vs. BPA 1,76; $p < 0,05$). Estos resultados demostraron que el BPA alteró la abundancia relativa de las variantes 5'UTRs del RE α

en el útero de ratas hembra tratadas con terapia estrogénica. La mayor expresión de las Dnmt observada en estos animales sugiere que el BPA podría interferir con los mecanismos de metilación del ADN en regiones regulatorias específicas del RE α alterando su expresión.

445. (101) LA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA A UN HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO PRODUCE HIPERPLASIA EPITELIAL Y ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN MORFOGENÉTICA DEL ÚTERO EN LA RATA

Guerrero Schimpf, Marilise Luciana; Milesi, María Mercedes; Ingaramo, Paola; Muñoz-De-Toro, Mónica; Luque, Enrique Hugo; Varayoud, Jorgelina
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)-CONICET-Universidad Nacional del Litoral

Hasta el momento, las consecuencias que produce la exposición postnatal temprana a herbicidas a base de glifosato (HBG) sobre el útero no han sido establecidas. En el presente trabajo investigamos el efecto agudo de un HBG sobre la diferenciación morfogénica del útero en el período postnatal temprano. Crías hembra de rata (*Wistar*) recibieron inyecciones sc cada 48 hs desde el día postnatal (DPN) 1 hasta el 7 con solución fisiológica (control, C) o con una formulación comercial a base de glifosato, 2 mg/kg/día de glifosato (HBG; definida como Dosis Segura). Transcurridas 24 hs de la última inyección (DPN8), los animales fueron sacrificados y se extrajeron biopsias de útero para inclusión en parafina. La histoarquitectura uterina se caracterizó mediante hematoxilina-eosina y el inmunofenotipo epitelial se determinó mediante inmunohistoquímica (IHQ) para marcadores de epitelio cilíndrico (citoqueratina 8; CK8) y de epitelio estratificado (CK-34bE12 y p63). Asimismo, se evaluó mediante IHQ la expresión del receptor de estrógeno α (RE α) y del marcador de proliferación celular Ki-67, en todos los compartimentos uterinos (epitelio luminal EL; estroma subepitelial ES y miometrio). El análisis histológico reveló que el 75% de los animales expuestos al HBG presentó hiperplasia epitelial, acompañada de un incremento en la expresión de Ki-67 (C: 28,3±1,3% vs HBG: 41,3±2,4%; $p < 0,01$). Dichas células presentaron inmunofenotipo de epitelio cilíndrico (CK8 positivas). Además se detectaron alteraciones en la diferenciación del ES, evidenciadas por un aumento en la expresión del RE α (C: 3,1±0,3 vs HBG: 5,3±0,8; $p < 0,05$) y de la proliferación celular (C: 5,3±0,4 vs HBG: 8,5±0,8; $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la exposición postnatal temprana a un HBG altera la diferenciación morfogénica y provoca hiperplasia uterina en la rata, sin afectar el fenotipo epitelial. Estas modificaciones podrían provocar consecuencias en la funcionalidad uterina y predisponer al desarrollo tumoral.

446. (164) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A XENOESTRÓGENOS SOBRE EL DESARROLLO DE LESIONES MAMARIAS EN ANIMALES DE MEDIANA EDAD BAJO TERAPIA ESTROGÉNICA.

Delconte, Melisa Belén; Gómez, Ayelén L.; Altamirano, Gabriela A.; Luque, Enrique H.; Muñoz-De-Toro, Mónica; Kass, Laura
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)-CONICET-UNL- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Evidencias epidemiológicas vinculan la terapia hormonal de reemplazo (THR) con el aumento del riesgo de desarrollar lesiones mamarias, principalmente cuando se utiliza una terapia combinada de estrógenos y progesterona. Sin embargo, los efectos resultantes de la asociación THR y exposición a xenoestrógenos durante períodos críticos del desarrollo han sido poco estudiados. Nos propusimos evaluar en animales de mediana edad, expuestos perinatalmente a los xenoestrógenos bisfenol A (BPA) y dietilstilbestrol (DES), los cambios producidos en la glándula mamaria (GM) luego de una THR con estradiol (E2). Ratas *Wistar* preñadas (F0) fueron expuestas por vía oral a BPA (0.5 y 50 µg/kg/día) o DES (5 µg/kg/día) o vehículo (control) desde el día 9 de preñez hasta el destete. Para evaluar la respuesta mamaria a la THR, crías (F1)

de 12 meses edad fueron ovariectomizadas y tratadas con E2 durante 3 meses. Se obtuvieron muestras de GM, se analizó la histología mamaria y se cuantificó el índice de proliferación celular y la expresión de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP). En el grupo control bajo THR con E2 se observó dilatación de conductos y alveolos mamarios, el desarrollo de estructuras lóbulo-alveolares y la presencia de quistes. Los quistes presentaron una mayor proliferación celular y una menor expresión de los RE y RP que los conductos normales. La exposición perinatal a DES seguida de la THR con E2 indujo una mayor presencia de quistes en la GM; no habiendo diferencias en la expresión de RE y RP con los animales controles. La exposición perinatal a BPA no modificó los efectos generados por la THR con E2. En las condiciones experimentales utilizadas, 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.

447. (197) EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES INDUCIDA POR LA TOXICIDAD AGUDA DEL FE Y CU EN CEREBRO.

Ferrarotti, Nidia Fátima¹; Musacco-Sebio, Rosario^{2,5}; Saporito-Magriñá, Christian^{2,5}; Castro-Parodi, Mauricio^{3,5}; Damiano, Alicia^{3,5}; Fuda, Julián^{4,5}; Torti, Horacio^{4,5}; Boveris, Alberto⁵; Repetto, Marisa G^{2,5}
Cátedra de Microbiología Clínica, Depto. de Bioquímica Clínica¹ Cátedra de Química General e Inorgánica, Depto. de Química Analítica y Fisicoquímica (IBIMOL)² Cátedra de Biología Celular, Depto. de Ciencias Biológicas³ Cátedra de Física, Depto. de Fisicomatemática⁴ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.⁵

El estrés y daño oxidativo en cerebro por toxicidad aguda con hierro (Fe) y cobre (Cu) involucran la oxidación de grupos tioles y pérdida de la homeostasis redox intracelular. Las enzimas superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en el estrés oxidativo inducido por Fe y Cu responden con aumento de la actividad de SOD y CAT y disminución de GPx. El objetivo de este trabajo fue evaluar si los cambios en la actividad se relacionan con la expresión enzimática, si dependen de la concentración del metal en el cerebro y del tiempo de exposición. Ratas macho Sprague-Dawley (200 g) recibieron (ip) 10 mg/kg FeCl₂ (n=9) ó 5 mg/kg CuSO₄ (n=9) y se sacrificaron a diferentes tiempos (0, 6, 16, 24 y 48 h). En un segundo experimento, recibieron diferentes dosis (0-30 mg/Kg) de ambos metales. Se evaluó en ambos casos la actividad (espectrofotometría) y expresión (Western blot) de Cu,Zn-SOD, CAT y GPx con respecto a ratas control (NaCl 0,9% P/V, ip, n=6), el tiempo (t_{1/2}) y la concentración necesarios para producir el 50% del efecto máximo (C_{50%}). Se observó un aumento significativo del 45% de la concentración de Fe (10 mg/kg) y Cu (5 mg/kg) a las 16 h (C: 43±1 µgFe/g y 5,2±0,5 µgCu/g, p<0,05). La actividad de SOD aumentó 17 veces con Fe (t_{1/2}=10, C_{50%} 49) y 90% con Cu (t_{1/2}=12, C_{50%} 20) (C:339±36 U/g, p<0,01) y CAT 3 veces con Fe (t_{1/2}=8, C_{50%} 40) y 89% con Cu (t_{1/2}=10, C_{50%} 10) en esas condiciones (C:14±5 nmol/g, p<0,01), con incrementos del 100% y 60% de la expresión de SOD (t_{1/2} Fe y Cu=12, C_{50%} 60 (Fe) y 40 (Cu)) y 158% y 60% de CAT con Fe (t_{1/2}=3, C_{50%} 50) y Cu (t_{1/2}=13, C_{50%} 25). La actividad y expresión de GPx-4 disminuyeron 70% con Fe (t_{1/2}=8 y 2, C_{50%} 30 y 50) y 30% con Cu (t_{1/2} Fe y Cu=4, C_{50%} 10 y 15) (C: 3,0±0,2 nmol/g, p<0,01). La protección antioxidante en cerebro en la toxicidad aguda con Fe y Cu parece estar relacionada con aumentos en la expresión génica de SOD y CAT y el daño oxidativo por la acumulación de hidroperóxidos.

448. (199) TOXICIDAD DEL COBRE: CAMBIOS EN EL COMPORTAMIENTO DE RATAS Y DAÑO OXIDATIVO EN CORTEZA, HIPOCAMPO Y CUERPO ESTRIADO

Saporito Magriñá, Christian^{1,2,5}; Ferrarotti, Nidia^{3,5}; Musacco-Sebio, Rosario^{1,2,5}; Semprine, Jimena^{1,2,5}; Gorzalczy, Susana^{4,5}; Boveris, Alberto^{2,5}; Repetto, Marisa G^{1,2,5}
Cátedra de Química General e Inorgánica¹ Dpto. Química Analítica y Fisicoquímica (IBIMOL)² Cátedra de Microbiolo-

gía Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica³ Cátedra de Farmacología⁴ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁵

El daño neuronal por sobrecarga de Cu involucra múltiples procesos químicos simultáneos que implican reacciones de oxidación mediadas por radicales libres. Estudios previos indicaron que en la sobrecarga experimental aguda el Cu se acumula en cerebro a las 16 h del tratamiento (3,7% de la dosis). El objetivo de este trabajo fue evaluar si el Cu genera daño oxidativo en las diferentes áreas del cerebro y si ese daño correlaciona con cambios de comportamiento de las ratas. Ratas macho Sprague-Dawley (200 g) recibieron (ip) 3,5 mg/kg CuSO₄ (n=4). Se analizaron, mediante las pruebas de open field (durante 5 min) y rota-road (durante 2 min), los cambios de comportamiento en las ratas tratadas respecto a ratas control (NaCl 0,9% P/V, ip, n=6) a diferentes tiempos (0, 16, 24 y 48 h). Se evaluaron la oxidación de fosfolípidos (TBARS) y proteínas (CO) en corteza, hipocampo y cuerpo estriado a las 48 h. Se observaron diferencias significativas (p<0,01) en algunos de los parámetros de comportamiento evaluados mediante open field: número de defecaciones (D), frecuencia olfatoria (FO), de estiramiento (E), de postura erecta contra la pared (PE), locomoción (L), aseo (A) y número de pausas (P). A partir de las 16 h se observó una disminución del 72% de PE, y 53% de L; a partir de las 24 h, 100% de D y A y 45% de E; y un aumento mayor al 100% de la frecuencia de las pausas cada vez más prolongadas con el tiempo de exposición. Con respecto a la oxidación de biomoléculas se observó un aumento del 62% de TBARS (p<0,01) y del 25% de CO (p<0,05) solamente en corteza cerebral a las 48 h. Estos resultados indican que la acumulación de Cu en cerebro reduce la actividad motora y la respuesta emocional con cambios en la conducta asociados a pérdida del instinto exploratorio (L, PE), curiosidad por lo nuevo (PE, FO), y evaluación de riesgo (E). El daño oxidativo a los fosfolípidos y proteínas de la corteza afectaría las funciones motoras y cognitivas controladas por esta área del cerebro.

449. (228) ESTUDIO DE LA TOXICIDAD EN LARVAS DE ZEBRAFISH DE NANOPARTÍCULAS DE SILICIO CON POTENCIALES APLICACIONES EN TERAPIA RADIANTE CONTRA CÁNCER

Calienni, M. Natalia^{1,2}; Lillo, Cristian³; Martinetti Montanari, Jorge^{1,2}; Prieto, M. Jimena^{1,2}; González, Mónica C.³; Alonso, Silvia Del V.^{1,2}

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes¹ Grupo de Biología Estructural y Biotecnología (GBEYB), IMBICE-CONICET² Laboratorio de Cinética y Fotoquímica, INIFTA-CONICET, Universidad Nacional de La Plata³

La determinación de toxicidad de nuevos nanocompuestos con finalidad terapéutica es fundamental para que estos lleguen a pruebas clínicas y para su futura aplicación en humanos. Por otra parte, un modelo cada vez más utilizado para estudiar nanotoxicidad *in vivo* es el *zebrafish* por sus múltiples ventajas de tiempos, costos, elevada homología genética con el humano, transparencia de las larvas y gran número de crías. Se determinó la toxicidad de nanopartículas de silicio (NP-Si) en larvas de entre 4 y 7 días post-fecundación de *zebrafish* (Dictamen CE-UNQ N°2/2014). La finalidad de las NP-Si es ser utilizadas como fotosensibilizadores en terapia radiante contra el cáncer. Las mismas fueron sintetizadas por un método *bottom-up* y luego derivatizadas con alilamina obteniendo nanopartículas con grupos amino superficiales (NP-SiNH₂). Finalmente las NP-SiNH₂ fueron conjugadas con ácido fólico (NP-SiFol) y PEG-COOH (NP-SiPEG) por formación de enlaces tipo amida. La modificación superficial con PEG tiene como finalidad mejorar la biocompatibilidad del sistema, mientras que se intenta usar al ácido fólico para dirigir selectivamente las nanopartículas hacia células tumorales. Se determinó la dosis letal 50 (DL₅₀) para NP-SiNH₂ en larvas a 72 horas post-incubación (hpi), usando como criterio de mortalidad la ausencia de latido cardíaco. Se estudió el efecto morfológico y zoométrico en larvas de 72 hpi, además de neurotoxicidad

mediante la determinación de la actividad de nado por medio de un método automatizado entre las 4 y 72 hpi. Se estudiaron los mismos aspectos en larvas incubadas con NP-SiFol y NP-SiPEG, a una concentración igual a la DL_{50} de NP-SiNH₂. Se observó que los derivados NP-SiFol y NP-SiPEG son menos tóxicos que la NP-SiNH₂. La tasa de mortalidad para ambos resultó ser menor y no se observaron cambios morfológicos significativos con respecto al control, a diferencia de NP-SiNH₂. Se observó un cambio en las medidas corporales sólo para NP-SiNH₂.

450. (229) EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DEL OXÍGENO EN EL SISTEMA CARDIORESPIRATORIO LUEGO DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON NIQUEL

Magnani, Natalia¹; Marchini, Timoteo¹; Vanasco, Virginia¹; Cáceres, Lourdes¹; Mebert, Andrea²; Desimone, Martín²; Díaz, Luis²; Álvarez, Silvia¹; Evelson, Pablo¹
Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET, Cátedra de Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Cátedra de Química Analítica Instrumental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²

Los metales de transición presentes en el material particulado (MP) juegan un rol importante en los mecanismos de daño producidos por exposición a contaminantes atmosféricos. Entre ellos, el Níquel (Ni) es predominante en partículas provenientes de procesos industriales y la combustión. El objetivo del trabajo fue estudiar la fisiopatología cardiopulmonar luego de una exposición aguda a nanopartículas (NP) recubiertas con Ni. Las NP fueron construidas por el método de Stöber. Ratones Swiss fueron expuestos a las Ni-NP (0,01; 0,05; 0,1 and 1,0 mg Ni/kg peso corporal) por instilación intranasal. Se tomaron muestras de pulmón, plasma y corazón 1 hora luego del tratamiento. Se evaluó consumo de O₂ tisular, actividad de NADPH oxidasa (Nox), niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) y daño a lípidos medido por contenido de TBARS. Las NP construidas presentan características similares a las del MP. El consumo de O₂ tisular en pulmón presentó incrementos en todas las dosis de Ni administradas (60%; $p < 0,0001$), como también la actividad de Nox (40%; $p < 0,001$) y el contenido de TBARS (40%; $p < 0,001$). Sólo la dosis más alta de Ni disminuyó la relación GSH/GSSG. El contenido de TBARS plasmático aumentó en el grupo expuesto a la dosis más alta de Ni. En corazón se observó una disminución en el consumo de O₂ tisular en todas las dosis de Ni (30%; $p < 0,001$), sin presentar cambios en el contenido de TBARS. Los cambios observados luego de la exposición a Ni fueron revertidos por el pretratamiento con gp91ds-tat, un inhibidor específico de la Nox. La exposición a Ni muestra alteraciones en el metabolismo oxidativo cardiopulmonar, donde la Nox es una fuente importante de producción de especies activas del O₂. Los resultados contribuyen a entender los mecanismos fisiopatológicos del sistema cardiopulmonar luego de la exposición a metales de transición presentes en el MP, donde el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios juegan un rol importante.

451. (261) EXPOSICIÓN CRÓNICA A LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL AÉREA DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES (CAA-BA) Y SU EFECTO BIOLÓGICO SOBRE LAS MUCOSAS RESPIRATORIA Y OCULAR

Maglione, Guillermo A¹; Orona, Nadia S¹; Astort, Francisco¹; Mandalunis, Patricia M²; Berra, Alejandro³; Tasat, Deborah R^{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

Epidemiológicamente la contaminación ambiental aérea de las megaciudades se asocia a enfermedades respiratorias (EPOC,

Asma, bronquitis, etc.) y a cambios en la superficie ocular (tiempo de ruptura lagrimal, enrojecimiento e irritación de la conjuntiva, etc.) Objetivo: Estudiar el efecto crónico de la Contaminación Aérea de Buenos Aires (CAA-BA) sobre las mucosas pulmonar y ocular murinas. Materiales y Métodos: Ratones BALB/c de 4 semanas de edad se expusieron a CAA-BA o aire filtrado (Control) durante 1, 6, 9 y 12 meses (n=8-10 por tiempo y por tratamiento). El peso corporal se registró en ambos grupos a través del tiempo. Los animales se sacrificaron y se analizaron en el lavado broncoalveolar (LBA): número de células totales (NCT), recuento diferencial (RD) y generación de anión superóxido (O₂⁻). En la superficie ocular mediante secciones histológicas (5-7µm) del globo ocular, previamente coloreadas con H&E y PAS, se realizó análisis histomorfométrico del espesor de la córnea y la densidad de células calcificadas en las conjuntivas tarsal y bulbar. Resultados: CAA-BA provocó disminución en el peso de los animales a partir de los 6 meses post-exposición. A nivel pulmonar, indujo a los 6 y 9 meses post-exposición en el LBA inflamación evidenciada por un mayor NCT ($p < 0,05$) con aumento de células polimorfonucleares ($p < 0,05$) e incremento en la generación de O₂⁻ a través del tiempo ($p < 0,05$). A nivel ocular, CAA-BA generó una respuesta de tipo adaptativa. Incrementó el número de células calcificadas a tiempos cortos de exposición (1 mes; $p < 0,05$) mientras que, por el contrario, luego de períodos de exposición prolongados (12 meses) indujo una reducción en su número con respecto a los controles ($p < 0,05$). Conclusión: La exposición crónica a CAA-BA, en niveles equivalentes a la real, se expresa con una respuesta inflamatoria que altera la morfología de las mucosas murinas pudiendo reflejar el estado pulmonar y ocular de los habitantes de Buenos Aires.

452. (302) EMULSIONES NUTRICÉUTICAS TRANSPORTADORA DE RISPERIDONA: CITOTOXICIDAD Y ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS EN ZEBRAFISH

Igartúa, Daniela; Calienni, Natalia; Chiaramoni, Nadia; Alonso, Silvia Del Valle; Prieto, Jimena
Laboratorio de Biomembranas, Universidad Nacional de Quilmes; Grupo de Biología Estructural y Biotecnología (GBEyB)-IMBICE-CONICET

La risperidona (RISP) es el antipsicótico atípico más ampliamente utilizado en los trastornos del espectro autista (prevalencia de 1 en 150 individuos). Es una molécula hidrofóbica y presenta baja biodisponibilidad luego de su administración oral. Asimismo, tiene muchos efectos secundarios causados por el metabolismo hepático. Se ha observado que la co-administración de RISP con los ácidos grasos ω3 y ω6 inhibe la reacción metabólica por lo cual produce un efecto sinérgico de las drogas antidepressivas y aumenta la quimiopreservación de las mismas. Adicionalmente, se ha demostrado que las emulsiones aceite/agua (O/W) incrementan la absorción gastrointestinal de los fármacos administrados por vía oral, protegen la droga del stress ambiental y reducen su toxicidad. Nuestro objetivo fue obtener y caracterizar un sistema que pueda incorporarse fácilmente a protocolos clínicos, basado en emulsiones O/W enriquecidas en ω3 y ω6 capaces de encapsular RISP. Estos sistemas, llamados emulsiones nutricéuticas (ENC), mejorarían la biodisponibilidad y reducirían los efectos secundarios. Se evaluaron 36 formulaciones utilizando aceite de hígado de bacalao, aceite de canola, vitamina E, tween 80, propilenglicol (PPG), lecitina de soja (LS) y agua. Posteriormente, las ENC se caracterizaron por tamaño de partícula, estabilidad en el tiempo, organización de la interfase aceite-agua, potencial zeta y perfil de liberación. Se seleccionó la ENC con las mejores características para actuar como un sistema de *delivery* y se testeó su toxicidad en cultivo de células Caco-2 y en animal entero *zebrafish*. Las formulaciones desarrolladas son inocuas en cultivo celular en concentraciones menores a 0,0025 mg/ml; mientras que en el modelo de *zebrafish*, la concentración inocua es menor a 0,000625 mg/ml. El tween 80 presentó efectos tóxicos en las larvas, lo que explicaría la drástica disminución de la concentración tolerable en el modelo animal.

453. (310) DESARROLLO DE EMULSIONES NUTRICÉUTICAS CON VPA Y ESTUDIO DEL EFECTO ANTICONVULSIVANTE EN MODELO EPILÉPTICO DE ZEBRAFISH

Feas, Daniela Agustina; Igartúa, Daniela; Del Valle Alonso, Silvia; Prieto, Jimena
Laboratorio de Biomembranas, Universidad Nacional de Quilmes, Grupo de Biología Estructural y Biotecnología (GBEyB)-IMBICE-CONICET

La epilepsia es una enfermedad crónica caracterizada por uno o varios trastornos neurológicos que genera convulsiones recurrentes y suele dar lugar a consecuencias neurobiológicas, cognitivas y psicológicas. El tratamiento actual de esta enfermedad involucra el ácido valproico (VPA), el cual es utilizado como droga antiepiléptica. Sin embargo, en estudios previos se reportó que esta droga induce deficiencias cognitivas y además, es un severo agente teratogénico. Por otro lado, se ha demostrado que un suplemento dietario rico en ácidos grasos esenciales (omega-3 y omega-6) junto con la administración de drogas anticonvulsivantes en pacientes epilépticos disminuye significativamente la frecuencia de convulsiones. En el presente trabajo se desarrollaron emulsiones nutricéuticas, ricas en omega-3 y omega-6, combinadas con la droga anticonvulsivante VPA, con el fin de generar un efecto sinérgico, disminuyendo la dosis de droga a administrar y con ella los efectos adversos de la misma. Para estudiar el efecto antiepiléptico de emulsiones nutricéuticas con VPA, se desarrolló un modelo epiléptico con larvas de zebrafish inducido por las drogas convulsivantes pentilentetrazol (PTZ) (2,5 mM), y Tujona (0,625 mM). A continuación, se estudió el efecto de diferentes drogas antiepilépticas (Carbamazepina, Lamotrigina, Fenitoína, Fenobarbital y Levetiracetam), en particular VPA. Por último, se desarrollaron las emulsiones nutricéuticas con VPA y se estudió su efecto antiepiléptico en comparación con la droga comercial. Los cuadros epileptiformes se estudiaron mediante patrones de movilidad y coordinación de nado, para lo cual se utilizó un método automatizado para determinar movimiento espontáneo de los peces tratados. Se determinó que el VPA (100 μ M) disminuye significativamente los cuadros epileptiformes y tiene un mayor efecto en comparación con las demás drogas comerciales, además, se observó que los ácidos grasos modifican el efecto farmacológico del VPA.

454. (312) DETECCIÓN DE FE CATALÍTICAMENTE ACTIVO EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

Robello, Elizabeth; Galatro, Andrea; Puntarulo, Susana
Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET

El Fe es esencial en el cerebro para realizar numerosas funciones como la división celular, la síntesis de mielina y neurotransmisores, y además su acumulación se ha asociado al daño oxidativo medido en la enfermedad de Alzheimer. El "pool" de iones de Fe catalíticamente activos, conocido como "labile iron pool" (LIP), constituye un depósito de Fe débilmente unido a una población altamente heterogénea de compuestos orgánicos y se encuentra disponible para catalizar reacciones redox en los sistemas biológicos. Las técnicas reconocidas para determinar el LIP son la Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) y la Fluorimetría empleando calceína (CA) como sonda. En ambos casos, se determina el contenido de Fe sin discriminar la especie a la cual el Fe se encuentre unido. El objetivo del presente trabajo fue analizar comparativamente la capacidad de ambas técnicas para detectar complejos naturales y sintéticos de Fe, que forman parte de la composición cualitativa del LIP *in vivo*. Se utilizaron concentraciones fisiológicas (10 μ M) de los siguientes complejos de Fe: Fe-citrato (1:2), Fe-ATP (1:20), Fe-EDTA (1:2), Fe-histidina (1:5), mononitrosilos (monoNICs), dinitrosilos (diNICs) y una solución estándar de Fe²⁺ quelado a la solución reguladora (control). Los espectros de EPR para Fe 10 μ M son detectables y coincidentes para todos los complejos empleados. El uso de la técnica fluorométrica con CA, permitió la cuantificación de Fe (10 \pm 2 μ M) en todos los casos, excepto cuando se emplearon monoNICs (1,1 \pm 0,9 μ M). Estos resultados avalan experimentalmente el concepto de la definición operacional del LIP, ya que ambos ensayos se basan en la capacidad de la deferoxamina de desplazar al quelante de Fe, ya un complejante fisiológicos (EPR) o

a la CA (fluorométrica). Situaciones fisiológicas o patológicas que modifiquen la composición del LIP celular requerirán el empleo simultáneo de ambas técnicas para describir adecuadamente el efecto estudiado.

NEUROCIENCIAS 3

455. (604) BENEFICIOS CONDUCTUALES Y BIOQUÍMICOS DE LA FLUOXETINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO: EVALUACIÓN DE DISTINTAS VENTANAS TEMPORALES DE TRATAMIENTO

Codagnone, Martín; Uccelli, Nonthué Alejandra; Podestá, María Fernanda; Traetta, Mariana Evelyn; Reinés, Analía
Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. E. De Robertis (IBCN)-UBA-CONICET; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

La ausencia de un tratamiento farmacológico que actúe sobre los síntomas nucleares de los trastornos del espectro autista (TEA) motiva la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. El estudio del autismo utilizando el modelo animal por exposición prenatal al ácido valproico (VPA) revalida su clasificación como sinaptopatía y hace foco en el desbalance NCAM/PSA-NCAM de la conexión mPFC-Hipocampo. Dado que su blanco de acción es la sinapsis, se ha sugerido a la Fluoxetina (F) como fármaco candidato. En este trabajo nos proponemos evaluar los efectos de distintos esquemas de tratamiento con F sobre los parámetros conductuales y bioquímicos del modelo VPA. Los animales VPA y control (C) recibieron diariamente F (10mg/kg; s.c.) o solución fisiológica (S) durante 15 días consecutivos (CS, CF, VPAS y VPAF), en dos esquemas de tratamiento: entre los días postnatales (DPN) 16-30 y entre DPN 23-37. El tratamiento temprano, corrigió los comportamientos repetitivos y el déficit en la actividad exploratoria de los VPA sin modificar su hiperlocomoción. Sin embargo, este tratamiento disminuyó las interacciones sociales de juego tanto en los VPA como en los C a pesar de haber aumentado selectivamente en los VPA el número de solicitudes de juego. En cuanto a las actividades sociales que no involucran conductas de juego, la F incrementó tanto en C como en VPA la latencia al primero de estos contactos sin modificar su número. El tratamiento tardío fue similar al temprano tanto en la corrección del déficit exploratorio como en su efecto deletéreo sobre las interacciones sociales. Respecto de la alteración en la expresión de las moléculas de adhesión, las ventajas conductuales parciales del tratamiento temprano correlacionan con la corrección del desbalance NCAM/PSA-NCAM en mPFC sin modificar el del hipocampo. Nuestros resultados proveen herramientas para elaborar un enfoque terapéutico racional de TEA y reflexionar acerca del uso de F en etapas tempranas del desarrollo.

456. (629) LA DISMINUCIÓN MOTORA ASOCIADA A LA EDAD PUEDE SER RESTAURADA PARCIALMENTE MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA POR TERAPIA GÉNICA PARA IGF-I

Falomir Lockhart, Eugenia; Herenu, Claudia Beatriz; Bellini, María José
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INBIOLP)-CONICET-UNLP

En estudios previamente realizados por nuestro grupo hemos descrito que la terapia génica intracerebroventricular (ICV) para IGF-I induce un significativo aumento del desempeño motor en ratas seniles. Las células de la microglía son esenciales para asegurar la neuroprotección del sistema nervioso central, tanto en condiciones normales como patológicas. Estas células representan una fuente importante de factores neurotróficos y se ha descrito que la capacidad neuroprotectora de las mismas disminuye con el envejecimiento cerebral. Numerosos trabajos demuestran que el IGF-I estimula la proliferación de la microglía. Nosotros proponemos que el efecto restaurador del IGF-I sobre las habilidades motoras podría estar mediado por células gliales. En el presente

trabajo utilizamos terapia génica ICV para IGF-I en ratas seniles (28 meses) y evaluamos el desempeño motor previo a la cirugía y 17 días después de la misma. Se evaluó la inmunorreactividad glial en núcleo estriado empleando anticuerpos anti-Iba-1 y anti-GFAP. Resultados: como se ha reportado previamente, el IGF-I restauró la coordinación motora y la fuerza de sujeción de las extremidades anteriores en ratas seniles (2). Se observó un incremento significativo de la inmunorreactividad microglial (Iba-1+) al menos hasta 17 días post-tratamiento con IGF-I (X_m -senil-IGF-I=8,370±0,3297 vs X_m -senil-DsRed= 5,557±0,2553; $p<0,0001$), mientras que no se encontraron diferencias significativas en astrocitos (GFAP+). Nuestros resultados evidencian una nueva función de la microglía en el mantenimiento del desempeño motor y plantean un enfoque original para revertir el desempeño motor y exploratorio asociado a la edad en ratas.

457. (650) UN ANÁLOGO DE LA HORMONA ALFA-MSH PROMUEVE LA ACTIVACIÓN ALTERNATIVA DE LA MICROGLÍA

Carniglia, Lila; Ramírez, Delia; Saba, Julieta; Durand, Daniela; Caruso, Carla; Lasaga, Mercedes
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-UBA-CONICET

La microglía constituye la población principal de células inmunocompetentes dentro del sistema nervioso central (SNC). Frente a un proceso de daño o infección estas células modifican su estado de activación de una manera dependiente del estímulo. La activación clásica (o M1) es inducida por estímulos pro-inflamatorios como el LPS y se caracteriza por un aumento en la producción de IL-1beta y TNF-alfa. Por otro lado, estímulos anti-inflamatorios como la IL-4, IL-13, IL-10 y el TGF-beta inducen un estado de activación alternativa (M2), que se caracteriza por un aumento en la expresión de IL-10 y TGF-beta y de proteínas inmunomoduladoras como PPAR-gamma y Arginasa-1 (AG1). La hormona alfa-MSH es un neuropéptido con propiedades anti-inflamatorias, ligando del receptor MC4. Hemos demostrado previamente que la microglía de rata en cultivo expresa el MC4R y que el análogo de alfa-MSH, NDP-MSH, induce la expresión de PPAR-gamma y estimula la liberación de IL-10 en este tipo celular. Dado que PPAR-gamma participa en la inducción del perfil M2 en macrófagos y que la IL-10 es una citocina típica de dicho perfil, estudiamos el efecto de NDP-MSH sobre la expresión de marcadores M1/M2 bajo la hipótesis de que NDP-MSH induce una polarización hacia M2 en la microglía. Luego de la incubación con NDP-MSH 100 nM por 24 hs. detectamos un aumento del 75% en la expresión génica de AG1 ($p<0,05$), una disminución de 26% en la expresión de TLR4 (receptor de LPS) ($p<0,05$) y una reducción del 35% en la expresión proteica del mediador pro-inflamatorio HMGB1 ($p<0,05$). Además, la pre-incubación por 24 hs. con NDP-MSH inhibió en un 36% la liberación de TNF-alfa inducida por LPS ($p<0,005$) así como la fagocitosis de microesferas estimulada por LPS. Concluimos que NDP-MSH promueve la diferenciación de la microglía hacia un perfil alternativo o M2. Estos resultados refuerzan el rol de la alfa-MSH endógena en la inducción y mantenimiento del microambiente inmunosupresor del SNC.

458. (679) EFECTO DE LA RE-EXPOSICIÓN A ANFETAMINA EN RATAS EN EDAD ADULTA LUEGO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A ANFETAMINA SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOLÍMBICO: DIFERENCIAS SEXUALES

Pennacchio, Gisela E.¹; Valdez, Susana R.^{1,2}; Soaje, Marta^{1,3}; Bregonzio, Claudia⁴
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo² Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo³ Instituto de Farmacología Experimental (IFEC)-CONICET. Departamento de Farmacología, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba⁴

Es conocido que la exposición prenatal a anfetamina (PEA) produce cambios a largo plazo que se evidencian en la edad

adultas en ratas de ambos sexos. Recientemente encontramos que PEA indujo en ratas hembra adultas una menor respuesta a los efectos estimulantes de anfetamina (ANF) junto con un incremento en la expresión del receptor dopaminérgico D2 (RD2) en núcleo accumbens (NAcc) mientras que los machos adultos PEA mostraron una mayor respuesta a ANF y no evidenciaron cambios en la expresión de RD2 en las áreas estudiadas. Objetivo: Estudiar las alteraciones inducidas por PEA en núcleo NAcc y cuerpo estriado (CE) en la expresión de los receptores dopaminérgicos D1 (RD1), D3 (RD3), DAT (transportador de dopamina) y de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en ratas machos y hembras. Metodología: se usaron ratas hembras (Wistar) tratadas con ANF 2,5 mg/kg ip del día 15 al 21 de preñez. Se controló el peso de las madres durante el tratamiento y de las crías. En la edad adulta, (60 días) los machos y las hembras (en el día del estro) expuestas prenatalmente a ANF, recibieron una re-exposición a 0.5 mg/kg ip de ANF y 60 min después fueron sacrificadas. Se obtuvieron los NAcc y CE para medir los niveles de expresión de los RD, DAT y TH por PCR en tiempo real. Los resultados se cuantificaron por el método comparativo de CT y la expresión del ARNm fue normalizada respecto al gen S16 (media±SEM; n: 6-8). Resultados: las hembras PEA mostraron un aumento significativo de la expresión de RD3 en NAcc, ($p<0,05$ vs SAL). En los machos se encontró una disminución en la expresión de RD1 ($p<0,05$ vs SAL) y RD3 ($p<0,05$ vs SAL) en CE. No se observaron cambios significativos en la expresión de TH en ambos sexos. Conclusión: la experiencia prenatal con ANF afecta en forma diferencial y duradera la expresión de los receptores dopaminérgicos en NAcc y CE. Estos cambios podrían explicar las diferencias sexuales relacionadas con la vulnerabilidad al desarrollo de adicción.

459. (720) LAS VARIACIONES HORMONALES ESTEROIDEAS MODIFICAN LA NEURO-SULFATACIÓN HIPOTALÁMICA

Bazzocchini, Vanesa S.; Giuliani, Fernando A.; Yunes, Roberto; Cabrera, Ricardo J
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), Universidad de Mendoza, Instituto de Medicina y Biología Experimental (IMBECU)-CONICET

La neuroesteroidogénesis hipotalámica incluye la sulfatación de algunos neuroesteroides. Es un mecanismo muy sensible a variaciones hormonales sexuales como el ciclo estral o la administración exógena de estrógeno (E) y/o progesterona (P). En nuestro laboratorio hemos demostrado cómo los diferentes perfiles hormonales sexuales y la sulfatación hipotalámica en la rata hembra inducen cambios neuroendócrinos y comportamentales. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad de la enzima estrógeno sulfotransferasa (EST) hipotalámica en función del ciclo estral y posterior a la administración de E y P así como por la administración intracerebroventricular (icv) de un inhibidor de la sulfatación endógena, COUMATE (C). Se utilizaron ratas hembras adultas Sprague-Dawley que se dividieron en 7 grupos: ratas ciclantes seleccionadas en diestro 1 (D1) o proestro (PE); ratas ovariectomizadas (OVX); OVX impregnadas con E (OVX E) y/o P (OVX P)(OVX EP); y otro grupo OVX EP a las que se les inyectó C 1µM (OVX EP C). Los animales fueron sacrificados y los hipotálamos fueron utilizados para la medición de la actividad de EST mediante radioensayos. Los resultados se expresan como la media ± SEM en pmol/mg prot/h y analizados estadísticamente por test de "t" o por ANOVA I, seguido de Newman Keuls. No se observaron diferencias significativas entre PE y D1, sin embargo cuando comparamos los diferentes perfiles exógenos, se observaron los siguientes resultados: OVX (0,122±0,019) vs OVX E (0,062±0,012)* $p<0,01$; OVX vs OVX P (0,045±0,012)* $p<0,001$; OVX vs OVX EP (0,032±0,007)* $p<0,001$; OVX vs OVX EPC (0,0027±0,0005)* $p<0,001$. Concluimos que las modificaciones hormonales inducidas por la ovariectomía producen modificaciones en la sulfatación hipotalámica, la cual es compensada con la administración exógena de hormonas sexuales. Así mismo demostramos que la sulfatación endógena es un mecanismo modulador neuroendócrino asociado a la reproducción en la rata hembra.

460. (738) HISTORIA DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS AGRÍCOLAS Y RIESGO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN LAS PROVINCIAS DE BUENOS AIRES, ENTRE RÍOS Y SANTA FE

Dos Santos, Leandro; Incahuanaco, Liberth; Oliveira Da Silva Pacheco, Sandaly; Pacheco, Fabio Juliano
Universidad Adventista del Plata - Centro de Investigación

Introducción: La enfermedad de Parkinson es el segundo trastorno neurodegenerativo más prevalente y afecta a 1% de la población mundial, especialmente a los mayores de 65 años. En su etiología multifactorial están implicados elementos ambientales, susceptibilidad genética y componentes del estilo de vida. Investigaciones han mostrado que los agroquímicos podrían incrementar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson. Objetivo: Evaluar la historia de exposición a plaguicidas agrícolas de pacientes con la enfermedad de Parkinson. Materiales y métodos: Los pacientes fueron entrevistados para conocer el estilo de vida, historia de actividad laboral, exposición a plaguicidas, antecedentes familiares de Parkinson y datos socio demográficos. Participaron del estudio un total de 182 pacientes siendo 61 con enfermedad de Parkinson y 121 controles de las ciudades de Buenos Aires, Paraná, Libertador San Martín, Concepción del Uruguay y Santa Fe. Resultados: De los 182 participantes, 128 (70,33%) son mayores de 60 años, 86 (47,25%) son masculinos, 61 (33,51%) presentan Parkinson, de los cuales 9 (4,94%) ejercieron actividad laboral de riesgo, 26 (14,28%) vivieron en zona rural, 19 (10,43%) vivieron en zonas que utilizaban plaguicidas, 60 (32,97%) tuvieron contacto alguna vez con pesticidas, 15 (8,24%) tuvieron contacto con tóxicos o solventes y 43 (23,62%) consumió alguna vez agua de pozo. Así también se encontró que 52 (85,23%) consumió mate más de una vez por la semana ($p=0,018$) y 61 (33,51%) consumió carne más de una vez por la semana ($p=0,001$). Conclusión: No se encontró diferencia estadística en ambos grupos con relación a la exposición a plaguicidas agrícolas, pero sí se encontró asociación estadísticamente significativa en cuanto al consumo de mate y carnes rojas para la enfermedad de Parkinson.

461. (748) LA INJURIA OXIDATIVA INDUCIDA POR HIERRO DISPARA LA INCORPORACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO AL POOL DE TRIGLICÉRIDOS EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS

Sánchez Campos, Sofía; Oresti, Martín; Salvador, Gabriela
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET-UNS

La acumulación de hierro (Fe) en la sustancia nigra de los pacientes con enfermedad de Parkinson es considerada uno de los factores desencadenantes de la pérdida de neuronas dopaminérgicas debido a su capacidad de inducir estrés oxidativo. En este trabajo, nuestro objetivo fue el estudio de los mecanismos de incorporación de ácidos grasos en fosfolípidos y triglicéridos (TG) utilizando la línea celular dopaminérgica N27 expuesta a injuria oxidativa inducida por Fe. La incubación de las neuronas dopaminérgicas con Fe, como sulfato ferroso (1mM) por 24 hs, provocó un aumento significativo en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la generación de peróxidos lipídicos. Asimismo, el daño oxidativo provocó un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática (medida a través de la liberación de la LDH al medio) y una disminución del 20% en la viabilidad celular. En estas condiciones, detectamos una incrementada incorporación de ácido araquidónico en la fracción de TG con respecto a la condición control, así como un incremento de los niveles de TG totales. Este aumento en los TG, se correlacionó con la formación de gotas lipídicas, detectadas por la tinción con rojo Nilo. En concordancia con esta acumulación neuronal de TG, detectamos un aumento en los niveles de ARN mensajero de PLIN 2 (marcador de gotas lipídicas). La inhibición de los procesos de acilación lipídica utilizando CI-976, provocó un incremento en la generación de ROS acompañado de un aumento en la liberación de LDH y de los peróxidos lipídicos. Nuestros resultados sugieren que la acumulación de ácido araquidónico en los TG actuaría como un mecanismo protector en las neuronas dopaminérgicas expuestas a insulto oxidativo.

462. (761) ACCIÓN NEUROPROTECTORA DE LIGANDOS DE IMMUNOFILINAS

*Daneri Becerra, Cristina Del Rosario*¹; Galigniana, Mario Daniel^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²

Las inmunofilinas (IMMs) son proteínas solubles que unen ciclosporina A (CsA) (CyPs) o FK506 (FKBPs). El tejido nervioso expresa ~10-50 veces más IMMs que el resto, siendo su rol biológico poco conocido. Previamente demostramos que CyPA y FKBP51 son IMMs con acción antiapoptótica, y que FK506 promueve la neurodiferenciación en líneas celulares, cultivos primarios, y en modelos murinos de daño de médula espinal. Postulamos que las IMMs podrían ser protectoras del tejido cerebral. Aislamos el área pre-frontal de cerebro de ratones macho BALB/C y realizamos cultivos organotípicos 3D con cortes de ~300 µm en medio semisólido. Luego de la normalización de las actividades de LDH, TGO, CPK en el medio de cultivo, los tejidos fueron preincubados durante 1 h con 1 µM CsA ó 1 µM FK506, para ser luego incubados con 500 µM H₂O₂ sin lavar la droga del medio (ensayos de protección). Alternativamente, se invirtió el orden de incubación estimulándose al tejido con peróxido y luego con las drogas (ensayos de reversión). Los tratamientos con H₂O₂ indujeron la expresión de Hsp90, Hsp70 y p23, lo que se vio atenuado por preincubación con ambos ligandos de las IMMs. La expresión de la IMM antiapoptótica CyPA se vio específicamente inducida por CsA. A su vez, FKBP51 se resolvió en 2-3 bandas, siendo las superiores eliminadas por tratamientos con fosfatasa alcalina. Ello sugiere que son formas fosforiladas de FKBP51 (P-51). Esas bandas de P-51 se ven preservadas por FK506 a expensas de las no fosforiladas, sugiriendo que la droga favorecería la fosforilación de FKBP51. El estrés oxidativo abolió la banda de P-51, mientras que los experimentos de reversión con FK506 mostraron su protección contra el estrés oxidativo. Estos resultados nos sugieren que FK506 podría ejercer su efecto neuroprotector modulando las formas fosforiladas de FKBP51, IMM con propiedades antiapoptóticas, y que CsA lo haría por inducción de CyPA.

463. (783) ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL CUERPO CALLOSO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO: ALTERACIONES EN LA CONECTIVIDAD Y EN EL DESARROLLO DE TRACTOS AXONALES

Uccelli, Nonthué A; Codagnone, Martín; Reinés, Analía
Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E De Robertis" (IBCN)-CONICET-UBA; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Los desórdenes del espectro autista (ASD) se caracterizan por alteraciones funcionales en las redes neuronales. Estudios realizados en pacientes ASD se han focalizado en el cuerpo calloso (CC) para poner a prueba la hipótesis de la hipoconectividad interhemisférica. Evidencias de una reducción del tamaño del CC en los ASD y alteraciones funcionales regionales apoyan esta hipótesis. Sin embargo, aún se desconocen las bases celulares y moleculares que subyacen a los cambios de conectividad en el CC. Previamente reportamos una reducción hipocampal de la forma polisialilada de la molécula de adhesión celular neuronal (PSA-NCAM) en el modelo experimental de ASD por administración prenatal de ácido valproico (VPA). Llamativamente, se ha descrito que la polisialilación incompleta de NCAM puede alterar las conexiones del CC durante el desarrollo. En este trabajo nos propusimos estudiar moléculas relacionadas al estado estructural y adhesivo de las fibras del CC en las ratas VPA. Mediante inmunohistoquímica se evaluó a día postnatal 35 el patrón y nivel de expresión de la subunidad pesada de los neurofilamentos (NF200), de NCAM y de PSA-NCAM. Los animales VPA evidenciaron en el CC diferencias regionales en el patrón de expresión de NF200 y en la organización celular evaluada mediante la tinción de Nissl. Observamos también en el CC una alteración en el patrón de ex-

presión de NF200 compatible con un engrosamiento axonal que se acompañó de un incremento en la inmunomarcación para NF200. Los tractos axonales del CC de los animales VPA mostraron una franca disminución de la expresión de PSA-NCAM sin cambios en la expresión de NCAM. Nuestros resultados indican una alteración en el desarrollo de los tractos axonales del CC en los animales VPA. Se sugiere que el incremento relativo de la forma no polisialida de NCAM podría contribuir al desarrollo axonal prematuro en los animales VPA ya sea mediante un fenómeno adhesivo o a un mecanismo dependiente de la señalización de NCAM.

464. (791) LA ASFIXIA PERINATAL EXPERIMENTAL INDUCE AISLAMIENTO SOCIAL

Vázquez, Pablo; Rico, Catalina; Peña, María Elena; Cohon, Diego; Acosta, Juan Manuel; Loidl, C. Fabian
Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E De Robertis" (IBCN)-CONICET-UBA

La asfixia perinatal es la falta global y transitoria de aporte de oxígeno al feto en el período peri-parto, lo cual aumenta 5 veces la probabilidad de padecer esquizofrenia. En este trabajo analizamos el efecto a largo plazo sobre ansiedad, actividad locomotora y comportamiento social en ratas expuestas a asfixia perinatal por 19 min a 37 °C (AP). Las mismas fueron comparadas con ratas nacidas por parto vaginal (CTL-V) o cesárea (CTL-C). Además, para evaluar la capacidad neuroprotectora de la hipotermia se incluyó un grupo sometido a 19 min de asfixia perinatal a 15°C (HIP). En campo abierto no se encontraron diferencias entre los grupos analizados en la actividad locomotora (cruces de cuadrante) ni en estimadores de ansiedad (cruces centrales y tiempo en cuadrante central). Existen diferencias significativas con ANOVA en el número de deposiciones ($F=4,907$; $p=0,0056$). La prueba de comparación múltiple muestra un aumento de deposiciones en CTL-C e HIP con respecto a CTL-V. Con la prueba t de Student se evidenció una disminución significativa en el número de deposiciones en AP con respecto a CTL-C ($t=2,495$; $df=20$; $p=0,0215$). Los recuentos de contactos totales demostraron diferencias significativas ($F=3,030$; $p=0,0414$), donde se observa un aumento de contactos en los grupos CTL-C y CTL-V en comparación con el AP e HIP en el período de 6-9 min de observación ($md=5667$; $ES\ dif=2147$). La solicitud de juego presenta un patrón similar y explica en parte el aumento en los contactos totales. Se observan diferencias significativas entre grupos ($F=3,251$; $p=0,0325$) con aumento significativo en CTL-C comparado con AP en el intervalo 6-9 min ($md = 3167$; $ES\ dif = 1,418$). En conclusión, la AP deteriora tanto el número como la calidad de las interacciones sociales en la rata, lo cual podría extrapolarse hacia el daño en las relaciones interpersonales que ocurren con la esquizofrenia. Además la cesárea induce cambios comportamentales *per se* en la rata.

465. (792) EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INDUCIBLES POR FRÍO EN UN MODELO DE RETINOPATÍA PROLIFERATIVA ISQUÉMICA

Rey Funes, Manuel^{1,5}; Contartese D.S¹⁵; Rolón F.,⁵; Goldstein J.²; Larryoz I.M.³; Dorfman V.B.⁴; Martínez A.³; Loidl C.F.⁵

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E De Robertis" (IBCN)-CONICET-UBA¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Centro de Investigaciones de La Rioja (CIBIR), España³ Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), U. Maimónides.⁴ Facultad de Medicina, Universidad Católica de Cuyo, San Juan⁵

La asfixia perinatal (AP) puede lesionar la retina y generar retinopatía proliferativa isquémica con posterior ceguera. En un modelo de AP demostramos neurodegeneración y gliosis compatibles con la retinopatía del prematuro, en la que el sistema nitrérgico interviene en su fisiopatología y la adrenomedulina en la generación de neovascularización aberrante. En dichos estudios la hipotermia tuvo efecto protector. Recientemente se ha descrito la presencia de proteínas inducibles por frío (CIRP: *Cold-inducible*

RNA binding protein y RBM3: *RNA binding motif protein 3*) como respuesta a la exposición a hipotermia en diversos tejidos. No se ha reportado aún su expresión en la retina. El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión de CIRP y RBM3 en animales sometidos a AP y AP con dos diferentes aplicaciones de hipotermia. Utilizamos retinas de ratas de 6, 12 y 24 hs posteriores a la AP por 20 min en condiciones de normotermia (AP-37°C), de AP por 20 min en hipotermia (HIP-15°C) y de AP por 20 min en normotermia que luego se colocaron en hipotermia a 8°C durante 15 min (HIP-PA). Los controles (CTL) fueron animales nacidos a término. Se midió la temperatura corporal por vía rectal en todos los grupos experimentales. La expresión de CIRP y RBM3 fue evaluada por western blot, inmunohistoquímica y rt-PCR. Se observó con western blot y rt-PCR un aumento significativo en la expresión de CIRP y RBM3 a partir de las 12 hs posteriores a la AP en los 2 grupos expuestos a hipotermia. Estas proteínas se observaron en neuroblastos mediante inmunohistoquímica. Este trabajo confirma la expresión de CIRP y RBM3 en la retina neonatal expuesta a hipotermia tanto durante la AP (HIP-15°C) como después de la AP (HIP-PA) y que la hipotermia induce un proceso activo con cambios en la expresión y localización de proteínas inducidas por frío. Esto podría abrir un nuevo camino en la comprensión de los mecanismos moleculares que se producen ante la hipotermia.

466. (799) EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INDUCIDAS POR FRÍO (CIRP Y RBM3) EN LA RETINA DE RATAS EXPUESTAS A HIPOTERMIA

Contartese, Daniela Soledad^{1,4}; Rey-Funes M^{1,4}; Rolón F.^{1,4}; Sarotto A.¹; Larryoz I.M.²; Dorfman V.B.³; Martínez A.²; Loidl C.F.^{1,4}

Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis" (IBCN)-CONICET-UBA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, España.² Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides.³ Facultad de Medicina, Universidad Católica de Cuyo, San Juan⁴

El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de las proteínas inducibles por frío CIRP (*Cold-inducible RNA binding protein*) y RBM3 (*RNA binding motif protein 3*) en la retina de ratas recién nacidas y adultas expuestas a hipotermia, dado que la misma está siendo actualmente muy utilizada como estrategia terapéutica ante diversos tipos de lesiones. Se utilizaron dos tipos diferentes de exposición global y transitoria a hipotermia. Uno consistió en la colocación de ratas recién nacidas durante 15 min en heladera a 8°C, y otro en la exposición de ratas de 30 días durante 3 hs en heladera a 8°C. La retina de ambos grupos fueron comparados con sus respectivos controles neonatos y adultos. Inmediatamente después de la exposición a hipotermia se observó un descenso de la temperatura corporal (medida por vía rectal con un termómetro digital con una delgada termocupla) de 12°C en neonatos (nacidos a 32°C) y de 2,5°C en adultos (normotermia: 36, 5°C). A las 12, 24 y 48 hs posteriores a la exposición hipotérmica se analizó la expresión y la localización de CIRP y RBM3 por western blot e inmunohistoquímica. Por western blot se observó un aumento significativo en la expresión de CIRP y RBM3 en los animales neonatos y de 30 días expuestos a hipotermia. Por inmunohistoquímica se observó en la retina de neonatos expuestos a hipotermia marca para CIRP y RBM3 en neuroblastos, y en la retina de ratas de 30 días expuestas a hipotermia marca en células de la capa nuclear interna y en células ganglionares. Además de que la hipotermia genera un aplanamiento metabólico que evita el desencadenamiento de mecanismos neurotóxicos, se induciría un proceso activo, con cambios en la expresión y localización de proteínas específicas, lo cual intervendría en la génesis de la neuroprotección por hipotermia, tan utilizada últimamente en forma empírica.

467. (807) EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LA ENZIMA ESTEROIDE SULFATASA (STS) EN HIPOTÁLAMO DE RATA HEMBRA BAJO DIFERENTES CONDICIONES HORMONALES SEXUALES

Bazzocchini, Vanesa S¹; Giuliani, Fernando A¹; Campo Verde Arbocco, Fiorella²; Yunes, Roberto¹; Cabrera, Ricardo J¹ *Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)- Universidad de Mendoza – IMBECU-CONICET.*¹ *Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU) – Centro Científico Tecnológico (CCT) Mendoza*²

La esteroideo sulfatasa (STS) es la enzima responsable de desulfatar diferentes hormonas como la Pregnenolona sulfato, DHEA-S, Estrógeno sulfato, entre otras. Esta enzima posee gran relevancia fisiológica en hígado, pero es poco lo que se sabe acerca de su función en SNC. En nuestro laboratorio hemos trabajado con diferentes esteroides sulfatados y su efecto sobre la reproducción mediante estudios neuroendócrinos y comportamentales. Nuestro objetivo fue caracterizar y evaluar la expresión génica de la STS bajo diferentes patrones hormonales sexuales endógenos y exógenos en la rata hembra. Se utilizaron ratas hembras adultas Sprague-Dawley que se dividieron en 5 grupos: ratas ciclantes en diestro 1 (D1) o proestro (PE); ratas ovariectomizadas (OVX); ratas OVX impregnadas con Estrógeno (E) y Progesterona (P) (OVX EP); y ratas OVX EP canuladas en 3^o ventrículo para la administración de COUMATE (inhibidor irreversible de la STS) 1µM (OVX EPC). Los animales fueron decapitados y sus hipotálamos utilizados para la medición de la expresión génica de STS por PCR en tiempo real. Los resultados se expresan como la media ± SEM de expresión relativa de ARNm y analizados estadísticamente por test de "t" o ANOVA I seguido de Newman Keuls. Se observó una diferencia significativa entre D1(0,051±0,012) vs PE(0,017±0,003) *p<0,05, así como entre los grupos con variaciones hormonales sexuales exógenas: OVX(0,016±0,004) vs OVX EP(0,036±0,005)*p<0,05. No se observaron diferencias significativas entre el grupo OVX EPC y el resto de los grupos. Concluimos que los diferentes patrones hormonales endógenos de los ciclos estrales producen cambios moleculares a nivel de la sulfatación hipotalámica. Así vez los cambios hormonales exógenos producidos por la ovariectomía son compensados a nivel génico con la impregnación de esteroides sexuales, demostrando así que la sulfatación hipotalámica juega un rol fundamental en la neurofisiología reproductiva de la rata hembra.

468. (810) EL BLOQUEO DE RECEPTORES AT1 DE ANGIOTENSINA II PREVIENE EL DETERIORO COGNITIVO ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN REPETIDA A ANFETAMINA
Marchese, Natalia Andrea¹; Occhieppo, Victoria¹; Rodríguez, Lara¹; Baiardi, Gustavo²; Bregonzio, Claudia¹
*Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba- IFEC-CONICET*¹ *Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT)-Centro Científico Tecnológico (CCT)-CONICET-Córdoba*²

La exposición repetida a psicoestimulantes, como la anfetamina (Anf), promueve cambios que perduran en el tiempo y que pueden ser evidenciados tanto a nivel molecular como conductual. Se ha encontrado que los usuarios de drogas estimulantes del sistema nervioso central presentan déficits de tipo atencional y en la memoria de trabajo. Además, los reportes clínicos destacan procesos inflamatorios, alteraciones vasculares y a nivel de la glia, que afectan la irrigación sanguínea cerebral. Dentro de los múltiples roles conocidos para la Angiotensina II (Ang II) se ha descrito su rol pro-inflamatorio en la microvasculatura cerebral y su actividad neuromoduladora en múltiples circuitos neuronales. Entre estos, la neurotransmisión noradrenérgica y dopaminérgica, fuertemente involucradas en procesos cognitivos y en respuestas neuroadaptativas a psicoestimulantes. Por lo expuesto nos propusimos evaluar el rol de los receptores AT₁ de Ang II en las alteraciones inducidas por exposición repetida a Anf sobre la memoria de trabajo y la activación de astroglia. Se usaron ratas Wistar macho (250-320g), en condiciones estándar de laboratorio. Se les administró el antagonista de receptores AT₁ Candesartan/vehículo (CV, 3mg/kg p.o., día 1-5) y posteriormente Anf/salina (2,5mg/kg i.p, día 6-10), una semana después se evaluó la memoria de trabajo (Y-maze) y los cerebros fueron

procesados para inmunohistoquímica contra G-FAP. Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías, seguidos por el test de Bonferroni. Los resultados obtenidos indican que la exposición repetida a Anf produce un déficit cognitivo asociado con una alteración en la glia en áreas cerebrales involucradas en tareas de memoria y aprendizaje (corteza e hipocampo). El pretratamiento con CV previno las alteraciones inducidas por el psicoestimulante. Nuestros resultados indican un rol funcional para la Ang II a través de sus receptores AT₁, en cambios a largo plazo inducidos por la exposición repetida a Anf.

469. (812) LA DEPRIVACIÓN PROLONGADA DE HORMONAS OVÁRICAS DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE RATINA EN SUBREGIONES HIPOCAMPALES ESPECÍFICAS: ¿UN EFECTO SOBRE LA ASTROGLÍA?

Zárate, Sandra C¹; Merino, Florencia¹; Reines, Analía²; Seilicovich, Adriana¹

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (INBIOMED)-CONICET-UBA*¹ *Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. E De Robertis" (IBC)-CONICET-UBA*²

La ratina (HNr), homólogo de humanina en la rata, es un polipéptido codificado por el ADN mitocondrial con acción neuro-protectora. Las células gliales han sido propuestas como la fuente principal de este péptido en condiciones fisiológicas. Previamente demostramos que la privación prolongada de hormonas ováricas en la rata adulta disminuye los niveles del ARNm de HNr y modula la distribución intracelular de este péptido en astrocitos del hipocampo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la ovariectomía crónica sobre la expresión de HNr y su relación con el marcador astrocitario GFAP en diferentes subregiones hipocampales. Ratas hembras Wistar adultas fueron ovariectomizadas (OVX) o sometidas a ovariectomía simulada (SHAM) y luego de 12 semanas determinamos la expresión de HNr por IHQ en el hipocampo. Observamos una menor expresión de HNr en la región CA1 del hipocampo de ratas OVX con respecto a las SHAM evaluada como área inmunorreactiva relativa (*s. oriens*, OVX: 0,31±0,15, SHAM: 0,84±0,08 UA; p<0,05; *s. radiatum*, OVX: 0,18±0,11, SHAM: 0,45±0,05; p<0,05, test t), sin evidenciarse cambios en la expresión de esta proteína en el giro dentado. Al evaluar la expresión de GFAP, si bien observamos una tendencia a la disminución de este marcador astroglial en animales OVX con respecto a los SHAM, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística en ninguna de las subregiones estudiadas (n=3) (*s. oriens*, OVX: 0,15±0,02, SHAM: 0,44±0,20 UA; *s. radiatum*, OVX: 0,13±0,03, SHAM: 0,33±0,15; *blade inferior*, OVX: 0,08±0,02, SHAM: 0,28±0,11; *blade superior*, OVX: 0,05±0,01, SHAM: 0,29±0,12; *hilus*, OVX: 0,08±0,03, SHAM: 0,21±0,09). Nuestros resultados sugieren que la disminución en la expresión de HNr en ciertas subregiones hipocampales podría deberse a alteraciones en la astroglia. Sin embargo, no puede descartarse la contribución de otro tipo celular en la reducción de los niveles hipocampales de este péptido inducidos por la ovariectomía.

470. (828) DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS MEDIANTE TESTS CONDUCTUALES

Gaglio, Eliana; Bonaccorso, Paula; Giuliani, Fernando; Yunes, Roberto; Cabrera, Ricardo

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED), Universidad de Mendoza, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET

Previamente en nuestro laboratorio se observó que el tratamiento con progesterona subcutánea, retrasa la aparición de signos motores inducidos por el neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-HODA), por tal motivo resulta de interés la utilización de modelos conductuales que den resultados precisos a la hora de diagnosticar los animales enfermos y así poder comparar diversos tratamientos. En este trabajo se utilizaron ratas macho a las cuales se las lesionó con una microinyección del neurotóxico 6-HODA en cuerpo estriado izquierdo de 8 semanas. Luego los animales post-lesión fueron evaluados con dos métodos de diagnóstico

comportamentales: test de Return y test de Stepping. Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley adultas, separadas en tres grupos: sham (ratas microinyectadas con vehículo, n:6), lesionadas (ratas microinyectadas con 6-HOD, n:10) y lesionadas tratadas (microinyectadas con 6-HOD, tratadas a los 7 días post-lesión con progesterona (4mg/kg de rata), n:7). Los resultados se expresaron como medias \pm S.E.M de número de pasos/5 segundos analizados por test de Student. No se observaron diferencias significativas cuando los animales de los diferentes grupos fueron evaluados con el test de Return, mostrando sólo una tendencia entre los animales tratados con progesterona respecto de los lesionados. Cuando las ratas fueron evaluadas con el test de Stepping, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las patas contralaterales al área de lesión (pata derecha hacia la derecha, lesionadas $6,7 \pm 0,8$ vs lesionadas tratadas con progesterona $11,3 \pm 0,7$, $p < 0,01$; pata derecha a la izquierda, lesionadas $5,6 \pm 0,7$ vs lesionadas tratadas $10,5 \pm 0,6$, $p < 0,001$). Concluimos que el test de Stepping es de mayor sensibilidad para el diagnóstico de trastornos motores neurodegenerativos. Asimismo este test nos permitiría un diagnóstico precoz, al igual que una mejor evolución post tratamiento, que el que se podría obtener con técnicas clásicas ya utilizadas.

471. (833) INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ESTRIATAL DE BDNF Y 3ALFA-HIDROXIESTEROIDE ÓXIDO REDUCTASA POR ESTEROIDES SEXUALES EN UN MODELO DE RATAS HEMBRAS HEMIPARKINSONIANAS
Giuliani, Fernando A.¹; Herrera, Macarena L.^{1,2}; Campo Verde Arbocco, Fiorella.³; Yunes, Roberto¹; Cabrera, Ricardo J.¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-Universidad de Mendoza, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET¹ Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones² Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CCT MENDOZA-CONICET³

Evidencias propias indican que la disfunción motora observada en ratas hembras hemiparkinsonianas (HP), es mayor en ratas ovariectomizadas (OVX) que en las que poseen ciclos estrales normales. A su vez, en OVX el tratamiento subcrónico con estradiol (E_2) (25µg/rata s.c.) y progesterona (P_4) (1mg/rata s.c.) mejora dichos síntomas. Hipotetizamos que los esteroides sexuales estarían implicados en la regulación de la expresión de genes clave a nivel nigroestriatal induciendo neuroprotección. En este trabajo evaluamos el efecto de E_2 y P_4 sobre la expresión de BDNF y de la enzima neuroesteroidogénica 3a-hidroxiesteroide óxidoreductasa (3a-HSOR) en ratas HP, inducidas por la inyección del neurotóxico 6-OHDA en cuerpo estriado (CE) derecho. Los grupos analizados fueron: G1: OVX-Sham (controles sin lesión); G2: OVX-HP (lesionadas); G3: OVX-HP-E (lesionadas tratadas con E_2 durante 10 días consecutivos a partir del sexto día post lesión) y G4: OVX-HP-P (ídem anterior pero tratadas con P_4). A las 8 semanas post lesión las ratas fueron sacrificadas y se evaluó la expresión en CE der e izq del ARNm de BDNF y 3a-HSOR mediante PCR en tiempo real y RT-PCR convencional respectivamente. Los resultados se analizaron mediante ANOVA 1. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la expresión de ambos genes en CE izq (lado no lesionado). En CE der (lado lesionado) se observó una reducción significativa en la expresión de BDNF y 3a-HSOR en el grupo G2 con respecto al grupo G1 ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente). La expresión de BDNF aumentó en G3 con respecto a G2 ($p < 0,05$). La expresión de 3a-HSOR estuvo incrementada tanto en G3 como en G4 comparados con G2 ($p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente). Concluimos que el tratamiento con hormonas esteroidales modifica la expresión de genes con potenciales efectos neuroprotectores. La mayor disponibilidad del factor neurotrófico y aumento en la neuroesteroidogénesis estriatal inducirían mejoras en la funcionalidad motora en ratas hembras HP.

472. (835) EFECTO DE LAS HORMONAS ESTEROIDALES SOBRE LOS SIGNOS MOTORES DE NEURODEGENERACIÓN EN RATAS HEMBRAS HEMIPARKINSONIANAS

Herrera, Macarena Lorena^{1,2}; Giuliani, Fernando Alfredo¹; Mulle Bernedo, María Belén¹; Yunes, Roberto¹; Cabrera, Ricardo¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-Universidad de Mendoza, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET¹ Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones²

Previamente, demostramos que el tratamiento con progesterona (P_4) atenúa la aparición de signos motores de neurodegeneración en ratas macho hemiparkinsonianas (HP). Hipotetizamos que este efecto podría manifestarse en ratas hembras como consecuencia de los mayores niveles plasmáticos de P_4 y estradiol (E_2). En este trabajo nos propusimos evaluar el efecto del ciclo estral normal y de la administración subcrónica de E_2 y P_4 sobre los signos motores deletéreos en ratas hembras HP, inducidas por la inyección intraestriatal del neurotóxico 6-OHDA. A las 8 semanas post lesión evaluamos la actividad rotacional, inducida farmacológicamente con apomorfina, mediante el uso del Return test. También analizamos la bradicinesia y acinesia mediante el Stepping test y la desviación del eje del cuerpo mediante el Curling test. Los grupos experimentales fueron: G1) SHAM (ratas intactas sin lesión), G2) HP (intactas lesionadas), G3) OVX-SHAM (ovariectomizadas sin lesión), G4) OVX-HP (ovx lesionadas), G5) OVX-HP-E [ovx lesionadas tratadas con E_2 (25µg/rata) por 10 días consecutivos a partir del sexto día post lesión] y G6) OVX-HP-P [ídem anterior pero tratadas con P_4 (1mg/rata)]. En G1 y G2 no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en los tres tests evaluados. En la actividad rotacional contralateral hubo un importante incremento en G4 con respecto al grupo control ($p < 0,01$) y una disminución en G5 con respecto a G4 ($p < 0,05$). En el stepping test, la cantidad de pasos fue mayor en G3, G5, G6 con respecto a G4 ($p < 0,01$). En relación a la desviación del eje corporal, G3 y G5 mostraron diferencias significativas respecto a G4 ($p < 0,01$). Concluimos que E_2 y en menor medida P_4 atenúan la manifestación de signos motores neurodegenerativos. Este efecto estaría acentuado en ratas intactas que sufren las variaciones endocrinas cíclicas normales. Nuestros resultados evidencian un importante rol neuroprotector de las hormonas esteroidales frente a lesiones neurodegenerativas en la rata hembra

473. (837) EFECTO DIFERENCIAL DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE α -SINUCLEÍNA EN SUSTANCIA NIGRA DE RATAS HEMBRAS HEMIPARKINSONIANAS

Herrera, Macarena Lorena^{1,2}; Giuliani, Fernando Alfredo¹; Yunes, Roberto¹; Cabrera, Ricardo¹

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-Universidad de Mendoza, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET¹ Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones²

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden caracterizado por la presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas dopamérgicas (DA) de la sustancia nigra (SN) y la pérdida progresiva de dichas neuronas. Los cuerpos se forman por oligomerización de la proteína α -sinucleína (a-syn), cuyos niveles de expresión están aumentados en esta patología. Existe una predominancia masculina en la EP de lo que surge la hipótesis que las hormonas sexuales ováricas podrían tener un importante rol neuroprotector. En este trabajo analizamos la expresión génica de α -syn en SN de ratas hembras hemiparkinsonianas ovariectomizadas (OVX) sometidas a un esquema de reemplazo hormonal con E_2 o P_4 o ratas intactas (no OVX). Para ello trabajamos con un modelo de hemiparkinsonismo (HP) por inyección estriatal del neurotóxico 6-OHDA. Los grupos estudiados fueron: G1) SHAM (ratas intactas sin lesión), G2) HP (intactas lesionadas), G3) OVX-SHAM (ovariectomizadas sin lesión), G4) OVX-HP (OVX lesionadas), G5) OVX-HP-E [OVX lesionadas tratadas con E_2 (25µg/rata) por 10 días consecutivos a partir del sexto día post lesión] y G6) OVX-HP-P [ídem anterior pero tratadas con P_4 (1mg/rata)]. En la octava semana post

lesión, se evaluó la expresión génica de *-syn* mediante RT-PCR. En SN derecha (lado de la lesión), no se observaron cambios en G2 con respecto a G1. Sin embargo hubo un aumento significativo en G4 con respecto a G3 ($p < 0,05$). La sobreexpresión se mantuvo en G6 en relación a G4 pero disminuyó en el grupo tratado con E_2 (G5) ($p < 0,05$). En las SN izquierdas, no se encontraron diferencias significativas en los grupos estudiados. Concluimos que a pesar de la lesión, las ratas endocrinamente intactas no cambian los niveles de expresión de *a-syn*. Por otro lado, la lesión con 6-OHDA dispara la sobreexpresión de *a-syn* en ovx. La reversión en dicho efecto debida al tratamiento con E_2 refuerza la hipótesis de una acción neuroprotectora de las hormonas sexuales sobre las neuronas DA de la SN.

ONCOLOGÍA 3

- 474. (467) ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL PÉPTIDO CÍCLICO CIGB-300 EN UN MODELO DE CARCINOMA PULMONAR**
 Benavent Acero, Fernando¹; Perera, Yasser²; Perea, Silvio E²; Alonso, Daniel F¹; Gómez, Daniel E¹; Farina, Hernán G¹
Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes¹; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba².

La holoenzima CK2 es una serina-treonina kinasa que posee más de 300 sustratos intracelulares, muchos de ellos involucrados en la expresión génica, la proliferación, la angiogénesis y la protección celular contra la apoptosis. Elevados niveles en la actividad de CK2 se asocian con la transformación maligna y el comportamiento agresivo de varios tipos tumorales. Por otro lado, la sobreexpresión génica de CK2 se correlaciona con una reducida supervivencia en pacientes con neoplasias pulmonares. El péptido CIGB-300 fue originalmente identificado y caracterizado para interactuar con el dominio ácido de los sustratos de la enzima CK2, y de esta forma inhibir su fosforilación. Previamente demostramos la actividad antitumoral de este péptido en modelos de carcinoma cervical. En este trabajo evaluamos el efecto del CIGB-300 sobre varios aspectos de la biología tumoral en modelos de cáncer pulmonar. El CIGB-300 demostró efectos inhibitorios sobre la adhesión, migración e invasión de las células tumorales, a dosis de 20 a 50 μM . Mediante el uso de microscopía de fluorescencia se determinó que el CIGB-300 indujo la apoptosis previa disrupción nucleolar en las células tumorales. Por otro lado, se comprobó *in vivo* el efecto sobre la angiogénesis tumoral, encontrándose una disminución significativa en este proceso en los animales tratados. Por último, se determinó la capacidad del péptido CIGB-300 para inhibir la colonización pulmonar con varios esquemas de tratamiento *in vivo*, utilizando dosis de 2 y 10 mg/kg/día. El CIGB-300 inhibió el crecimiento tumoral y la aparición de metástasis espontáneas y experimentales en los animales tratados ($p < 0,05$ Mann Whitney). Estos resultados presentan un avance en el entendimiento preclínico del CIGB-300, y la potencial utilización para el tratamiento sistémico de cáncer pulmonar.

- 475. (468) EL SILENCIAMIENTO DE GALECTINA-8 RETRASA EL CRECIMIENTO TUMORAL IN VIVO DE CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS**
 Bracalente, Candelaria¹; Colombo, Lucas²; Nugnes, Lorena¹; Ferragut, Fátima¹; Gentilini, Lucas³; Laderach, Diego³; Troncoso, María Fernanda¹; Wolfenstein-Todel, Carlota¹; Rabinovich, Gabriel A^{4,3}; Compagno, Daniel³; Elola, María Teresa¹
Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas Prof. Dr. Alejandro Paladini (IQUIFIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Oncología Ángel H. Roffo²; Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET⁴.

Galectina-8 (Gal-8) es una lectina con dominios de reconocimiento para beta-galactósidos, que ha sido descrita como proteí-

na *matricelular* dado que es capaz de modular la adhesión celular. Además, se expresa diferencialmente entre tejidos normales y tumorales, siendo interesante su participación en la transformación neoplásica. En base a estos antecedentes, en este trabajo, se estudió la acción de Gal-8 en el crecimiento tumoral *in vivo*. Para ello se determinaron los niveles de expresión de Gal-8 en diferentes líneas celulares tumorales mamarias humanas, MDA-MB-231 (línea invasiva), T47D y MCF-7 (líneas no invasivas) por PCR en tiempo real. La expresión de Gal-8, aumentó 4 y 5 veces en las líneas celulares T47D y MDA-MB-231 respectivamente, vs la línea celular MCF-7. Se utilizó cicloflina-A como gen de referencia. Posteriormente, se silenció Gal-8 en la línea MDA-MB-231, mediante la transducción con un vector lentiviral (LV) y evaluó la tumorigénesis. A fin de silenciar Gal-8, se construyó un vector LV portador de un pequeño RNA interferente (LV-shRNA), como así también un control no específico (LV-shCont), los cuales fueron utilizados para transducir la línea MDA-MB-231. Se evaluó la expresión de Gal-8 por *western blot* y observó un 30% de disminución de la expresión en las células silenciadas (MDA-Down) vs el control transducido con el LV no específico (MDA-LVshCont) y sin transducir (MDA-MB-231). Para evaluar la tumorigénesis, se inocularon subcutáneamente 10 millones de células (MDA-Down, MDA-LVshCont y MDA-MB-231) con matrigel en ratones *nude* ($n=4/\text{grupo}$). Se observó un retraso en el crecimiento de los tumores inducidos por la línea silenciada (0/0/19/29 mm^3) respecto de ambos controles (MDA-LVshCont: 593/17/83/466 mm^3 y MDA-MB-231: 716/58/1504 mm^3). Estos resultados muestran que la línea invasiva MDA-MB-231 presenta una elevada expresión de Gal-8 y que su silenciamiento está asociado a un retraso del crecimiento tumoral *in vivo*.

- 476. (471) EFECTOS DE CALCITRIOL Y MENADIONA SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN TUMOR MAMARIO MURINO TRIPLE NEGATIVO**
 Bohl, Luciana Paola^{1,5}; Rodríguez, Valeria¹; Picotto, Gabriela¹; Hinrichsen, Lucila^{3,4}; Rozados, Viviana⁴; Cremonesi, David²; Guizzardi, Solange¹; Tolosa De Talamoni, Nori¹
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba² CIC-Universidad Nacional de Rosario³; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario⁴; Centro de Investigaciones y Transferencia-Villa María (UNVM)-CONICET, Córdoba⁵

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que tratamientos combinados con calcitriol (D) y drogas que deplecion glutatión, como la menadiona (M), tienen mayor efecto antiproliferativo *in vitro*, en comparación con los tratamientos individuales. El objetivo de este trabajo fue estudiar las acciones de D solo o en combinación con M, *in vivo*. Se utilizaron ratones hembras de la colonia CBI-IGE (FCM, UNR) ($n=30$), a las que se les inoculó en forma s.c. el tumor mamario murino M-406, triple negativo. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 150 mm^3 , los animales se dividieron en cuatro grupos a los que se les inyectó diariamente en forma i.p.: solución fisiológica (controles, C), M (2 mg/kg de peso corporal), D (0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) o ambas drogas (M + D). Durante el experimento se registraron el peso corporal y el volumen tumoral. La velocidad de crecimiento del tumor se calculó como el cociente entre los volúmenes medidos en dos veces consecutivas. Se obtuvieron muestras de sangre para determinar la calcemia antes y al finalizar los tratamientos. Asimismo, se tomaron muestras del tumor para estudios histológicos. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA y el post-test de Bonferroni. Los tratamientos no alteraron el peso corporal de los animales. La velocidad de crecimiento tumoral disminuyó con el tratamiento combinado (C vs. M + D, $P < 0,05$). Se observaron volúmenes tumorales menores y aumento de núcleos TUNEL positivos en los grupos tratados. Los animales inyectados con D presentaron valores de calcemia levemente superiores a los valores de referencia D. En conclusión, la utilización de M + D retrasa el crecimiento del tumor en forma más eficiente que los tratamientos individuales. Aunque la dosis

de D utilizada indujo hipercalcemia moderada, estos resultados proponen un tratamiento alternativo para tumores de mama triple negativos, ajustando el uso farmacológico del calcitriol.

477. (475) USO DE ESTRATEGIAS BIOINFORMÁTICAS DE MINERÍA DE TEXTOS/DATOS Y ANÁLISIS DE REDES DE INTERACCIÓN MOLECULAR PARA RELEVAR LA RELACIÓN ENTRE CDH1/CADHERINA EPITELIAL (CADE) Y TUMORES SÓLIDOS. APLICACIÓN AL ESTUDIO DEL CÁNCER DE MAMA

Abascal, María Florencia¹; Besso, María José¹; Aparicio, Evangelina¹; Rosso, Marina¹; Mencucci, María Victoria¹; Furlong, Laura²; Vázquez- Levin, Mónica¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Argentina¹; Biomedical Informatics (GRIB), Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Universitat Pompeu, España²

Introducción: La Minería de Textos/Datos es clave en el estudio de la relación gen-enfermedad y el Análisis de Redes de interacción molecular permite identificar blancos potenciales para establecer firmas moleculares en enfermedades complejas como el cáncer. Objetivo: aplicar herramientas bioinformáticas para relevar de forma objetiva, sistemática e integral las evidencias de la participación de *CDH1*, gen que codifica para el supresor tumoral Cadherina Epitelial (CadE) en tumores sólidos (TS), en particular cáncer de mama (CM), primera causa de muerte por cáncer en mujeres. Metodología: Se usó 1) DisGeNET: portal de asociación gen-enfermedad; integra datos de literatura y bases públicas 2) Cytoscape: analiza/integra redes entre proteínas y gen-enfermedad 3) PANTHER: clasifica proteínas por familia/función/proceso biológico/vía de señalización 4) HIPPIE: integra datos de interacciones proteína-proteína (IPP) 5) COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en cáncer. Resultados: *CDH1* se encontró entre 609 genes relacionados a TS. Las proteínas codificadas por los genes se clasificaron por función y vía señalización. En bases curadas, *CDH1* se asoció a 4 términos cáncer-relacionados y 20 neoplasias. *CDH1* fue reportado "biomarcador", "variación genética" y "blanco terapéutico". Utilizando la base "Be Free", *CDH1* se relacionó a 141 términos (20 propiedades / 83 tipos de tumores); por curación manual de la base de textos se verificó asociación en un alto% de casos. En CM se hallaron 3045 genes; al asociarlos con los genes relacionados a *CDH1* de HIPPIE, se identificaron 57 genes a validar con ensayos moleculares. Se encontraron 376 mutaciones en 11/20 neoplasias. El CM presentó el mayor% de mutaciones (192; 42%). Conclusión: Las herramientas bioinformáticas permitieron relevar datos de literatura con bases computacionales, contribuyendo a dilucidar la relación entre alteraciones en *CDH1/CadE* y TS, en particular el CM e identificar potenciales biomarcadores.

478. (476) LA MIGRACIÓN CELULAR Y LA SECRECIÓN DE MMPS SON REGULADAS POR LA ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE RAR α , RAR β Y RAR γ , EN DIFERENTES MODELOS DE CÁNCER MAMARIO MURINO

Flumian, Carolina; Berardi, Damián Emilio; Cirigliano, Stefano Martín; Díaz Bessone, María Inés; Bal De Kier Joffé, Elisa Dora; Urtreger, Alejandro; Todaro, Laura Beatriz
Instituto de Oncología Angel H. Roffo

La migración y la invasión son procesos claves en la cascada metastásica y dado que el Ácido Retinoico (ATRA) disminuye la capacidad migratoria y la secreción de metaloproteasas (MMPs) en líneas celulares de cáncer de mama, nos propusimos estudiar el efecto de agonistas específicos de cada isotipo de los receptores retinoides (RAR) en los procesos antes mencionados, utilizando las líneas de cáncer mamario murino hormono-independientes LM38-LP y 4T1. Las células se trataron por 6 días con AM580 (agonista RAR α , 200nM), AC (agonista RAR β , 2 μ M), BMS (agonista RAR γ , 50nM) o vehículo (DMSO) y se realizaron ensayos de "cicatrización de herida" para evaluar migración luego de 12h. Bajo los mismos tratamientos se recolectaron medios condicionados por 24h para evaluar la secreción de MMPs por zimografía.

Observamos que en la línea LM38-LP tanto el AM580 como el AC disminuyeron la capacidad migratoria (AM580: 108,0 \pm 24,3 μ m, AC: 114,1 \pm 12,8 μ m vs. vehículo: 186,9 \pm 31,0 μ m, p<0,05). Por el contrario, en la línea 4T1 el AM580 aumentó la migración (378,9 \pm 32,0 μ m vs. vehículo 302,2 \pm 31,9 μ m, p<0,05). El tratamiento con BMS no moduló este efecto biológico en ninguna de las dos líneas celulares. Por otro lado, el AM580, el BMS y el AC disminuyeron la actividad de la MMP2 soluble en la línea LM38-LP (0,53 \pm 0,03; 0,47 \pm 0,01 y 0,75 \pm 0,04 respectivamente, expresado en veces del control; p<0,05). En la línea 4T1 el AM580 aumentó tanto la actividad de la MMP2 como MMP9 (1,57 \pm 0,10 y 2,04 \pm 0,26 respectivamente, expresado en veces del control; p<0,05), mientras que el AC produjo el efecto contrario sobre la actividad MMP2 (0,35 \pm 0,01, p<0,05). Podemos concluir que el efecto de los tratamientos retinoides, específicos para cada isotipo, pueden potenciar o inhibir parámetros *in vitro* asociados a la diseminación metastásica dependiendo de cada línea celular mamaria.

479. (484) LAS PROTEÍNAS FKBP51 Y FKBP52 PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

De Leo, Sonia A.¹; Camisay, María F.¹; Mazaira, Gisela I.¹; Galigniana, Mario D.^{1,2}; Erlejman, Alejandra G.¹
Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²

Las proteínas FKBP (*FK506-binding protein*) de 51- y 52-kDa (FKBP51 y FKBP52) originalmente se caracterizaron como reguladoras de la actividad de los receptores esteroidales. Recientemente se las describió también como moduladoras de la actividad de otros factores como NF-kB y p53, los cuales modulan la proliferación y muerte celular. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de FKBP51 y FKBP52 en la proliferación y muerte celular. Se generaron células HEK 293 que sobreexpresan establemente FKBP51 (HEK51⁺). Se evaluó la viabilidad celular por ensayo de MTT, y se realizó el recuento de células viables con Azul de Tripán. Luego de 96h de cultivo, las células HEK 51⁺ incrementaron 50% su número respecto a la línea parental HEK WT. De acuerdo con ello, la sobreexpresión transitoria de FKBP51 en HEK WT aumentó 400 veces su viabilidad celular (96h post-transfección), mientras que el silenciamiento de FKBP51 en células HEK51⁺ disminuyó 40% el número de células. Por el contrario, la sobreexpresión de FKBP52 no tuvo efectos significativos. Se evaluó entonces si las diferencias observadas en el recuento celular eran sensibles al tratamiento con estímulos pro-apoptóticos. Así células HEK51⁺ mostraron una mayor sobrevida respecto de la línea parental luego de los tratamientos con H₂O₂ o estaurosporina, 24h. Contrariamente, la sobreexpresión de FKBP52 incrementó la muerte celular luego del tratamiento con H₂O₂, disminuyendo 34% la sobrevida celular, sin observarse efectos significativos con estaurosporina. Concluimos que FKBP51 tiene acción pro-proliferativa y anti-apoptótica al proteger a las células frente a distintos estímulos inductores de muerte celular. FKBP52 en cambio favorece la muerte celular luego de la exposición de células a estrés oxidativo, sugiriéndose un rol pro-apoptótico, quizás por antagonismo con FKBP51, pero sin efectos sobre la proliferación. Postulamos que el balance FKBP51/FKBP52 podría ser determinante en la supervivencia y proliferación celular.

480. (494) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TELOMERASA POR LA COCHAPERONA DE HSP90, FK506-BINDING PROTEIN 51

Zgajnar, Nadia Romina¹; Lagadari, Mariana¹; Galigniana, Mario Daniel^{1,2}
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²

Las inmunofilinas de alto PM (IMMs) poseen dominios TPR a través de los cuales se asocian a Hsp90, y un dominio PPLasa que

tiene actividad de peptidil-prolil-cis/trans-isomerasa que se inhibe al unir al macróido FK506. La IMM FKBP51 está involucrada en la regulación de la respuesta de varios factores transcripcionales como receptores esteroidales, p53, NF- κ B, etc. Recientemente demostramos que una fracción importante de FKBP51 se localiza en la mitocondria, posee acción antiapoptótica, y se encuentra sobreexpresada en varios tipos de tumores. Por otra parte, la actividad de telomerasa es responsable de elongar los telómeros durante cada división celular, siendo esencial para la rápida expansión clonal. Es por ello que su actividad es elevada en células tumorales, germinales y primordiales. Su subunidad catalítica (hTERT) se asocia a Hsp90, Hsp70 y p23. Dado que FKBP51 tiene la capacidad de asociarse a Hsp90, estudiamos si esta IMM forma parte de los complejos de hTERT y cuál es su eventual función. La inmunoprecipitación de hTERT en células HeLa reveló la presencia de FKBP51 de manera Hsp90-dependiente. Tratamientos con el inhibidor de Hsp90 geldanamicina o la sobreexpresión del dominio TPR favorecen la disociación de la IMM. Estudios de IFI por microscopía confocal mostraron colocalización de hTERT y FKBP51, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés oxidativo como las que se generan en células tumorales. FKBP51 mostró exacerbar la actividad enzimática de telomerasa (TRAP-eze, Intergen), lo que está acorde con el rol ya observado en células tumorales. A su vez, tal actividad fue inhibida por la sobreexpresión de una mutante puntual de FKBP51 en su dominio TPR (es incapaz de unir Hsp90), y se vió exacerbada por inhibidores de la actividad PPlasa como FK506 o por la sobreexpresión de una mutante puntual inactiva para PPlasa. Nuestro estudio demuestra por primera vez la regulación de la actividad de telomerasa por esta inmunofilina de alto PM.

481. (505) LA CEPA VACUNAL DE SALMONELLA TYPHI TY21A UTILIZADA COMO TERAPIA ANTINEOPLÁSICA INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE LEUCEMIAS Y LINFOMAS

Tesone, Agustina Inés¹; Vendrell, Alejandrina¹; Menay, Florencia¹; Cocozza, Federico¹; Goin, Juan¹; Larotonda, Gerardo²; Mongini, Claudia¹; Waldner, Claudia¹
 Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorios Lavef².

En estudios previos demostramos que la vacuna comercial de *Salmonella* Typhi Ty21a actúa como agente terapéutico inhibiendo la proliferación tumoral de un linfoma T murino (EL4). El objetivo del presente estudio es investigar si esta cepa de *Salmonella* Typhi puede también aumentar la sobrevivencia de los ratones portadores del tumor EL4. Además, estudiamos el efecto oncolítico de la *Salmonella* sobre células tumorales humanas de leucemia o linfoma. Diseñamos un protocolo de inmunización combinando inoculaciones de la bacteria en forma intratumoral y en el tejido subcutáneo próximo a los ganglios drenantes, en animales portadores de tumores EL4. Los resultados mostraron que el tratamiento con la bacteria fue capaz de reducir significativamente el volumen medio de los tumores del grupo experimental respecto del grupo control tratado con PBS ($p < 0,05$ a partir del día 5 post-tratamiento). Más aún, este tratamiento redujo el desarrollo de metástasis nodales y aumentó el tiempo medio de sobrevivencia de los animales tratados ($p < 0,05$). Al mismo tiempo, se detectó la eliminación del tumor primario en parte de los animales tratados (~20% de animales curados). En experimentos *in vitro* demostramos que la Ty21a inhibe la proliferación e induce la muerte de las células tumorales EL4, HL60 y U937 ($p < 0,05$). Nuestro trabajo demuestra la eficacia de una cepa vacunal de *Salmonella* Typhi atenuada como agente terapéutico contra leucemias y linfomas. Este enfoque terapéutico podría ser una herramienta poderosa para el tratamiento del cáncer, pudiendo ser utilizada sola o en combinación con otras terapias.

482. (513) ROR1 PARTICIPA EN LA ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR EN MELANOMA

Fernández, Natalia B¹; Picco, María Elisa¹; López Bergami, Pablo^{1,2}

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides².

ROR1 (Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor 1) es un receptor del ligando Wnt5a y cumple un importante rol durante el desarrollo embrionario y en ciertas patologías en el adulto, particularmente en cáncer. Por ejemplo, se demostró que ROR1 participa en el crecimiento tumoral y en la Transición Epitelio – Mesenquimal (TEM) en células de cáncer de mama. Para mejorar nuestro entendimiento de los procesos mediados por ROR1 en melanoma utilizamos las estrategias de pérdida y ganancia de función. Para ello, se silenció la expresión de ROR1 empleando ARN interferencia (células A375-shROR1) y se generaron células que expresan el ADNc de ROR1 (A375-ROR1). La alteración en los niveles de ROR1 fue confirmada por PCR en tiempo real, western blot y citometría de flujo. Luego de haber demostrado en trabajos previos que ROR1 participa tanto en la proliferación como en la supervivencia celular, en este estudio nos enfocamos en su posible rol en la adhesión y migración. El silenciamiento de ROR1 aumentó significativamente la adhesión celular a los 30 minutos ($1,44 \pm 0,10$ vs $1,00 \pm 0,12$ en el control). Por otro lado, el aumento en la expresión de ROR1 generó una disminución significativa en la adhesión ($0,80 \pm 0,06$ vs $1,00 \pm 0,04$ en el control). A su vez, ensayos de cicatrización de herida revelaron un aumento en la migración celular en las células A375-ROR1 ($20,42 \pm 3,48$ vs $11,36 \pm 2,35$ en el control), mientras que la misma disminuyó en las células A375-shROR1 ($7,51 \pm 1,60$ vs $12,43 \pm 1,56$ en el control). Los cambios en los niveles de ROR1 afectaron directamente la expresión de los marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina medida por PCR en tiempo real y western blot. Los niveles de ambas moléculas de adhesión aumentaron significativamente al sobreexpresar ROR1 y disminuyeron significativamente en las células A375-shROR1. En conjunto, estos resultados demuestran la participación de ROR1 en los procesos de adhesión y migración celular en melanoma.

483. (521) C-SRC Y ERK1/2 PARTICIPAN EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE TUMOR PANCREÁTICO HUMANO INDUCIDA POR HISTAMINA

Mohamad, Nora A¹; Taquez Delgado, Mónica¹; Galarza, Tamara¹; Mauro, Florencia¹; Cricco, Graciela P¹; Martín, Gabriela A^{1,2}
 Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)²

La transición epitelial-mesenquimática es un proceso biológico que permite a las células epiteliales adquirir características mesenquimáticas, favoreciendo la invasión y metástasis. La cSrc, una tirosina quinasa, y las Erk 1/2, serina treonina quinasas, juegan un papel prominente en la progresión tumoral a la metástasis. Previamente, en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático PANC-1 y BxPC3 demostramos que la histamina (HA) en concentraciones entre 0,1 y 1 μ M aumenta la proliferación celular, la actividad gelatinolítica y la migración celular. En este trabajo se evaluó la participación de las quinasas cSrc y Erk en la migración de las células PANC-1 y BxPC3 inducida por HA. Se estudió la expresión de las formas activadas de ambas quinasas (cSrc-P y Erk-P) en función del tiempo para HA entre 0,1 y 1 μ M por Western Blot. La fosforilación de las dos proteínas aumentó a los 10 minutos en ambas líneas ($p < 0,05$). En las células BxPC3 la máxima activación se observó con HA 1 μ M y en PANC con 0,2 μ M ($p < 0,05$). Esas concentraciones de HA produjeron una disminución de la E-cadherina en la membrana celular y un aumento de la expresión de los marcadores mesenquimáticos N-cadherina, vimentina y α -actina de músculo liso. En ambas líneas el PP2 10 μ M, inhibidor específico de cSrc, redujo los niveles de cSrc-P y Erk-P inducidos por HA, mientras que el PD 98059 10 μ M, inhibidor específico de Erk, sólo disminuyó los niveles de Erk-P ($p < 0,05$). La activación de cSrc por HA en las células PANC y BxPC3 se corroboró por inmunofluorescencia indirecta

al observarse su localización en membrana celular. Mediante el uso de cámaras de migración se determinó que el PP2 y el PD 98059 bloquearon la migración celular inducida por HA ambas líneas celulares al cabo de 24 hs ($p < 0,01$). Estos resultados evidencian la participación de las quinasas cSrc y Erk en la vía de señalización que media la migración de las células de tumor pancreático humano PANC-1 y BxPC3 por acción de la histamina.

484. (523) REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL ONCOGÉN MYC POR FGF2 Y RECEPTORES HORMONALES EN CÁNCER DE MAMA

Giulianelli, Sebastián J¹; Guillardoy, Tomás²; Gorostiaga, María A²; Lanari, Claudia²

Centro Nacional Patagónico (CENPAT)-CONICET¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET².

La expresión de receptores para estrógenos (ER α) y progesterona (PR) caracteriza a los tumores de mama de tipo luminal y dirige la terapia hacia una de tipo endocrina. La activación de dichos receptores de forma ligando-independiente representa un mecanismo de resistencia a las terapias convencionales. Estudiar estos fenómenos permitirá establecer nuevos blancos terapéuticos o hacer más eficientes los actuales. Demostramos que el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), induce proliferación celular y crecimiento tumoral en modelos humanos y murinos de cáncer de mama, involucrando la activación tanto del ER α como del PR, en ausencia de ligando. El objetivo del trabajo fue describir dicha acción transcripcional ligando-independiente de ambos receptores mediada por FGF2, tomando como modelo la expresión del oncogén MYC a través de una secuencia *enhancer* presente en su promotor. Sabemos que tanto ER α como PR, participan en la expresión de MYC por sus ligandos específicos y por FGF2. Utilizando líneas celulares de cáncer de mama humano, MCF7 y T47D, demostramos en ensayos con genes reporteros (Luciferasa-Luc) bajo el control transcripcional del *enhancer* de MYC, que dicha secuencia mediaría la expresión del gen por ER α y PR cuando las células son estimuladas con estradiol ($p < 0,001$) o acetato de medroxiprogesterona ($p < 0,001$) respectivamente. La estimulación con FGF2 indujo también la expresión del *enhancer*-Luc ($p < 0,001$), mientras que el bloqueo del ER α con ICI182.780 o del PR con mifepristona, inhibieron la expresión de Luc mediada por FGF2 ($p < 0,001$). Finalmente, el FGF2 indujo el reclutamiento del ER α y PR, junto con el cofactor FOXA1 a la secuencia *enhancer* estudiada en el promotor de MYC, luego de realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. Los resultados indican que la señalización por FGF2 y la consecuente expresión de MYC a través de una secuencia *enhancer* en su promotor, involucra el *crossstalk* con receptores hormonales en cáncer de mama.

485. (525) ANÁLISIS DE MECANISMOS DE ACCIÓN ANTITUMORAL Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE GALECTINAS 1 Y 3 INDUCIDAS POR UN METALOFÁRMACO DE VANADIO Y CRISINA EN CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA HUMANO

León, Ignacio Esteban¹; Mercer, Natalia²; Feng, Chiguang²; Etcheverry, Susana Beatriz¹; Vasta, Gerardo Raul²
Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata¹; Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, USA².

El vanadio es un elemento traza esencial para formas inferiores de vida y para las plantas pero su esencialidad en humanos permanece controvertida. Este juega un rol importante en diversas enzimas y además sus compuestos presentan interesantes propiedades farmacológicas. Los complejos de vanadio con flavonoides han resultado atractivos desde un punto de vista biológico dado que han demostrado promisorios resultados como antitumorales en diversos modelos de estudio. Por otro lado, las galectinas constituyen una familia de proteínas conservadas evolutivamente, que reconocen galactósidos y participan en procesos relacionados con la diferenciación y proliferación celular, y la regulación de la muerte celular programada, entre otros. En el presente trabajo se investiga-

ron *in vitro* los efectos de un complejo de vanadio con crisina (VO (crisina)₂) sobre la expresión y secreción de las galectinas 1 y 3 en un modelo de células de osteosarcoma humano en cultivo (MG-63). La incubación de las células con el complejo (25 y 100 μ M) durante 1 ó 3h redujo en un 30% tanto la transcripción así como los niveles de la proteína expresada para ambas galectinas ($p < 0,01$). Además, en esas condiciones experimentales se observó que el nivel de galectina 1 secretada al medio extracelular disminuyó en un 25 y 40% sobre el basal por la acción del complejo a 25 y 100 μ M, respectivamente. Por otro lado, luego de una incubación de 3h con el complejo (100 μ M) los niveles de galactosa y ácido siálico expuestos en superficie celular se incrementaron significativamente ($p < 0,01$). El tratamiento de las células con una combinación del complejo (100 μ M) y galectinas exógenas (25-100 μ g/ml) resultó en un efecto sinérgico en su acción antitumoral. Estos resultados sugieren que la combinación de la actividad antitumoral de las metalodrogas con la acción proapoptótica de las galectinas podría ser optimizada para desarrollar nuevas terapias efectivas contra osteosarcoma, y otros tumores.

486. (531) RUNX2 REVIERTE EL EFECTO INHIBITORIO GENERADO POR EL SILENCIAMIENTO DEL FGFR2 Y AUMENTA EL POTENCIAL METASTÁSICO EN LA LÍNEA TUMORAL DE MAMA HUMANA IBH-6 CRECIENDO IN VIVO.

Cecilia, Pérez Piñero; María, May; Isabel A., Lüthy; Claudia, Lanari
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Anteriormente demostramos que el FGF2 activa al receptor de progesterona (RP) aumentando la proliferación de células de cáncer de mama humano T47D y de modelos murinos. También demostramos que la expresión de RUNX2 aumenta en la transición hacia la hormona independencia. RUNX2 es un regulador de la expresión del FGFR2 y, por otro lado, FGF2 aumenta la expresión de RUNX2. El objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre FGFR2 y RUNX2 en la línea tumoral mamaria humana IBH-6 que crece *in vivo* sin aporte hormonal exógeno y expresa receptores hormonales. Las células IBH-6 fueron transfectadas establemente con un plásmido específico para silenciar al FGFR2 (shFGFR2) o con plásmido control (Scrambled, SC). El silenciamiento del FGFR2 fue confirmado por Western Blot. Se inocularon $3 \cdot 10^6$ células s.c. en el flanco derecho de ratones *nu/nu*. Los tumores shFGFR2 fueron menos agresivos y más pequeños que los controles ($p < 0,001$), con menor índice proliferativo (*Ki67*, $p < 0,01$), menor activación de ERK y AKT ($p < 0,05$) y menor expresión de CCND1 y RUNX2 en comparación con los controles. Para evaluar si RUNX2 revierte el efecto inhibitorio del silenciamiento del FGFR2, las células fueron co-transfectadas con un vector de expresión de RUNX2 e inoculadas en ratones *nu/nu*. Los tumores shFGFR2/RUNX2 mostraron mayor agresividad asociada a una mayor expresión de CCND1 en comparación con los controles ($p < 0,05$) o con los tumores shFGFR2 ($p < 0,01$). Presentaron metástasis hepáticas y pulmonares ausentes en los controles. Los resultados indican que el FGFR2 es una proteína clave involucrada en el crecimiento de tumores mamaros. El hecho que RUNX2 revierte el efecto inhibitorio inducido por shFGFR2, nos permite postular que las vías de señalización involucradas son independientes de FGFR2, suponiendo que FGF2 activa a FGFR2 y luego a RUNX2. Los resultados enfatizan el uso de inhibidores de FGFR2 en combinación con la terapia estándar en pacientes con cáncer de mama.

487. (534) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO (ATRA) SOBRE RESPUESTAS BIOLÓGICAS ASOCIADAS AL CRECIMIENTO Y LA PROGRESIÓN MALIGNA, EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS HUMANAS CON SOBREEXPRESIÓN DE DISTINTAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC).

Díaz Bessone, María Inés; Berardi, Damián E; Cirigliano, Stefano M; Flumian, Carolina; Bal De Kier Joffé, Elisa D; Todaro, Laura B; Urtreger, Alejandro J
Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

Las enzimas PKC constituyen una familia de serina-treonina quinasas que controlan numerosas funciones celulares, como el crecimiento, apoptosis y transformación maligna, mientras que el sistema retinoideo se encuentra ampliamente implicado en diferenciación. En este trabajo nos propusimos determinar el efecto del tratamiento retinoideo sobre la capacidad proliferativa, motilidad y producción de enzimas proteolíticas sobre células tumorales mamarias humanas MDA-MB231 modificadas para sobre-expresar las isoformas α y δ de PKC. Mediante Western Blot pudimos determinar que las células que sobreexpresan PKC α presentaron elevados niveles de la ciclina D1. Mientras que el tratamiento retinoideo fue capaz de reducir los niveles de expresión de esta proteína en ambos modelos (MDA- PKC α y vector). No obstante, ni la sobreexpresión de PKC α ni el tratamiento con ATRA fueron capaces de alterar la capacidad proliferativa de las células MDA-MB231 *in vitro* (tiempo de duplicación poblacional: 18,6 \pm 0,8 hs). El potencial migratorio se evaluó mediante ensayos de "cicatrización de herida". Hemos observado que las células MDA-PKC δ responden al tratamiento con ATRA con un aumento de la capacidad migratoria (% de cubrimiento de la herida: 38,2 \pm 3,4 vs 21,3 \pm 2,4 en células MDA-PKC δ y control resp. p<0,05). Por otro lado la sobreexpresión de PKC δ produjo una reducción de la actividad de las metaloproteasas solubles (MMPs) (132,3 \pm 31,6 vs. 47,8 \pm 9,4 UA/mg prot, en células MDA-PKC δ y control resp. p<0,05), aunque el tratamiento con ATRA no modificó la actividad de MMPs. En correlación con este resultado, pudo observarse un fenotipo menos invasor de las células MDA-PKC δ cuando las mismas crecen en cultivo 3D en matrigel. Nuestros resultados sugieren que en esta línea celular humana la sobreexpresión de PKC α , podría conferir un fenotipo más agresivo pero sensible al tratamiento retinoideo. Estos resultados se correlacionan con lo observado previamente por nuestro grupo de trabajo en líneas tumorales mamarias murinas

488. (536) LOS ANTIPROGESTÁGENOS Y SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

Rojas, Paola¹; May, María¹; Sequeira, Gonzalo¹; Martínez Vázquez, Paula²; González, Pedro²; Gass, Hugo²; Lanari, Claudia¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹; Hospital General de Agudos de General Pacheco, Buenos Aires².

El 75% de los carcinomas mamaros expresan receptores de estrógenos alfa (RE α) y de progesterona (RP). Aunque existen evidencias que relacionan al RP con el crecimiento del cáncer de mama, los tratamientos actuales tienen como blanco al RE. En el laboratorio trabajamos con un modelo murino en el que se observó que los tumores que expresan mayor proporción de isoforma A del RP (RPA) que de B (RPB) son los que responden al tratamiento con antiprogéstágenos como la mifepristona (MFP). Nuestra hipótesis es que el tratamiento con MFP podría ser efectivo en aquellos pacientes que expresen más RPA que RPB. En este trabajo utilizamos muestras provenientes de pacientes del Hospital de General Pacheco. Las muestras se transportan postcirugía en hielo seco y medio de cultivo para realizar la determinación de isoformas por Western blot y el cultivo tisular respectivamente. En una primer etapa se realizaron cultivos primarios que tuvieron una baja efectividad (11,4%). Luego se implementó la técnica del cultivo tisular mediante incubación de láminas de 100 μ m de tumor tratadas o no por 48 hs con MFP 10 nM en medio con 10% SFB. El efecto de la droga se determinó evaluando por inmunohistoquímica la expresión del marcador de proliferación Ki67. De 102 pacientes, 32 pudieron ser evaluados: 18 expresaron una relación RPA/RPB>1,2 y el 100% mostró una inhibición significativa de la proliferación cuando se trató con MFP. De las 12 muestras que expresaron una relación RPA/RPB <0,83 (pacientes RPB) o mostraron una expresión equimolar de las isoformas (RPA/RPB 0,83 a 1,19) sólo 3 (25%) mostraron un patrón de inhibición similar. En 2 casos de pacientes RPB, la MFP incrementó la expresión de Ki67, mientras que en 7 no tuvo efecto al igual que los 2 casos RP negativos. Concluimos que a) este método es superior a los cultivos primarios y b) que los pacientes con una mayor

expresión de RPA que de RPB serían beneficiados con la suma de un tratamiento con antiprogéstágenos al tratamiento estándar.

489. (543) GLIPICANO-3 (GPC3) MODULA LAS CAPACIDADES INVASIVA Y METASTÁSICA EN UN MODELO PRECLÍNICO DE CÁNCER DE MAMA HUMANO.

Castillo, Lilian; Tascón, Rocío; Bal De Kier Joffé, Elisa; Peters, María Giselle
Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

Previamente demostramos que GPC3 actúa como supresor metastásico en células de cáncer mamario murino. Aquí nos propusimos generar un modelo preclínico de cáncer de mama humano para estudiar al glipicano. La expresión de GPC3 fue bloqueada 95% por ARNi en células MCF-7 (poco metastásicas y GPC3+), mientras que fue sobreexpresado más de 10 veces en células MDA-MB231 (altamente metastásicas y GPC3-) por infección lentiviral. Demostramos que las células MCF-7-shGPC3 proliferan más rápido (Tiempo de duplicación poblacional (h): 73 -shGPC3 vs 87 -shCN, p<0,001), son más clonogénicas (Colonias (n): 130 -shGPC3 vs 37 -shCN, p<0,001), viables (Viabilidad (%): 80 -shGPC3 vs 67 -shCN, p<0,05) y móviles (Cobertura de herida (%): 15 -shGPC3 vs 2 -shCN, p<0,001), con aparición de fibras de estrés de actina y disminución en la expresión de E-Cadherina. *In vivo*, los tumores -shGPC3 poseen menor latencia (Md (días): 30 -shGPC3 vs 49 -shCN, p<0,01), mayor tumorigenicidad (Toma tumoral (%): 80 -shGPC3 vs 60 -shCN, p<0,05) y crecimiento tumoral (mm³/día: 26 \pm 2,2 -shGPC3 vs 0,2 \pm 0,02 -shCN, p<0,01). Por su parte, las células MDA-MB231-GPC3 proliferan más rápido en monocapa (Tiempo de duplicación poblacional (h): 24 -GPC3 vs 45 -vector, p<0,01), aunque su capacidad clonogénica es menor (Colonias (n): 8 -GPC3 vs 40 -vector, p<0,001), poseen menor viabilidad (Viabilidad (%): 70 -GPC3 vs 100 -vector, p<0,05), motilidad (Cobertura de herida (%): 10 -GPC3 vs 90 -vector, p<0,001), menos fibras de estrés y reexpresión de E-Cadherina. *In vivo*, los tumores MDA-MB231-GPC3 presentan menor latencia (Md (días): 14 -GPC3 vs 97 -vector, p<0,001) y tumorigenicidad (Toma tumoral (%): 40 -GPC3 vs 60 -vector, p<0,05), mayor crecimiento (mm³/día: 72,73 \pm 9,46 -GPC3 vs 1,9 \pm 0,21 -vector, p<0,001), aunque menor capacidad metastásica (Incidencia (%): 20 -GPC3 vs 40 -vector, p<0,01). En resumen, demostramos el rol central de GPC3 en la biología del cáncer de mama humano, reforzando su papel como supresor metastásico.

490. (552) EL HIPOTIROIDISMO EXPERIMENTAL INDUCE APOPTOSIS POR ACTIVACIÓN DE LA VÍA INTRÍNSECA EN TUMORES INDUCIDOS POR DIMETILBENZANTRACENO EN RATAS

López Fontana, Constanza Matilde; Santiano, Flavia Eliana; Sasso, Corina Verónica; Zyla, Leila Ester; Cuello Carrión, Fernando Darío; Pistone Creydt, Virginia; Caron, Rubén Walter
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Mendoza.

Estudiar la expresión de marcadores moleculares vinculados a la apoptosis y proliferación celular en los tumores mamaros inducidos con dimetilbenzantraceno (DMBA) en ratas hipotiroideas y eutiroides. Ratas hembras Sprague Dawley fueron tratadas p.o. con una única dosis de DMBA (15mg/rata) a los 55 días de edad y divididas en 2 grupos: hipotiroideas (HypoT, 0,01% de PTU en el agua de bebida; n=26) y eutiroides (EUT; n=17). Se determinó la latencia, la incidencia y la progresión de los tumores mamaros. Se tomaron muestras de sangre troncal para la determinación de hormonas por RIA, y glándula mamaria normal y tumores para estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos, qPCR y western blot. Se analizó estadísticamente por T de Student y Chi cuadrado. El índice mitótico, Ki-67 y el PCNA fueron similares en ambos grupos, sugiriendo que la proliferación tumoral no se ve afectada por el PTU. Sin embargo, los tumores de las ratas HypoT mostraron una apoptosis aumentada evaluada por el índice apoptótico, Caspasa 3, BAX/BCL2 y por TUNEL (p<0,05). No se observaron diferencias significativas en la expresión de

Caspasa 8. Este efecto también podría estar relacionado con la falta de acción hormonal ya que las ratas HypoT tienen disminuida la expresión de ER α , ER β , TR β 1, PgR y ObR en las células tumorales y los niveles séricos de sus ligandos ($p < 0,05$). En conclusión, el hipotiroidismo experimental aumenta la latencia y disminuye la incidencia y la velocidad de crecimiento tumoral por acciones relacionadas con un aumento de la apoptosis mediado probablemente por la activación de la vía intrínseca.

491. (558) GLIPICANO-3 (GPC3) INHIBE LA PROGRESIÓN TUMORAL MAMARIA A TRAVÉS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MAPK38

Tascón, Rocío Soledad; Castillo, Lilian Fedra; Roca, María Fernanda; Bal De Kier Joffé, Elisa; Peters, María Giselle
Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

Previamente transfectamos células del adenocarcinoma mamario murino LM3 con el gen de GPC3, demostrando su rol como supresor metastásico. En relación a su mecanismo de señalización molecular, demostramos que GPC3 inhibe las vías Akt y Wnt canónica, mientras que estimula las vías p38 y Wnt no canónica. El objetivo de este trabajo fue estudiar si los efectos de GPC3 sobre la progresión tumoral mamaria eran debidos a la activación de p38. Para ello, células LM3-GPC3 o LM3-vector fueron inoculadas s.c. en ratones BALB/c, los que fueron tratados con el inhibidor de p38 (SB203580) o con DMSO como control. Demostramos que independiente del tratamiento con SB203580, los clones LM3-GPC3 y LM3-vector generan tumores s.c. con similar latencia y capacidad tumorigénica (Latencia (Días Md [Rg]): 8 [8-10]; Tumorigenicidad (%): 100). Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor indujo un aumento en la velocidad de crecimiento de los tumores LM3-GPC3 ($\text{mm}^3/\text{día}$: $21,9 \pm 2,5$ LM3-GPC3 +DMSO vs. $30,3 \pm 2,4$ LM3-GPC3 +SB203580, $p < 0,001$), como así también de su capacidad invasiva, alcanzando niveles semejantes a los encontrados en los tumores LM3-vector (Tumores con invasión macroscópica/ulceración (%): 30 LM3-GPC3 +DMSO vs. 100 LM3-GPC3 +SB203580, $p < 0,05$; Tumores con invasión histológica (%): 40 LM3-GPC3 +DMSO vs. 90 LM3-GPC3 +SB203580 y 100 LM3-vector, $p < 0,001$). Asimismo, mientras que ninguno de los ratones portadores de tumores LM3-GPC3 tratados con DMSO desarrollaron metástasis pulmonares, el tratamiento con SB203580 indujo una reversión parcial de los efectos de GPC3, mostrando metástasis en el 60% de los animales, aproximándose así al 100% de ratones portadores de tumores LM3-vector con metástasis. En resumen, corroboramos el efecto supresor metastásico de GPC3 y demostramos que este glipicano inhibe las capacidades invasiva y metastásica de las células LM3 a través de la activación de p38.

492. (560) ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTINEOPLÁSICOS DE NUEVOS ANÁLOGOS DE CALCITRIOL CON MODIFICACIONES EN LA CADENA LATERAL

Obiol, Diego Javier¹; Ferronato, María Julia¹; Salomón, Débora Gisele¹; Alonso, Eliana Noelia¹; Gandini, Norberto Ariel¹; Fermento, María Eugenia¹; Fall, Yagamare²; Curino, Alejandro Carlos¹; Facchinetti, María Marta¹
Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB)-CONICET, Bahía Blanca¹; Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Vigo, España²

Clásicamente el calcitriol interviene en la homeostasis fosfocálcica. Además, inhibe la proliferación celular e induce diferenciación y apoptosis en diferentes líneas celulares malignas aunque su empleo clínico está limitado por su actividad hipercalcemiantes. Por esta razón se busca sintetizar análogos que conserven actividad antineoplásica sin modificar la calcemia. Hemos sintetizado tres nuevos análogos de calcitriol, AM27, ML340 y ML344 y evaluado su acción antineoplásica sobre diferentes líneas celulares tumorales y su actividad calcémica in vivo, comparándola con la ejercida por el calcitriol. Los ensayos de calcemia en ratones CF1 mostraron que los análogos AM27 y ML344 no provocan hipercalcemia mientras que el análogo ML340 resultó ser hipercalcemiantes. Posteriormente se evaluaron los efectos de AM27 y

ML344 sobre la viabilidad celular (conteo en cámara de Neubauer y WST-1) y la migración celular (ensayo de la herida) en diferentes líneas celulares. El análogo AM27 disminuye la viabilidad de las líneas HN12 y HN13 (carcinomas celulares escamosos) ($p < 0,01$), LM3 (adenocarcinoma mamario murino) ($p < 0,001$), HC11 (células normales de epitelio mamario murino) ($p < 0,001$) y T98G (glioblastoma multiforme humano) ($p < 0,05$), pero no altera la viabilidad de astrocitos humanos normales. Sin embargo, este análogo no afecta la migración celular de ninguna de las líneas mencionadas. Por otro lado, el análogo ML-344 ejerce una disminución de la viabilidad y la migración celular de las líneas LM3 ($p < 0,001$) y HN12 ($p < 0,001$). La migración celular no se ve afectada por la presencia del análogo en la línea normal HC11. En conclusión, el AM27 posee un efecto diferencial en la viabilidad de células de gliomas respecto a astrocitos normales y el ML344 en la migración entre células de adenocarcinoma mamario y su contraparte no maligna. Estos resultados preliminares indican la necesidad de continuar investigando el potencial terapéutico de estos análogos.

493. (562) LA AMINOFLAVONA PRESENTA EFECTO IN VIVO SOBRE LAS CÉLULAS STEM TUMORALES EN UN MODELO ESPONTÁNEO MURINO DE CÁNCER DE MAMA DEPENDIENTE DE ESTRÓGENO

Callero, Mariana Alejandra; Berardi, Damián; Todaro, Laura; Simian, Marina; Bal De Kier Joffé, Elisa; Loaiza Pérez, Andrea
Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

La Amino flavona (AF; NSC 686288) es un nuevo agente antitumoral, cuyo derivado, la prodroga AFP464 (NSC710464), se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase II para pacientes de cáncer de mama y riñón. Se conoce que la AFP464 tiene efectos sobre las células stem tumorales mamarias (CSTs) de la línea celular MCF-7, evitando la formación de mamosferas mediante la activación de la vía de señalización del receptor de hidrocarburos arílicos, que resulta en la inhibición de la alfa 6 Integrina. A fin de investigar el efecto de la AFP464 sobre las CSTs *in vivo*, utilizamos el modelo murino de cáncer de mama estrógeno dependiente y sensible al tamoxifeno M05. Luego del tratamiento con AFP464 (12 mg/kg, i.p., QD x 5 días) la velocidad de crecimiento del tumor disminuyó significativamente respecto del control ($0,025 \pm 0,08$ vs $0,08 \pm 0,02$). El análisis mediante citometría de flujo reveló que el porcentaje de células stem Lin (-)/CD29 (Hi)/CD24 (+) fue menor en los animales tratados con AFP464 respecto del grupo control ($2,28 \pm 0,30\%$ vs $6,32 \pm 1,42\%$). Además, se observó que las células obtenidas a partir de los tumores tratados con AFP464 presentaban una menor capacidad para formar esferas multicelulares no adherentes *in vitro* respecto del control ($36,21 \pm 9,51\%$ del control). Finalmente, mediante citometría de flujo se observó que el tratamiento también produjo una significativa disminución de las células que expresan alfa 6 Integrina ($65,64 \pm 19,0\%$ del control). Estos datos sugieren que el tratamiento *in vivo* de un tumor mamario mediante AFP464 reduce el número de CSTs y afecta su capacidad de formar mamosferas, afectando también la expresión de la $\alpha 6$ Integrina por las células tumorales. Estos hallazgos proveen datos adicionales de los efectos moleculares de este nuevo agente antitumoral.

494. (563) FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS 21 SÉRICO (FGF21S) COMO BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO EN PACIENTES CON CARCINOMA CELULAR RENAL (CCR)

Knott, María Elena¹; Pallotta, María Guadalupe²; Gueglio, Guillermo²; Gandur Quiroga, María Natalia¹; Malagrino, Héctor¹; Brzezinski, Mariano¹; Ranuncolo, Stella Maris¹; Puricelli, Lydia Ines¹; De Lorenzo, Mariana Silvia³
Instituto de Oncología Ángel H. Roffo¹; Hospital Italiano de Buenos Aires²; Department of Cell Biology & Molecular Medicine. New Jersey Medical School, Rutgers, USA³

Introducción: El CCR de células claras (CCRcc) es el tipo histológico más frecuente de CCR, asociado a la desregulación de genes relacionados con el metabolismo celular. El FGF21 es una

hormona regulada por el estado nutricional capaz de modular el metabolismo de lípidos y glucosa y puede detectarse a nivel sérico (FGF21s). El rol del FGF21 en cáncer no ha sido dilucidado y no se ha estudiado su expresión en tumores renales. Objetivos: Estudiar, en pacientes portadores de CCRcc: 1) el valor de FGF21s como marcador diagnóstico; 2) la asociación de FGF21s con los parámetros clínico-patológicos (PC-P) y la supervivencia global (SG). Metodología: Las muestras séricas fueron obtenidas del "Biobanco Público de Muestras Séricas Oncológicas" del Instituto Roffo. Mediante un test de ELISA se cuantificó FGF21s en 51 controles sanos (CS) y en 98 pacientes con CCRcc al diagnóstico, vírgenes de tratamiento (69 hombres [Edad; Md (rango): 61 (42-85)] y 29 mujeres [57,5 (43-75)]). Se cuantificó FGF21s en 14 pacientes con CCR cromóforo (CCRcr) y 6 con Oncocitoma (Onc). En pacientes con CCRcc, se estudió la concentración de FGF21s luego de la cirugía (M2). Para el análisis estadístico se utilizaron tests no paramétricos y Kaplan Meier y Log-rank test para la SG. Resultados: El valor de FGF21s no está asociado al sexo o a la edad. Se obtuvieron mayores valores de FGF21s en pacientes portadores de CCRcc respecto a los CS (KW $p < 0,0001$). Se determinó una Sensibilidad de 93% y una Especificidad de 51% usando el percentil 50 de los CS (76,86 pg/ml) como valor de corte. No se encontró asociación entre los valores de FGF21s y los PC-P, ni la SG. Sólo en el 41% de los pacientes FGF21s desciende en la M2. FGF21s encontró elevado en pacientes portadores de Onc (KW $p < 0,008$) y CCRcr (KW $p < 0,0001$), respecto a los CS. Conclusión: FGF21s podría ser un biomarcador diagnóstico de utilidad clínica en tumores de origen renal, aunque no relacionado con el tipo histológico y nuestros estudios preliminares indican que estos resultados se podrían trasladar a otros tipos de tumores.

495. (568) ANÁLISIS PROTEÓMICO EN LA ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA ENDÓCRINA EN EL MODELO TUMORAL MAMARIO MURINO M05

Recouvreur, María S¹; Simoes, Joana²; Laranjeira, Hugo²; Vitorinoand, Ruiz²; Simian, Marina¹; Helguero, Luisa² Instituto de Oncología Ángel H Roffo¹; Universidade de Aveiro, Portugal².

El 70% de los tumores mamarios diagnosticados son positivos para receptores de estrógeno (ER α y ER β) y progesterona. La terapia adyuvante de elección es la terapia endócrina con tamoxifeno (TAM), un modulador selectivo del ER. Sin embargo, dentro de los 15 años 1/3 de las pacientes desarrolla resistencia. Las causas que conducen al desarrollo de resistencia endócrina son todavía debatidas. En nuestro laboratorio caracterizamos al tumor mamario murino M05, que es positivo para ER, estrógeno dependiente y sensible al TAM (M05-S) en los primeros pasajes. A partir del décimo pasaje desarrolla resistencia endócrina (M05-R), por lo que representa un modelo adecuado para el estudio de resistencia endócrina en cáncer de mama en un contexto inmuno-competente. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo a nivel proteómico de pasajes sensibles y resistentes al TAM utilizando el modelo M05. ER α presentó una menor expresión en los tumores M05-R (n= 6 por grupo, $p < 0,05$) tanto a nivel de mensajero como proteico. A pesar de esta diferencia, la actividad transcripcional de ER, medida por la expresión de genes target, fue similar en tumores sensibles y resistentes al TAM. A través de una estrategia de "pulldown" se encontraron 46 proteínas asociadas a ER α en M05-S y 18 en M05-R. En M05-S ER α se vio asociado a proteínas involucradas en: correcto plegamiento, citoesqueleto y biosíntesis de ribosomas y ácidos grasos. En M05-R ER α se observó principalmente asociado a proteínas encargadas de localizar proteínas en retículo endoplasmático. Por otra parte, en la variante M05-R se encontraron exacerbados el ciclo del citrato y de la urea, sugiriendo cambios en el metabolismo celular con la adquisición de hormono-resistencia. Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que la adquisición de resistencia endócrina estaría acompañada por modificaciones en las proteínas y vías de señalización asociadas a ER α , y por alteraciones en el metabolismo tumoral.

496. (575) EFECTO DE HO-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA RESPUESTA ÓSEA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Anselmino, Nicolás; Leonardi, Daiana Beatriz; Cotignola, Javier; Gueron, Geraldine; Vázquez, Elba Susana Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

El cáncer de próstata (PCa) es una de las principales causas de muerte por cáncer en los hombres. El perfil de diseminación del PCa muestra tropismo por el hueso, donde las células tumorales interactúan con el microambiente interrumpiendo el equilibrio del tejido óseo. La inflamación es uno de los principales factores de riesgo para esta enfermedad. En este contexto la hemo oxigenasa 1 (HO-1) emerge como un blanco potencial en el PCa, manteniendo la homeostasis celular y contrarrestando el daño oxidativo e inflamatorio. Previamente documentamos que HO-1 está implicada en el PCa, y que la inducción de HO-1 impide la disminución de la proliferación de osteoblastos provocada por el PCa. El objetivo de este trabajo fue evaluar la función de HO-1 en la interacción del microambiente tumoral y fenotipo menos agresivo y la progresión ósea de la enfermedad a través de un enfoque proteómico y bionfoón célula prostática/célula progenitora del hueso. Se utilizó un sistema de co-cultivo de células PC3 (derivada de PCa humano) con células MC3T3 (precursores de osteoblastos murinos), en el cual ambas líneas celulares comparten el medio pero no se encuentran en contacto directo. Las células PC3 fueron tratadas o no con hemina (inductor de HO-1, 80 μ M, 24h) antes del co-cultivo. Mediante RT-qPCR, utilizando primers específicos humanos y murinos, evaluamos el efecto del co-cultivo y de HO-1 sobre la expresión de genes involucrados en la reacción ósea. El co-cultivo provocó un aumento ($P < 0,05$) en la expresión de DKK1, IKB, FOXO3, IL8 y PTHrP, y dicho aumento fue aún mayor para IKB cuando las células fueron pre-tratadas con hemina ($P < 0,05$). En las células MC3T3 el co-cultivo indujo un incremento ($P < 0,05$) en la expresión de RunX2, Col1a1, Col1a2 y Foxo1, que no fue modificado por el pre-tratamiento con hemina. También se analizó el efecto del co-cultivo sobre la proliferación de ambos tipos celulares. Estos resultados demuestran que existen factores solubles que alteran la expresión de genes involucrados en la respuesta ósea, tanto en las células tumorales como en las precursoras de hueso.

497. 585) CONTRIBUCIÓN DE LAS DIFERENTES FUNCIONES DE B-CATENINA EN LA PROGRESIÓN TUMORAL Y METÁSTASIS EN CÁNCER DE MAMA. ESTUDIO IN VIVO

Rubinstein, Natalia^{1,2}; Saxena, Meera²; Büchel, David²; Valenta, Tomas³; Basler, Konrad³; Christofori, Gerhard² Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina¹; Departamento de Biomedicina, Universidad de Basilea, Suiza²; Universidad de Zurich, Suiza³.

La vía de señalización Wnt/Bcatenina (Bcat) ha sido estudiada en distintos tumores. Bcat es una proteína de acción dual, pudiendo interactuar con E-caderina y participar en uniones celulares, así como translocar al núcleo y regular la transcripción de genes. Para evaluar la contribución de las distintas funciones de Bcat en forma específica en cáncer de mama desarrollamos 3 modelos in vivo con ratones knockout (KO) y knockin (KI) conteniendo el oncogen PyMT. Para investigar la participación de Bcat salvaje en la progresión tumoral se generaron ratones KO condicionales (Bcat fl/fl; MMTV-CRE^{+/+}). El volumen tumoral y metástasis pulmonar no se vieron alterados frente a la ausencia de Bcat. Análisis del DNA y ensayos de inmunofluorescencia de los tumores mostraron que la eliminación de Bcat no fue total. Para investigar este fenómeno, generamos líneas celulares a partir de tumores primarios CRE^{-/-}, que al ser transducidas con un vector conteniendo GFP-IRES-CRE fueron capaces de delecionar el gen Bcat fl/fl y murieron por apoptosis, comparadas con las células control (GFP-IRES).

Para evaluar la contribución de Bcat nuclear sin alterar su función adherente generamos en forma independiente: un ratón KI conteniendo Bcat mutante (DA) incapaz de unirse a Bcl9/L (β cat fl/DA; MMTV-CRE^{+/+}); y otro ratón KI conteniendo Bcat mutante (DC) con el C-terminal deletado e incapaz de unirse a cofactores (β cat fl/DC; MMTV-CRE^{+/+}). Tanto la expresión de DA como DC, redujeron significativamente la progresión tumoral y metástasis. Ambas mutantes funcionaron como dominante negativo cuando Bcat salvaje también estaba presente. Estos resultados sugieren por primera vez que Bcat contribuye de manera diferencial en un modelo de cáncer de mama in vivo. Bcat completa es necesaria para la sobrevida de las células tumorales, mientras que su participación en la progresión y metástasis tumoral depende de su capacidad de unir Bcl9/L y cofactores relevantes en la regulación de genes blancos.

498. (588) RESISTENCIA CONCOMITANTE Y META-TIROSINA EN CÁNCER DE PRÓSTATA HUMANO

Anselmino, Nicolás¹; Carabelos, Noelia¹; Schuster, Federico¹; Manchuca, Damián²; Chiarella, Paula²; Meiss, Roberto³; Ruggiero, Raúl²; Vázquez, Elba Susana¹; Gueron, Geraldine¹

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE)-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 Medicina³

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 reportó que la RC correlaciona con la actividad de factores séricos que inhiben la proliferación de las células tumorales y que se identificaron como una mezcla de meta- y orto-tirosina. Previamente demostramos que tumores de PCa humano creciendo como xenotransplantes en ratones *nude*, exhiben el mismo efecto de RC reportado en tumores LB. El objetivo de este trabajo fue validar a la meta-tirosina como un efector de la RC, y caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno en PCa. Células de la línea humana PC3 se cultivaron durante 24h en presencia de m-Tyr (100 y 150 μ g/ml). Las células controles fueron cultivadas en presencia del vehículo. Los niveles de ARNm de genes involucrados en la carcinogénesis como survivina, MMP9, p21, p27 uPA, Ikb, ciclina D1, Hes 1 y VEGF-C, se analizaron por RT-qPCR. Se detectó una disminución significativa en la expresión de survivina (inhibidor de la apoptosis) y Hes1 (factor de transcripción involucrado en la vía de Notch) cuando las células fueron cultivadas en presencia de m-Tyr ($P < 0,01$). Además, comprobamos que el tratamiento con m-Tyr tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento tumoral, que se correlacionaba con un arresto del ciclo celular en fase G1 determinado por citometría de flujo. En concordancia con estos resultados, la exposición de los cultivos a m-Tyr provocó una disminución de la viabilidad celular detectada por ensayos de MTS. Estos resultados demuestran que m-Tyr ejerce un efecto anti-tumoral en PCa.

499. (590) EL EFECTO RADIOSENSIBILIZADOR DEL SILENCIAMIENTO DE LA PEROXIRREDOXINA II MEDIANTE EL USO DE SIARN ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ESTÁ ASOCIADO CON EL AUMENTO DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Cerda, María B^{1,3,4}; Lloyd, Rodrigo¹; Batalla, Milena^{1,4}; Plank, Cristian²; Mykhaylyk, Olga²; Policastro, Lucía^{1,3,4}
Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)¹; Instituto de Oncología Experimental, UTM, Munich, Alemania²; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³; Instituto de Nanociencia y Nanotecnología⁴

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más frecuente en nuestro país, siendo la radioquimioterapia pre-quirúrgica una de las prácticas de tratamiento más frecuente. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas por la radiación ionizante así como por numerosas drogas quimioterapéuticas lesionan la molécula de ADN, provocando en consecuencia la muerte de la célula tumoral. El sistema antioxidante juega un rol clave en la defensa celular contra este tipo de daño celular. En el presente trabajo se evaluaron los niveles de ROS mediante la detección por citometría de flujo de una sonda que se oxida y fluoresce en presencia de ROS (DCF-DA) en distintas líneas celulares de cáncer colorrectal. Se demostró que los niveles de ROS disminuyen (LoVo>T84 \approx Caco-2>HCT116 \approx HT29) en función del aumento de la radiorresistencia (LoVo<T84 \approx Caco-2<HCT116 \approx HT29). La línea celular radiorresistente HT29 posee los niveles de ROS más bajos mientras que la línea LoVo radiosensible posee los niveles más elevados. Se realizaron ensayos clonogénicos y curvas de sobrevida a fin de evaluar el efecto radiosensibilizador del silenciamiento de la peroxirredoxina II (Prx2) en la línea HCT116 mediante el uso de siARN acoplado a nanopartículas magnéticas. El silenciamiento estable de Prx2 (HCT116shPrx2) o transiente (HCT116siRNAPrx2) produjo un aumento de la radiosensibilidad con un parámetro DER ("Dose Enhancement Ratio") de 1,4 a una sobrevida del 10%, que se correlacionó con el aumento de los niveles de ROS respecto de la línea control ($p < 0,05$). Por otro lado, la tasa de proliferación de las células HCT116shPrx2 disminuyó 1,5 veces respecto de la línea parental ($p < 0,05$). En conclusión, el silenciamiento de la Prx2 produjo un aumento significativo de los niveles de ROS que se asocia a la radiosensibilidad celular, indicando que a pesar de la redundancia del sistema antioxidante, la Prx2 es una enzima clave en control de la radiosensibilidad celular vinculada al estrés oxidativo.

500. (591) CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES EN LA RESPUESTA INMUNE AL ADENOCARCINOMA DE MAMA M-406 DURANTE LA INMUNOEDICIÓN TUMORAL

Del Giudice, Antonela¹; Loterstein, Cecilia¹; Baglioni, María Virginia¹; Menacho-Márquez, Mauricio A^{1,3}; Scharovsky, O. Graciela^{1,2}; Rico, María José^{1,3}; Rozados, Viviana R¹
Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹; CIC-Universidad Nacional de Rosario²; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³

El adenocarcinoma de mama M-406 presenta las tres etapas de la Inmunoedición Tumoral: escape (ES), equilibrio (EQ) y eliminación (EL), cuando es inoculado a ratones de la línea CBI/L. Nuestro objetivo fue caracterizar las células involucradas en la interacción huésped-tumor en EQ, ES y EL en ratones inmunocompetentes ($n=18$) e inmunosuprimidos (IN; $n=6$). La inmunosupresión se realizó por tratamiento continuado con dexametasona (1,86 μ g/mL/día) desde 5 días antes de la inoculación s.c. del tumor. Se determinó el crecimiento tumoral y, por citometría de flujo, el% de linfocitos CD4⁺, CD8⁺, Treg y Th17 circulantes, en condiciones basales (B), en los estadios ES, EQ, EL y en ratones IN antes y en el día12, tras la inoculación del tumor (INT). El tumor mostró en ratones CBI/L las 3 etapas de inmunoedición: 30%(EL), 18%(EQ), 52%(ES) y en ratones IN: 16,7%(EL) y 83,3%(ES). El% de CD4⁺ en B [mediana y rango 30(26-34)] y en EL [21(11-25)] fue menor que en IN antes [46(43-55)] o tras la inoculación del tumor (INT) [64,6(55,4-70)] (Kruskal-Wallis $P < 0,0001$). El% de células CD8⁺ en los animales B [9,2(8-18)] fue menor que en los IN [17,8(14,6-20,4)] e INT [22,5(18-26)]. El% de Treg en los animales B [0,45(0,2-0,6)] fue menor que en EQ [6(2-8)], ES [5,5(1-8)] y EL [5,5(1-9)]. El% de Th17 fue mayor en ES [5,3(1,9-5,8)] y EL [3,5(2,5-6,5)] que en los animales INT [0,3(0,2-0,5)]. En los animales IN el cociente Th17/Treg fue menor ($P < 0,01$) que en los animales INT. Se concluye que: 1) La inmunosupresión modificaría las proporciones en las tres etapas, aumentando ES, disminuyendo EL y anulando EQ; 2) Los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ no presentarían diferencias entre etapas y con el valor basal; 3) Las células Treg aumentarían en las 3 etapas con respecto al

basal sin diferir entre sí; 4) El descenso del% de Th17 en IN e INT reduciría el cociente Th17/Treg lo que explicaría, en parte, el mayor crecimiento de M-406 en animales IN.

501. (595) OPTIMIZACIÓN DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) PARA EL TRATAMIENTO INDIVIDUAL DEL MELANOMA CUTÁNEO

Carpano, Marina¹; Nievas, Susana²; Santa Cruz, Gustavo²; Olivera, María Silvana²; Rodríguez, Carla¹; Perona, Marina¹; Cabrini, Rómulo¹; Boggio, Esteban³; Longhino, Juan³; Juvenal, Guillermo^{1,5}; Pisarev, Mario^{1,4,5}; Dagrosa, Alejandra^{1,5}
Departamento de Radiobiología (CAC), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)-CONICET¹; Departamento Coordinación BNCT (CAC) CNEA²; RA-6 (CAB) CNEA³; Departamento Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁴; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)⁵.

La terapia por Captura Neutrónica de Boro (BNCT) es una modalidad de tratamiento que permite destruir selectivamente células tumorales sin dañar significativamente al tejido normal circundante. En nuestro laboratorio hemos realizado estudios con la finalidad de optimizar BNCT para la aplicación individual de la misma al melanoma cutáneo. Previamente hemos demostrado *in vitro* diferentes patrones de captación de borofenilalanina (BPA). En estudios *in vivo* encontramos una correlación positiva entre la captación de BPA, viabilidad celular y la temperatura tumoral. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la correlación observada entre contenido intratumoral de boro, temperatura y viabilidad se traduce en una mejor respuesta a la irradiación con neutrones. Se utilizaron ratones NIH *nude*, implantados de forma subcutánea (sc) con 3×10^6 de células de la línea MELJ. Los animales fueron divididos en 3 grupos: Control; Neutrones (irradiados) y BNCT (irradiados más BPA). Cada animal fue individualizado y transportado al Centro Atómico Bariloche para ser irradiado en el haz de neutrones térmicos del reactor RA6 (Flujo: $4,96 \times 10^8$ n/cm²seg). Se evaluó el crecimiento tumoral post irradiación. La temperatura tumoral de cada ratón fue medida por termografía infrarroja pre tratamiento, como un indicador no invasivo de cantidad de boro captado. Post tratamiento el grupo BNCT alcanzó un volumen relativo de 3,6 (p^{***}) mientras que para el grupo NCT fue de 28,7 y para el grupo control de 30,8. Dentro del grupo BNCT los animales con temperatura tumoral más elevada ($29,23 \pm 1,17$ °C) presentaron un volumen tumoral menor ($263,58 \pm 0,05$ mm³). La respuesta al tratamiento a los 17 días post irradiación fue de 69,56%, a los 20 días fue de 47,82% y a los 27 días fue de 8,7%. La medición de la temperatura por termografía en cada ratón podría ser usada como un marcador predictivo del éxito terapéutico para la optimización individual de la terapia.

INMUNOLOGÍA SAI 3

502. (311) EFFECT OF LIPOTEICHOIC ACID PURIFIED FROM LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG ON DENDRITIC CELLS ACTIVATION

Friedrich, Adrián; Campo, Valeria; Paz, Mariela Laura; Leoni, Juliana; González Maglio, Daniel
Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA

Lipoteichoic acid (LTA) is a highly immunoreactive surface molecule found in Gram positive bacteria cell wall. It is involved in the development of sepsis, as well as in multiple organ dysfunction syndrome caused by these microorganisms. On the other hand, LTA purified from probiotic bacteria has shown to modulate the immune response in many animal models of different types of pathologies, like inflammatory bowel disease, cancer and allergy. In this context, our hypothesis is that one of the major cells that are modulated by LTA are Dendritic cells (DCs), increasing or decreasing their coestimulatory molecules expression. We used Bone Marrow-derived DCs (BMDCs) from SKH:1 mice to assess the effect of LTA purified from *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG)

on DCs activation. There are many different protocols to differentiate BMDCs regarded to time of culture and concentration of GM-CSF that yield different degrees of maturation and amounts of DCs (CD11c+ cells). Therefore, we evaluated by Flow Cytometry different culture times and GM-CSF concentration conditions to yield large quantities of immature DCs (iDCs), which could then be matured by the addition of *E. coli* LPS (mDCs). We chose a 9 days culture period and the addition of 30% of J558 supernatant (GM-CSF source). This procedure showed mDCs with a 1.2 fold increase in CMHII+ mean fluorescence intensity (MFI), a 2.2 fold increase in CD40+ MFI and a 2.0 fold increase in CD80+ MFI compared to iDCs. The stimulation of iDCs with 1 and 10 µg LTA from LGG showed a 1.5 and 1.4 fold decrease respectively in CD40+ MFI compared to unstimulated iDCs and 2.0 and 1.9 fold compared to mDCs. Then, we evaluated the activation of mDCs pulsed for 4 hs with LTA from LGG. These cells decreased 1.3 fold in CD40+ MFI compared to mDCs. No differences were observed in CD80 or MHC-II. This work shows that LTA from LGG could affect DCs activation by decreasing co-stimulatory molecules in order to modulate the immune response.

503. (547) DEVELOPMENT OF HIGHLY IMMUNOSTIMULATING PARTICLES FOR VACCINE FORMULATIONS

Bertona, Daiana G.^{1,2}; Marcipar, Iván S.¹; Bontempi, Iván¹; Calvino, Luis³; Nicastro, Alcides²; Pujato, Nazarena¹
Laboratorio de Tecnología Inmunológica¹ Lipomize SRL² Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA³

Subunit vaccines are very safe but in turn bring low immunological responses. The new generation of adjuvants as ISCOMATRIX (IMX) is currently changing this paradigm. In fact, this adjuvant promotes an effective immunological response against intracellular pathogens infections in many animal models, producing a balanced humoral/cellular immune response. However, this adjuvant is expensive and not commercially available any more. To develop immunostimulating particles based on the same active ingredients than IMX, in a previous work we prepared different formulations containing saponin, cholesterol and phospholipids and we selected the most suitable, named ISPA, according to molecular size, stability, robustness, costs and immunostimulating properties. The aim of the present work was to further progress in the assessment of the performance of ISPA comparing to other usual veterinary adjuvants: IMX, Aluminum hydroxide (AlH), Aluminum hydroxide + saponin (AlH+sap), oil adjuvant Montanide™ ISA206 (ISA), complete Freund adjuvant (CFA) and Saponin. Bovine serum albumin (10 µg) was formulated with each adjuvant and inoculated, subcutaneously, in 5 Balb/c mice groups at days 0 and 15. IgG subclasses were determined by ELISA assays to compare the immune response profile induced by the different adjuvants. ISPA induced higher significant IgG2 titers than AlH, AlH+sap and ISA and comparable to the titers raised with IMX and CFA (p < 0.05). IgG1 titers were similar to those obtained with the other adjuvants. Interestingly, IgG2a/IgG1 ratio was greater than 1 and equivalent to the ratio obtained with IMX (p < 0.05), suggesting a balanced humoral/cellular immune profile. Our results indicate that in addition to allow similar performance than IMX, ISPA have shown to be a versatile, well-tolerated, low cost, easy to use and reproducible adjuvant. Efficacy of ISPA with other antigens and with other species is in progress.

504. (749) FAS APOPTIC PATHWAY IN A PERFORIN-DEFICIENT PATIENT

Korol, Cecilia Belén; Fortunatti, Daniela; Oleastro, Matías; Pérez, Laura
Hospital de Pediatría Garrahan

Activation-induced cell death (AICD) is a key mechanism of T lymphocyte homeostasis in humans. The Fas/FasL and the cytolytic granule pathways have been described as essential actors of AICD. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and Hemophagocytic Lymphohistiocytosis are two forms of lymphoproliferative disorders in patients expressing defective Fas pathway or defective cytotoxic granule function respectively. It has been shown

that in a setting of Fas deficiency, the cytolytic granule pathway may compensate the Fas defect (Mateo et al 2007). According with that, since ALPS T cells were found to overexpress lytic-granule content in the periphery, we decided to explore the extent of Fas expression and Fas-induced apoptosis of T cells genetically deficient in perforin in order to broaden the characterization of the cross-talking between both pathways. Patient: 2-year-old girl with familial lymphohistiocytosis type-2 carrying 2 heterozygous *Perforin* mutations, leading to impaired cytotoxicity. She had not experienced accelerated phase and she was not under treatment at the moment of the study. Her brother, harboring the same mutations, did experience the accelerated phase of the disease. Methodology: Fas expression was determined by flow cytometry on peripheral T cells at days 4, 6 and 8 after activation with PHA/IL-2. For Apoptosis detection PBMCs were activated by PHA/IL2. Fas sensitivity was tested using cross-linked anti-CD95 mAb APO1.3. For quantification, cells were resuspended in a hypotonic solution of propidium iodide. Results: Fas expression on T-cell blasts from the patient, after activation with Phytohemagglutinin and IL2 did not reach the values of the control cells at any activating time. Fas induced Apoptosis at 25 and at 2.5 ng APO1-3/ml was not significantly different to 30 normal controls. Conclusion: The evaluated parameters in this patient do not show evidence of potential compensation in any extent from Fas pathway to perforin deficiency.

505. (527) CTSL FROM FIBROBLASTIC RETICULAR LYMPH NODE CELLS NEGATIVELY REGULATES CONVERSION OF CD4 CELLS TO THE TREG CELL PHENOTYPE

Maglioco, Andrea Florencia; Camicia, Gabriela; Badano, María Noel; Costa, Héctor; Camerano, Gabriela; Piazzon, Isabel; Nepomnaschy, Irene
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina

Cathepsin L (CTSL) is a lysosomal cysteine peptidase with diverse and highly specific functions. We and others have shown that CTSL is involved in thymic CD4+ T-cell positive selection. Using CTSL^{nkt/nkt} mice that lack CTSL activity we have previously demonstrated that the absence of CTSL activity correlates with increases both in the number of lymph node (LN) and spleen CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) cells and in the ratio between CD4+ Treg and CD4+CD25-Foxp3- (T conv) cells within CD4+ cells. Contrarily, CTSL^{nkt/nkt} and wt mice show no differences both in the number of thymic CD4+CD8- Foxp3+ cells or in the ratio between Treg and Tconv cells within CD4+CD8- thymocytes, suggesting that the increase in the number of LN Treg cells is established in the periphery of mutant mice. Herein we analyzed whether conversion is involved in the increase in the Treg peripheral cell number in CTSL^{nkt/nkt} mice and the involvement of LN stromal cells (LNSC). LN CD4+CD25-Foxp3-cells activated with anti-CD3, anti-CD28 and IL-2 but without exogenous TGF- β , were cultivated with supernatants (sn) from mutant or wt LNSC. Conversion was significantly increased by the addition of mutant vs wt LNSCsn (i.e. percentage of Treg cells in CTSL^{nkt/nkt} Tconv cells cultured with mutant or wt LNSCsn: 15.8 \pm 2 vs 7.3 \pm 1.2, n=3, p<0.01). These Treg percentages significantly diminished in the presence of a TGF- β inhibitor. The mutant LNSC produced more TGF- β , than that of wt mice (mutant vs wt LNSC sn, in pg/ml: 1618 \pm 198 vs 245 \pm 12.3, p>0.01, n=3; measured by ELISA). More than 97% of both mutant and wt LN stromal cell lines were gp38 + CD35-CD21-, indicating a fibroblastic reticular phenotype. These results indicate that conversion can play a role in the increase of Treg cells in the periphery of CTSL^{nkt/nkt} mice being TGF- β production by fibroblastic reticular LN stromal cells involved. Moreover, they suggest that CTSL is able to negatively regulate the conversion to Treg cells in non immunoprivileged sites.

506. (663) MYELOID IMMATURE CELLS (GR-1+CD11B+) ACQUIRE THEIR INHIBITORY PROPERTIES IN THE BONE MARROW, AND MIGRATE TO LYMPH NODES TO EXERT THEIR FUNCTION

Landoni, Verónica Inés; Martire-Greco, Daiana; Rodríguez-Rodríguez, Nahuel; Chiarella, Paula; Schierloh, Pablo;

Rearte, Bárbara; Isturiz, Martín Amadeo; Fernández, Gabriela Cristina

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

Lymph nodes (LN) from LPS-immunosuppressed (IS) mice have a decreased T cell (Ly) proliferation, associated to an increase of myeloid derived suppressor cells (MDSC, Gr-1+CD11b+). Moreover, MDSC from bone marrow (BM) of IS mice also exhibited an inhibitory activity towards Ly proliferation. Our aim was to evaluate whether MDSC acquire their immunosuppressive properties in BM and then migrate to LN to exert their function, and evaluate their inhibitory mechanisms. We found that the inhibition of Ly proliferation by BM-IS was accompanied with an increase in cells expressing inducible nitric oxide (NO) synthase (Gr-1+CD11b+iNOS+) and reactive oxygen species (ROS) (Gr-1+CD11b+DHR+) determined by FACS (p<0.05). When iNOS and ROS were blocked (using L-NAME or Catalase), Ly proliferation was restored to control levels. To determine whether BM Gr-1+CD11b+ cells from IS mice migrate to LN *in vivo*, Ctrl and IS BM cells were stained with CFSE and injected i.v. to Ctrl and IS mice in all possible combinations. After 3h, LN were collected and the% of Gr-1+CD11b+CFSE+ cells was measured by FACS. We found an increased percentage of Gr-1+CD11b+CFSE+ cells in LN only when BM-IS cells were injected to IS mice (p<0.05). Accordingly, BM-IS cells showed an increased CCR7 expression, a chemokine receptor involved in migration to LN (p<0.05). Alternatively, the chemoattractant activity of LN was assayed using conditioned media (CM) from Ctrl or IS LN in a transwell system. The% and number of migrated Gr-1+CD11b+ cells was higher in the presence of IS LN CM (p<0.05). Finally, we found that soluble factors present in the CM from BM of IS mice were able to transform Ctrl BM cells into inhibitory cells towards Ly proliferation (p<0.05). These results indicate that soluble factors from IS-BM are necessary to induce inhibitory properties in Gr-1+CD11b+ cells and that the ability of these cells to migrate to LN resides both in the cell itself and in signals delivered from the IS context.

507. (674) ENVIRONMENTAL CONDITIONS PERCEIVED BY THE BRAIN REGULATE PATHOGEN-INDUCED IMMUNE RESPONSES

Canali, Magdalena; Daoudliarian, Douglas; Guyot, Melanie; Murriss, Emilie; Soria, Javier; Mougneau, Eveline; Blancou, Phillip; Glaichenhaus, Nicolás

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), CNRS. France

We are interested in elucidating how the brain controls the immune system. To this aim, we have established and validated an environmental enriched (EE) paradigm in which C57BL/6 mice experience higher levels of sensory, motor, social, and cognitive stimuli, compared to animals housed in a standard environment (SE). In agreement with previous studies, we found that EE increased hippocampal neurogenesis and synaptogenesis at the cellular level, and decreased anxiety and increased exploratory activity at the behavioral level. EE housing did not result in gross alterations in the number of major immune cell types in immunologically naïve animals. However, EE mice were both more resistant to influenza virus infection and more susceptible to lipopolysaccharide (LPS)-induced lethal shock compared to SE mice. As a first step to elucidate the mechanisms that were responsible for these differences, we purified macrophages from SE and EE mice and we compared their transcriptome before and after incubation with LPS or poly(I:C). While transcriptome comparison did not reveal gross differences between SE and EE macrophages, several cytokine genes including *IFNA2*, *IFNA5*, *IFNA12*, *IFNA13*, *IFNB1*, *IFNAB*, *IL6* and *IL1B* were differentially regulated in EE and SE macrophages in response to poly(I:C), therefore providing a possible explanation for the increased resistance of EE mice to influenza virus infection. Interestingly, such a phenomenon was not observed when macrophages were incubated with LPS. Likewise, serum levels of major inflammatory cytokines were similar in SE and EE mice after LPS injection. Therefore, the increased susceptibility of EE

mice to LPS-induced lethal shock did not result from an increased production of cytokines, but rather from another mechanism that remains to be elucidated.

508. (709) INDUCTION OF TH2-MEDIATED ALLERGIC ASTHMA IN A MOUSE STRAIN HIGHLY SUSCEPTIBLE TO DEVELOP TH1 RESPONSES

Godoy, Gloria Janet¹; Sánchez, Leonardo Rodolfo¹; García, Luciana²; Maldonado, Cristina²; Motrich, Rubén Darío¹; Virginia, Elena Rivero¹
Dpto. de Bioquímica Clínica, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET-UNC²

NOD mice are highly susceptible to chronic inflammation disorders mostly mediated by Th1 responses. This increased susceptibility has been thought to be related to defects in regulatory T cells (Tregs). Recent findings evidenced that Tregs subsets are heterogeneous and that different Tregs subsets able to specifically regulate Th1, Th2 and Th17 immune responses would exist. In this work, we developed a model of allergic asthma following established immunization protocols with OVA plus aluminum salts in NOD, C57BL/6 and Balb/c mice. We aimed to analyze if regulatory defects observed in NOD mice were general or just restricted to Th1 responses. After immunization, mice from every strain showed clinical signs and symptoms of allergy when challenged with OVA intranasally. Although increased leukocyte counts in bronchoalveolar lavage (BAL) were detected in both immunized NOD and Balb/c mice, the highest levels were seen in Balb/c mice ($p < 0.05$). Bronchoalveolar eosinophil recruitment showed to be high, mild and almost null in immunized Balb/c, NOD and C57BL/6 mice, respectively. Moreover, markedly increased, mildly increased and null levels of IL4 and IL5 were respectively detected in BAL from immunized Balb/c, NOD and C57BL/6 mice. Lymph node and spleen mononuclear cell cultures revealed that: a pure Th1 specific immune response is induced in C57BL/6 mice, a mixed Th1/Th2 specific immune response is induced in NOD mice, and a pure Th2 specific immune response is induced in Balb/c mice. Serum OVA-specific IgE levels were positive in all strains, but the highest levels were shown in Balb/c mice ($p < 0.05$). Our results show that although NOD mice mainly induce Th1 responses, they are also able to develop Th2 immune responses. However, these observed Th2 responses developed by NOD mice were much less intense than those shown by Balb/c mice. Although preliminary, our results suggest that NOD mice have impaired immune regulatory capabilities mainly restricted to Th1 responses.

509. (550) POOR CYTOTOXIC RESPONSE IN LEUKOCYTE SPECIFIC PROTEIN-1 DEFICIENT MICE IS ASSOCIATED WITH A REDUCED CROSS-PRESENTATION BY CD8+ DCS

Acland Strack, Rachel Paola; Zacca, Estefanía; Pistoresi, María Cristina; Maletto, Belkys; Morón, Gabriel
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

The leukocyte-specific protein 1 (LSP1), is a 52-kDa cytoplasmic F-actin binding phosphoprotein expressed in leukocytes and endothelial cells that regulates cytoskeleton thus cell motility and polarization. It has been reported that human and murine LSP1^{-/-} dendritic cells (DCs), infected with HIV show decreased proteasome degradation and altered intracellular trafficking of virus. This unexpected finding suggests a putative role of LSP1 in antigen cross-presentation in DCs. To investigate this hypothesis, we measured the ability of LSP1^{-/-} DCs pulsed with an exogenous antigen (ovalbumin, OVA) plus polyuridylic acid (PU, a TLR7 ligand) to induce cytotoxic response. We found that wild-type (WT) mice that received the OVA/PU-pulsed LSP1^{-/-} DCs had a lower CTL response (30±8% of specific lysis) compared to mice transferred with OVA/PU-pulsed WT DCs (64±3%, $p < 0.01$). WT and LSP1^{-/-} splenocytes or BMDCs showed no differences in OVA uptake. Using a H2-K_b-restricted OVA₂₅₇₋₂₆₄ epitope CD8⁺ T cell hybridoma,

we found that LSP1^{-/-} CD8a⁺ DCs have a lower ability to activate CD8 T cells when pulsed with whole OVA in comparison to WT CD8a⁺ DCs, but the same ability when DCs are pulsed with the peptide OVA₂₅₆₋₂₆₄, revealing a role for LSP1 in antigen cross-presentation. We have previously showed no differences in DC and other leukocyte content in the spleen of WT vs LSP1^{-/-} mice as well as a similar ability in DCs to mature upon TLR7 stimulation. Furthermore, we analyzed the ability of LSP1^{-/-} DCs to migrate to lymphoid tissues. By flow cytometry we observed a delayed DC arrival to draining lymph nodes after subcutaneous injection of LSP1^{-/-} DCs into wt mice, compared to injected WT DCs ($p < 0.001$ 24h, ns 48h post injection) showing that LSP1^{-/-} DCs have an impaired migratory activity compared to WT mice. In conclusion, LSP1 is involved in antigen cross-presentation and cell migration in DCs in a way that its lack results in decreased cytotoxic responses.

510. (140) THE PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 SUBUNIT RV2241 (ACEE) OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IS DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN LOCAL CLINICAL ISOLATES AND IS IMMUNOGENIC IN PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS

Schierloh, Pablo¹; Klepp, Laura²; García, Marina¹; Vázquez, Camila²; Rocha, Roxana V²; Blanco, Federico²; López, Beatriz³; Ritacco, Viviana³; Sasiain, María Del Carmen¹; Bigi, Fabiana²
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET¹ Instituto de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA)-INTA, Hurlingham² Reference Laboratory for Mycobacteria, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS³

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), formerly regarded as highly conserved specie, displays a considerable degree of genetic variability that can influence the outcome of the disease as well as the innate and adaptive immune response. By proteomic approaches we searched for proteins that were differentially expressed between two local clinical isolates, one from Latin-American-Mediterranean (LAM) and other from Harlem (H) lineages. In order to analyze the immunogenic ability of differentially expressed proteins, we cloned and produced recombinant fusion proteins and tested specific antibody and cell mediated immune responses in TB patient samples (n=40). Besides, we applied a battery of immunoinformatic tools in order to contrast our experimental results. We identified seven differentially expressed proteins that were confirmed at transcriptional level. Four of these proteins were successfully cloned: Rv2241, Rv0009, Rv0407 and Rv2624c. We found that all these proteins are able to induce humoral and T-cell mediated IFN- γ (IGRA) responses in patients with drug-sensitive and drug-resistant tuberculosis. However, ROC analysis indicates that only anti-Rv2241 serological response exhibits considerable potential as TB biomarker (Area under ROC $\geq 85\%$, $p < 0.001$). Consistently, bioinformatics predictions confirmed that Rv2241 exhibits higher immunogenic potential at the level of linear B-cell epitopes ($p < 0.01$), conformational B cell epitopes ($p < 0.05$) and MHC-I and MHC-II binding peptides ($p < 0.01$) compared with the other three proteins. Herein we identified a new *Mtb*-antigen that is differentially expressed in a local clinical isolate and that induces an antibody response with potential as disease biomarker.

511. (330) B. ABORTUS INFECTION MODULATES OSTEOCYTE FUNCTION

Pesce Viglietti, Ayelén Ivana; Gentilini, María Virginia; Arriola Benítez, Paula Constanza; Velásquez, Lis Noelia; Giambartolomei, Guillermo Hernán; Delpino, María Victoria
Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA

Osteoarticular brucellosis is the most common localization of human active disease. Osteocytes are the most abundant cells of bone. They secrete factors that regulate osteoclast differentiation (cells involved in bone resorption). The aim is to determine if *Brucella abortus* (*Ba*) infection modifies osteocyte (MLO-Y4) function. Cytokine and chemokine production was determined by

ELISA, osteoclast differentiation was determined by microscopy as the number of multinucleated cells that express tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Conexin 43, E11/gp38, integrin- α and - β , tubulin- α , CD44 expression was determined by qRT-PCR. Apoptosis was determined by Hoechst dye 33342 (microscopy) and by Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) (cytometry). *Ba* infection induced the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α , but not IL-1 β), KC and RANKL (the main regulator of osteoclastogenesis) by osteocytes. In inflammatory condition TNF- α could be also involved in osteoclastogenesis. Our results indicated that supernatants from *Ba* infected osteocytes could induce osteoclast differentiation of monocytes in the presence of M-CSF ($p < 0.001$). Using a neutralizing antibody against TNF- α or osteoprotegerin (OPG), RANKL's decoy receptor, we determined that TNF- α and RANKL are involved in osteoclastogenesis induced by supernatants from *Ba*-infected osteocytes, since the number of TRAP⁺ multinucleated cells were significantly reduced ($p < 0.01$). Conexin 43 and accessory molecules such as E11/gp38, integrin- α and - β , tubulin- α , and CD44 are involved in cell-cell interaction necessary for osteocyte survival. *Ba* infection inhibits the expression of all molecules studied ($p < 0.05$). This indicated that *Ba*-infection could alter osteocyte survival. We found that *Ba* infection induced osteocyte apoptosis, Hoechst dye 33342 ($p < 0.01$) and Annexin V-FITC/PI ($p < 0.01$). Taking together our results indicated that *Ba*-infection could alter osteocyte function contributing to bone damage.

512. (445) STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROTEIN A AS A POTENTIAL TARGET TO CONTROL OSTEOCLASTOGENESIS DURING CHRONIC OSTEOMYELITIS

Mendoza Bertelli, Andrea¹; Delpino, María Victoria²; Sordelli, Daniel¹; Gómez, Marisa¹

*Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-CONICET-UBA*¹ *Instituto de Inmunología Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA*²

Staphylococcus aureus is one of the most prevalent pathogen that causes osteomyelitis in adults. *S. aureus* protein A (SpA) is a virulence factor that interacts with the TNF receptor 1 and mimics TNF- α signaling. Given the importance of TNF- α in the induction of osteoclast differentiation and the regulation of bone metabolism, we hypothesize that SpA may contribute to increase osteoclastogenesis. Bone marrow-derived macrophages (BMM) were stimulated with SpA, *S. aureus* or the isogenic *spa*-mutant in the presence of M-CSF during 9 days and multinucleated TRAP positive cells were enumerated. A significant increase in the number of cells differentiated to osteoclasts (OC) in response to SpA ($p < 0.001$) and *S. aureus* ($p < 0.01$) was observed. Osteoclastogenesis was significantly lower in cells stimulated with the *spa*-mutant ($p < 0.05$) and in cells stimulated with *S. aureus* in the presence of an anti-protein A antibody (α -SpA ab) ($p < 0.05$). Similar results were obtained using human monocytes as a source of osteoclast precursors. *S. aureus* induced a significant increase in the levels of RANK and CK expression ($p < 0.05$; $p < 0.01$) molecules that are known to be highly expressed in osteoclasts, whereas their induction was significantly decreased in response to the *spa*-mutant ($p < 0.05$; $p < 0.01$). An increase in MMP9 gelatinase activity was observed by zymography in supernatants from *S. aureus* stimulated cells whereas the MMP9 activity was lower in response to the *spa*-mutant. Moreover, a reduction in MMP9 activity in supernatants from cells stimulated with *S. aureus* in the presence of an α -SpA ab was observed. Osteoclasts differentiated in response to *S. aureus* were able to resorb dentine whereas cells stimulated in the presence of the *spa*-mutant did not form resorption pits. These results suggest that *S. aureus* protein A significantly contributes to osteoclast differentiation and it may play a critical role in the increased bone resorption that occurs during chronic osteomyelitis.

513. (565) STUDY OF FOXP3+ REGULATORY T CELL RESPONSES DURING EXPERIMENTAL TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION

Araujo Furlan, Cintia L; Tosello Boari, Jimena; Canale, Fernando; Beccaria, Cristian; Flocca Vernengo, Facundo; Gruppi, Adriana; Montes, Carolina; Acosta Rodríguez, Eva

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (TR) have a dual role during infections as they limit immunopathology but also restrain immunity to the pathogen. Regulatory responses during *T. cruzi* (Tc) infection have been poorly characterized and TR role remains controversial. Previous results show that TR frequency is reduced in periphery upon Tc infection and that TR show upregulation of PD1, CTLA4, CD103 and CXCR3 expression. Here, we aimed at elucidating the causes of TR frequency reduction and studying the effector function and biological relevance of TR during Tc infection. Using Foxp3-GFP reporter mice, we determined that apoptosis of TR was increased upon infection but to a similar extent than in conventional CD4 T cells (TC), ruling out disproportionate death as cause of the reduced TR frequency. Next, we evaluated generation of inducible TR (iTR) by adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺GFP-TC into WT hosts. High% of iTR was detected in mesenteric lymph nodes of transferred non-infected (NI) mice, but this% was diminished in infected (INF) mice, suggesting a reduced generation of iTR during Tc infection. In agreement, the% of TR expressing Neuropilin1 and Helios (natural TR markers) was increased in periphery. As TR show activation signs that may correlate with enhanced suppressive capacity, we tested TR function by conventional in vitro suppression assays. Proliferation analysis showed that TR purified from NI and INF mice showed a similar suppressive capacity, indicating a conserved TR function. To address the biological relevance of the reduced TR frequency, we treated INF mice with all-trans retinoic acid (atRA) that increases TR numbers modulating TR/Th17 balance. In vivo atRA treatment did not increase the% of TR in any organ from INF mice. Though, in vitro atRA treatment of naïve TC cells from NI or INF mice generated large numbers of iTR. Currently we are studying stability and function of atRA iTR and their possible therapeutic use to modulate Tc infection.

514. (596) ROLE OF BORDETELLA PERTUSSIS IRON TRANSPORTER IRP1-3 IN INFECTION

Cafiero, Juan Hilario; Álvarez Hayes, Jimena; Lamberti, Yanina Andrea; Rodríguez, María Eugenia

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)-UNLP-CONICET

Bordetella pertussis (*Bp*), the causative agent of whooping cough, has the ability to survive inside macrophages in compartments with early endosome characteristics. IRP1-3, a newly proposed vaccine antigen, is one of *Bp* high affinity iron transporters and the only active at the pH inside early endosomes. To control a bacterial infection, IFN gamma is produced by the host. This cytokine depletes iron from phagocytic cells, in order to restrict the growth of intracellular pathogens which might determine low iron availability in *Bp* niche of persistence. The aim of this study was to determine the role of IRP1-3 in *Bp* pathogenesis. To this end, a *Bp* IRP1-3 null mutant strain was constructed and showed no differences in growth under *in vitro* conditions compared to the wild type strain. Both strains were compared in an infection assay of PMA differentiated IFN- γ treated THP-1 cells. Immunofluorescence microscopy showed that *Bp* Δ IRP1-3 strain adhered significantly less ($p < 0.01$) than the wt strain to THP-1 cells, suggesting that either IRP1-3 is an adhesin or the lack of this transporter affects other adhesins on the bacterial surface. The intracellular survival of both strains inside THP-1 cells was analyzed in a polymyxin B protection assay, and the CFU/THP-1 was enumerated at 2, 24 and 48 hours post infection (pi) and normalized to the attachment level of each strain. *Bp* Δ IRP1-3 survived less than the wt strain at all time points tested ($p < 0.01$), indicating that IRP1-3 is required for intracellular survival. To further analyze the role of IRP1-3 *in vivo*, female BALB/c mice were infected intranasally with either *Bp* wt or *Bp* Δ IRP1-3 and the lung colonization was evaluated at 0 and 6 days post infection. The mutant strain colonized in a lesser extent the lungs than the wt strain at day 6 pi ($p < 0.001$), confirming that IRP1-3 plays a role in *Bp* infectious process. Overall, these preliminary results point at IRP1-3 as a relevant factor in *Bp* pathogenesis.

515. (598) ASSOCIATION BETWEEN INCREASED AEROBIC GLYCOLYSIS AND APOPTOSIS IN CD4+ T CELLS INDUCED BY HIV-1 INFECTION

Duette, Gabriel¹; Palmer, Clovis²; Rubione, Julia¹; Pereyra Gerber, Pehuén¹; Geffner, Jorge¹; Ostrowski, Matias¹
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (INBIRS)-CONICET-UBA¹ Center for Virology, Burnet Institute, Melbourne, Australia²

Background: HIV-1 infection is characterized by depletion of CD4+T cells concurrently with chronic immune activation. Activated lymphocytes undergo a metabolic switch from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis, being the up-regulation of Glucose Transporter 1 (Glut1) a critical step in this process. We have recently shown that Glut1 expression is increased in HIV-1-infected patients and correlates inversely with CD4+ counts. Our objective is to analyze the relationship between HIV-1 infection, metabolic switch and apoptosis in CD4+ T cells. Methods: Glut1 surface expression during HIV-1 infection *in vitro* was evaluated by FACS analysis in CD4+T cells from healthy donors (n=8) infected with different doses of NL4-3 HIV-1. Glucose uptake and intracellular L-lactate production were determined by a fluorescent glucose analog (2-NBDG) and Glycolysis Cell-based Assay Kit respectively, and analyzed by FACS. Apoptosis in Glut1(+) or Glut1(-) CD4+ T cell subpopulations was evaluated by Annexin-V staining. Results: *In vitro* infection of CD4+ T lymphocytes with HIV-1 increased cell-surface Glut1 expression (p=0.0058), glucose uptake (p=0.0365) and intracellular L-Lactate production (p=0.014), showing an increase in the rate of aerobic glycolysis. Up-regulation of Glut1 positively correlated with the percentage of HIV-1 infection (r= 0.9228, p< 0.0001) and inversely with CD4 counts (r=-0.9368, p< 0.0001). CD4+T cells that up-regulated Glut1 expression exhibited a higher percentage of Annexin-V staining as compared to Glut1(-) cells (p=0.0093). Conclusions: During HIV-1 infection *in vitro*, CD4+ T cells exhibit an exacerbated rate of aerobic glycolysis that is associated with apoptosis, suggesting that HIV-1-induced metabolic exhaustion could contribute to the depletion of CD4+T cell counts observed in HIV-1-infected patients. This data suggests that glucose metabolism could be a new therapeutic target to restore the CD4+ count in HIV-1 patients.

516. (631) CISTEÍN PROTEINASA B (CPB) RECOMBINANTE DE *L. BRAZILIENSIS* EN EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS EN ARGENTINA

Czenter, Lucas¹; Bivona, Augusto E^{1,2}; Bracamonte, Me³; Nevot, Cecilia⁴; Estvez, O⁴; Eiras, Diego F⁴; Sánchez Alberti, Andrés^{1,2}; Cerny, Natacha^{1,2}; Cardoso Landaburu, Alejandro¹; Marco, Diego J³; Malchiodi, Emilio L^{1,2}; Cazorla, Silvia I^{1,2}

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) UBA-CONICET¹ Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)-UBA-CONICET² Instituto de Patología Experimental (IPE)-CONICET-UNSa³ Veterinaria del Oeste, Misiones⁴

La leishmaniosis es endémica en 88 países, y se considera que 350 millones de personas corren riesgo de infectarse. El diagnóstico sigue siendo un reto a pesar de los avances en el desarrollo de métodos parasitológicos, serológicos y moleculares. Nos propusimos estudiar, mediante un ensayo de ELISA, al antígeno recombinante CPB de *Leishmania braziliensis* y sus dominios (N- y C-Terminal) en la detección de leishmaniosis y el diagnóstico diferencial de infecciones por *Trypanosoma cruzi*, fuente de reactividad cruzada. Estudiamos sueros de perros procedentes del Noroeste Argentino (NOA) (80) y del NEA (41), de los que disponíamos de datos epidemiológicos y/o clínicos, por IFI frente a promastigotes de *L. braziliensis*, y ELISAs frente a los mencionados antígenos, y frente a un lisado de *L. braziliensis* (F45). Encontramos valores de sensibilidad (S): 95, 85 y 81% para la CPB, dominio N- y C-Terminal, respectivamente. En los sueros positivos para la CPB y sus dominios, descartamos la infección por *T. cruzi* por immunoblotting frente a los antígenos específicos: cruzipaína, Tc52 y Tc24. Adicionalmente, sueros positivos por HAI

y ELISA para Chagas, fueron negativos por ELISA para CPB y sus dominios, indicando una Especificidad (E) de 92, 68y 82% y VPP de 96, 78, 90% respectivamente. Se consideraron verdaderos positivos a los sueros de perros positivos en la citología de las lesiones o serología IFI y rK39. Paralelamente, estudiamos 23 sueros humanos. En 44% confirmamos la infección por *T. cruzi* por HAI y ELISA frente a una fracción soluble de antígenos de *T. cruzi*. El 100% de los sueros positivos por dichas técnicas fueron negativos por ELISA para la CPB y sus dominios. La CPB, presentó valores de S de 100%, mientras que para los dominios N- y C- fueron de 63 y 61%, respectivamente. La alta sensibilidad y especificidad de la CPB sobre sus dominios la avalarían como un potencial antígeno en el diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina y humana.

517. (646) INFLAMMATORY RESPONSE SUPPRESSION BY *BORDETELLA PERTUSSIS* TOXINS

Valdez, Hugo Alberto; Oviedo, Juan Marcos; Rodríguez, María Eugenia
Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)-UNLP-CONICET

Whooping cough is a reemerging disease caused by *Bordetella pertussis* (Bp). Our laboratory recently demonstrated that Bp is able to survive and replicate inside macrophages. Several studies have reported that intracellular pathogens would have the ability to manipulate the host transcriptional response to achieve survival, but little is known about the effectors of this manipulation. Bp most relevant factors are adenylate cyclase toxin (CyaA) and pertussis toxin (Ptx). To examine the role of these toxins during intracellular survival of Bp, we studied comparative infections caused by Bp wild type (wtBp), Bp lacking the expression of CyaA (BpΔCyaA), and Bp lacking the expression of Ptx (BpΔPtx). We investigated the expression of host cell genes involved in the inflammatory response, such as TNF-α, IL-8 and NFK-β. Using THP1 cell model mRNA was recovery at 3-, 24- and 48 h after infection. Intracellular infection with wtBp caused a strong up-regulation of TNF-α, IL-8 and NFKB at 3h post infection. The expression of these genes showed a progressive down modulation in macrophages infected with wtBp from 3- to 48-h post-infection. The same down modulation was observed in macrophages infected with either mutant only in the case of NFKB. Conversely, TNF-α expression was up-regulated 5- and 7-fold in BpΔCyaA and BpΔPtx infected cells, respectively, at 48-h post infection. Similarly, IL-8 expression was up-regulated 6-fold and 7-fold in BpΔCyaA and BpΔPtx infected cells, respectively, 48 hour post infection. These results suggest that Bp is able to manipulate the inflammatory response of the host cell and that this ability is dependent on these two toxins. Importantly, intracellular survival studies showed a significant decrease in bacterial viability of either mutant. Taken together these results indicate that the ability of Bp to control the regulatory mechanisms of cytokine production might guarantee its permanence and persistence.

518. (690) ALTERNATIVE ROLE OF PLATELETS IN THE PATHOGENESIS OF HAEMOLYTIC URAEMIC SYNDROME (HUS)

Abrey Recalde, María Jimena¹; Amaral, María Marta²; Álvarez, Romina²; Alberto, Fabiana¹; Mejías, María Pilar¹; Ramos, María Victoria¹; Fernández-Brando, Romina Jimena¹; Exeni, Ramón³; Alconcher, Laura⁴; Palermo, Marina Sandra¹

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET¹ Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA² Departamento de Nefrología, Hospital Municipal del Niño, San Justo³ Unidad de Nefrología Infantil, Hospital Dr. José Penna, Bahía Blanca⁴

Typical HUS is caused by Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* infections and is characterized by haemolytic anaemia, thrombocytopenia and acute renal failure. Stx induce endothelial damage. The injured endothelium release vasoactive substances that lead to platelet activation and subsequent adhesion to form the

clot. Platelets contain CD40L stored in alpha granules. Upon activation, CD40L is exposed at the platelet surface, and cleaved to generate a soluble product that interacts with its widely expressed receptor CD40. Thus, sCD40L induces the release of tissue factor by monocytes and proinflammatory cytokines, as IL-8 and MCP-1 by endothelial cells, leading to prothrombotic and proinflammatory state that could contribute to HUS pathogenesis. The aim of this work was analyze the platelet activation and its inflammatory function, through the sCD40L release in a HUS context. Cocultures of human glomerular endothelial cells (E) and platelets (P) were made. E were culture in medium with or without Stx, 0.1ng/ml (S0.1) y 1 ng/ml (S1). After 24 h, P were added for 1 h. sCD40L levels in supernatants were determined by ELISA, endothelial damage by neutral red cytotoxicity assay, and P adhesion to E, by acid-phosphatase assay. The treatments were: 1:E, 2:E+P, 3:E+S0.1, 4: E+S0.1+P, 5:E+S1, 6:E+S1+P. Results of sCD40L level are expressed in ng/ml(MEAN±SEM): 1= non-detectable (ND), 2=0.051±0.026, 3=ND, 4=0.115±0.059, 5=ND, 6=0.275±0.065. Endothelial damage, as percentage of live cells (MEAN±SEM): 1=100, 2=103±5, 3=89±6, 4=85±4, 5=70±4, 6=72±5. P adhesion to E, as percentage of adhesion relative to treatment 2(MEAN±SEM): 2=100±5, 4=192±66, 6=346±72. We conclude that Stx induce an endothelial damage, that leads to platelet activation and subsequent release of sCD40L. Thus, we describe an alternative platelet role that may contribute to HUS pathogenesis, potentiating the inflammatory response.

519. (693) INTERLEUKIN-17 A AND F SUSTAIN CD8+ T CELL RESPONSE TO *TRYPANOSOMA CRUZI* BY MODULATING SURVIVAL, DIFFERENTIATION AND EXHAUSTION PARTIALLY THROUGH CD8+ T CELL-INTRINSIC IL-17RA SIGNALING

Tosello Boari, Jimena; Araujo Furlan, Cintia; Fiocca Venengo, Facundo; Ramello, Maria Cecilia; Gorosito Serran, Melisa; Montes, Carolina; Gruppi, Adriana; Acosta Rodríguez, Eva

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBIC)-CONICET-UNC

The IL17 family contributes to host defense against intracellular microbes by inducing inflammation and immune cell recruitment. We described a novel mechanism by which IL17RA is critically involved in the induction of CD8+ T cell (CTL) responses. We demonstrated that compared to WT mice, IL17RA KO (KO) mice infected with *T. cruzi* (Tc) developed a reduced frequency of Tc-specific CTL. Here, we investigated whether the IL17RA requirement for robust CTL responses is CTL intrinsic and which particular IL17RA-signaling cytokine is involved. We determined that IL17RA is constitutively present in CTL and induced upon Tc infection. Next, we performed adoptive transfer assays to determine if IL17RA expression on the CTL itself provided an advantage to survive and respond to Tc. First, we transferred CTL from CD45.1 WT mice into CD45.2 WT and KO host and analyzed upon infection, the contribution of the injected cells to the CTL response. After 20 days post infection (dpi), the contribution of injected CD45.1 CTL to Tc-specific CTL pools was higher in KO than in WT hosts (blood $p=0.003$; spleen $p=0.011$). Convincingly, we transferred equal numbers of CTL from CD45.1 WT and CD45.2 KO mice into CD45.1/2 hosts. After 20dpi, injected KO CTL were significantly outcompeted by their WT counterparts (blood $p=0.016$; spleen $p=0.014$). To elucidate the IL17 cytokine critical for CTL responses, we evaluated how lack of IL17A/F affected the course of Tc infection. Infected IL17A/F KO mice showed the same phenotype than infected KO mice (i.e. increased tissue parasitism, reduced total and Tc-specific CTL and exhausted CTL phenotype). Finally, we determined that purified naive CTL upregulated IL17RA expression upon TCR engagement and become responsive to rIL17A that diminished the% of AnnexinV+ cells ($p<0.01$). We conclude that IL17A/F promote robust CTL responses during *T. cruzi* infection by, at least in part, promoting CTL maintenance and survival through a CTL-intrinsic IL17RA-signaling.

520. (697) OPTIMIZED SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN G

Sarratea, María Belén; Romasanta, Pablo N.; Fernández Lynch, María Julieta; Noli Truant, Sofía; Antonoglou, Belén; Todone, Marcos; De Marzi, Mauricio; Malchiodi, Emilio L.; Fernández, Marisa M.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA

Superantigens (SAGs) interact with TCR β and MHC-II molecules promoting a deregulated and nonspecific immune response which can produce toxic shock syndrome, immunosuppression that favors the spread of the pathogen and sepsis. SAG presence in food, especially dairy products, is related to food poisoning and it can be lethal in a couple of hours. Consequently, it is highly important to detect SAGs rapidly in any biological matrix. Currently, standard food microbiological testing does not include the detection of bacterial enterotoxins, even knowing that they are heat-stable and can resist pasteurization. Classical methods such as ELISA or Western blotting can detect SAGs, but they do not provide real-time information. In order to find a rapid, sensitive and specific method for the detection of SAGs, we developed an optimized assay using Surface Plasmon Resonance (SPR) methodology in a Biacore T100 instrument. The response enhancement is based on a "sandwich" approach using polyclonal specific antibodies. The first antibody, previously immobilized on a sensor chip, captures the toxin in a liquid sample and, subsequently, a secondary antibody is run in solution enabling the corresponding signal amplification. We demonstrated that this novel method reaches a lower detection limit compared to other immunoassays. While ELISA is able to detect levels of 1.10^{-9} M of SEG, our SPR approach can detect concentrations as low as 1.10^{-12} M. The cutoff values found for each methodology were 0.02 ± 0.02 AU and 49 ± 4 RU, respectively. Both high sensitivity and real-time sample processing are the key features of this simple methodology that can be of potential use for the detection of enterotoxins in food industries, laboratories and regulatory agencies.

521. (706) IL10 PRODUCING B LYMPHOCYTES IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF *CHLAMYDIA MURIDARUM* INFECTION

Sánchez, Leonardo Rodolfo; Godoy, Gloria Janet; Gorosito Serran, Melisa; Gruppi, Adriana; Motrich, Rubén Darío; Rivero, Virginia Elena

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBIC)-CONICET-UNC

Chlamydia trachomatis (CT) causes an important number of genital tract infections worldwide. Although after the infection a specific immune response is induced, some data suggest that its quality and/or intensity would not be adequate since disease is often persistent and recurrent. It has been postulated that *Chlamydia* would evade host defenses through different strategies, such as the induction of anti-inflammatory cytokines like IL10 and TGF β . Herein, we aimed to evaluate the role of IL10 after male genital tract infection with *Chlamydia muridarum* (*Cm*), a serovar that infects mice and produces a similar disease to that observed in humans. Cytokine production by splenocytes (MNC) from non-infected mice incubated with *Cm* was analyzed. MNC *in vitro* stimulated with heat inactivated *Cm* mostly secrete IL10 (IL10: 920 ± 80 pg/ml; IL6: 245 ± 2 pg/ml; TNF α : 130 ± 20 pg/ml; IFN γ : 245 ± 2 pg/ml). FACS analyses revealed that the main producers of IL10 are CD45+CD19+ cells. Accordingly, magnetic beads purified B lymphocytes produced high levels of IL10 after *in vitro* stimulation with *Cm*. Experiments in which NOD mice were inoculated with *Cm* in the meatus urethra and then euthanized at different times post infection (pi) showed that MNC from infected mice produce the highest levels of IL10 at early times pi. Indeed, higher levels of IL10+CD45+CD19+ cells were found at 4 day pi, accompanied with low levels of IL10+CD45+CD3+ cells. Experiments using NOD and NOD-SCID mice showed a significant reduction in the IL10 amounts produced by MNC from infected NOD-SCID when

compared to those from infected NOD mice ($p < 0.05$), supporting the idea that adaptive immune cells are the main producers. These results suggest that *Cm* has the ability to induce IL10 production by B lymphocytes at early times after infecting the host. This IL10 production could be related to the poorly protective immune responses observed in infected subjects and with the chronic nature of CT genital tract infection.

522. (780) ACTIVATION OF THE ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AHR) WITH TCDD IMPAIRS HOST RESISTANCE TO TRYPANOSOMA CRUZI EXPERIMENTAL INFECTION
 Ambrosio, Laura Fernanda; Volpini, Ximena; Elizalde, Carina; Cervi, Laura; Motrán, Cristina
 Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a transcription factor activated by ligand that is mainly triggered by xenobiotic agents. Increasing evidence suggests that AhR may regulate immunity to infections. Nevertheless, the role of AhR ligation during infections is unclear and unpredictable since it seems to be dependent on several factors such as the host-pathogen interactions, the time of AhR ligation and the particular AhR agonist used. To determine the role of AhR in the outcome of *T. cruzi* infection, we studied the infection-induced modulation of AhR expression in spleen cell populations (SCP) and the effect of the treatment with TCDD (a potent exogenous AhR agonist) on the control of parasite infection and the modulation of SCP. To assess AhR expression in *T. cruzi* infection, C57BL/6 mice were infected with 3000 trypomastigotes of *T. cruzi* and the AhR expression determined in SCP by FACS at different times pi. *T. cruzi* infection induced, at day 7 pi, a transient and significant up-regulation of AhR expression in CD4+, CD8+ and B220+ cells but not in myeloid cell populations. To evaluate the role of AhR ligation, a group of mice were treated with 40 ug/kg of TCDD (TI, n=7) or vehicle (CI, n=9) one day prior to infection and monitored for survival, body weight and parasitemia. TCDD treatment impaired resistance to infection since TI mice showed decreased survival ($p = 0.037$) and weight gain ($p = 0.0036$) together with increased parasitemias ($p = 0.013$) compared with CI mice. Non-infected TCDD- (TNI, n=5) or vehicle-treated mice (CNI, n=5) did not show significant changes in survival or weight gain. In addition, TI mice showed significantly higher levels of IL-17 ($p = 0.0041$) and lower levels of IFN-g ($p = 0.0085$) than CI mice in sera. The analysis of SCP at day 15 pi showed that TCDD treatment was able to reverse the infection-induced reduction of CD4+ CD25+ Foxp3+ and B220+ cell populations while induced CD11b+ CD11b- Ly6C^{hi} Ly6G- (pDCs) cell population reduction. Our results show that the outcome of *T. cruzi* infection could be modulated by AhR ligation.

523. (429) MODULATION BY PROGESTERONE AND VIP OF TROPHOBLAST CELL FUNCTION AND INTERACTION WITH MATERNAL IMMUNE CELLS
 Agüero, Mariana; Fraccaroli, Laura; Grasso, Esteban; Páparini, Daniel; Pérez Leirós, Claudia; Ramhorst, Rosanna
 Laboratorio de Inmunofarmacología, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA

From the immunological point of view pregnancy implies a pro inflammatory response during the implantation that will be shift toward a tolerogenic one. Particularly, the vasoactive intestinal peptide (VIP) is produced by trophoblast cells and displays multiple target circuits that allow the tolerance to pregnancy-related antigens. Since progesterone (Pg) is essential from early stages of pregnancy, we evaluated the immunomodulatory effects of Pg and VIP on the trophoblast cell function and their interaction with maternal immune cells. Hence, we used an in vitro model based on the Swan71 cell line co cultured or not with PBMC from fertile women. We observed that after the co culture between Swan cells and maternal PBMC in the presence of VIP (10^{-7} M) and Pg (10^{-4} M), the production of inflammatory mediators as nitrites (by Griess Method) and the activity of

MMP9 (by Zymography) in the supernatants was decreased as well as COX-2 expression (by RT-PCR) ($p < 0.05$ T-test). At the same time, Pg significantly increased the expression of VPAC1 and VPAC2 receptors in trophoblast cells by RT-PCR ($P < 0.05$). Since trophoblast cells can display a moderate phagocytic function to remove apoptotic bodies during the maternal-placental interface generation, we evaluated the effect of Pg on efferocytosis. Swan cells were cultured with latex-beads FITC-conjugated (1:50 relationship), +/- Pg and mean intensity fluorescence (MIF) was assessed by FACS. We observed an increased MIF value after 2 h of incubation indicating that Pg enhanced the engulfment of latex beads by trophoblast cells. Finally, VIP in the presence of Pg decreased the proliferative response and t-bet expression evaluated in the Mixed Lymphocyte Reaction culture ($p < 0.05$ T-test). These results suggest that Pg could contribute to immune homeostasis maintenance during the peri implantation period by decreasing the expression of inflammatory mediators, easing VIP immunomodulatory effects and the clearance of apoptotic bodies.

524. (447) THE CURRENT TREATMENT OF TYPE-I AUTOIMMUNE HEPATITIS SENSITIZES THE INNATE IMMUNE SYSTEM IN THE LIVER OF ADULT PATIENTS
 Ferro, Florencia¹; Inzaugarat, María Eugenia¹; García, Cecilia C¹; Alegre, Nadia Soledad¹; Lezama, Carol²; Cuarterolo, Miriam³; González Ballerga, Esteban⁴; Daruich, Jorge⁴; Sorda, Juan Antonio⁴; Cheriñavsky, Alejandra Claudia¹
 Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ Servicio de Hepatología, Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez"² Servicio de Hepatología, Hospital de niños "J.P. Garrahan"³ División de Gastroenterología, UBA-Hospital de Clínicas "José de San Martín"⁴

Background: Prednisone alone or in lower dosis combined with azathioprine is the standard treatment of type I Autoimmune Hepatitis (AIH). AIH shows a chronic course with relapses after discontinuation of the immunosuppressive therapy. We have previously demonstrated that some pro-inflammatory cytokines and chemokines remain expressed in the liver of pediatric patients despite of the treatment. Expression of some Inflammasome (Inf) associated genes has been recently demonstrated in experimental AIH. Objective: To evaluate the involvement of NLRP3 Inf in adult (A) patients with AIH at diagnosis (AIH-A) and the modulation of NLRP3-associated genes in adults and pediatric (P) patients in biochemical remission achieved after treatment with corticosteroids (AIH-AT, AIH-PT). Patients and Methods: Hepatic biopsies from 6 AIH-P, 7 AIH-A, 7 AIH-PT, 7 AIH-AT and liver tissue from 7 cadaveric adult donors as control livers (Co) were processed for gene expression assessment. NLRP3, ASC, caspase-1 (casp-1), IL-1 β , IL-18 and GAPDH mRNA expression was analyzed by Real-Time PCR. Fold-change values were calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. Data were analyzed by Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison post-test (adults) and Mann-Whitney (pediatric patients). Results: Expression of NLRP3 is increased in AIH-A ($p < 0.0001$, vs. Co). ASC ($p < 0.05$), casp-1 ($p < 0.05$) and IL-18 ($p < 0.05$) are decreased in AIH-A vs. AIH-AT. ASC ($p = 0.0203$), casp-1 ($p = 0.0014$) and IL-18 ($p = 0.0158$) are increased in AIH-P vs AIH-PT. Conclusion: Our data provide not conclusive evidences on NLRP3 inflammasome activation in the liver of AIH patients. Interestingly, we demonstrate that the anti-inflammatory and immunosuppressive therapeutic effects of corticosteroid treatment are reinforced by a sensitization of the innate immune system only in adult patients. Its association with the relapsing-remitting course of AIH remains to be investigated.

525. (465) STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF DELETION VARIANTS OF FLAGELLIN, THE TLR5 AGONIST
 Moreno, Griselda¹; Biedma, Marina¹; Rossi, Andrés²; Blanca, Bruno¹; Tabareau, Julien³; Romanín, David¹; Berguer, Paula²; Sirard, Jean Claude³; Rumbo, Martín¹
 Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP¹ Fundación Instituto Leloir (FIL)² Institut Pasteur de Lille, France³

Activation of Toll-like receptors (TLRs) results in recruitment of immune cells to the site of infection and antigen presenting cells activation and maturation, promoting the generation of a strong adaptive immune response. Consequently, TLR ligands have adjuvant properties and some of them are already used in commercial vaccines. TLR5 has a widespread distribution in mucosal epithelia and its ligand, flagellin, has been proposed as mucosal adjuvant. Flagellin includes four domains, D0, D1, D2 y D3; D0 and D1 contains the TLR5 binding sites, whereas D2 and D3 contain the main antigenic sites of the molecule. However, the contribution of different regions of D1, D2 and D3 to TLR5 activation has not been fully explored. In the present work, we used 7 different flagellin deletion variants affecting different domains: FliC WT (no deletion), FliC Δ 200-369, FliC Δ 161-405, FliC Δ 100-405 6H, FliC Δ 174-400, FliC Δ 174-400 6H, FliC Δ 138-405 6H. Our aim was to analyze the capacity to activate TLR5 of these different variants using a TLR5-responsive reporter cellular system (Caco2-CCL20-luciferase). Furthermore, the structural properties of the different variants were analyzed by circular dichroism (CD). In spite that all variants have intact TLR5 binding site, we found that the deletions affect differentially the capacity to trigger TLR5. FliC Δ 200-369 has the same capacity to activate TLR5 than the wild type variant, whereas other deletions affected significantly this activity ($p < 0.05$ for FliC Δ 161-405, FliC Δ 100-405 6H, FliC Δ 138-405 6H). In all cases, the CD analysis indicates that the variants used conserved the thermal stability and secondary structure present in the wild type molecule. These results indicate that changes in the D1, D2 and D3 domains may affect the capacity to trigger TLR5, probably by conformational effects. This observation is of interest for the design of flagellin variants with low antigenic activity and conserved TLR5 dependent adjuvant activity.

526. (632) ARGINASE INDUCTION IN MYELOID CELLS FROM CPG-ODN+IFA-TREATED MICE

Harman, María Florencia; Castell, Sofía D; Gorrino, Carolina V; Crespo, María I; Sánchez Vallecillo, María F; Rannochia, Romina P; Maletto, Belkys A; Morón, Victor G; Pistoresi, María C
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Previously we showed that challenging young and aged mice with CpG-ODN+IFA leads to the expansion of CD11b⁺Gr1⁺ myeloid cells. These cells suppressed T-cell proliferative response by an arginase dependent mechanism, thus, the addition of an arginase inhibitor restored T-cell proliferation. We also showed in these myeloid cells an increased arginase-1 expression and activity. In order to evaluate the environmental factors involved in arginase induction we measured the cytokines present in the culture medium. IL-4 and IL-6 levels were augmented in cultures of myeloid cells from young and aged CpG-ODN+IFA-treated mice with stimulated T-cells from young mice ($p < 0.05$). In line with this, we observed increased phosphorylation of Stat6 and Stat3 (transcription factors activated by IL-4 and IL-6 respectively) in these myeloid cells ($p < 0.05$). The neutralization of IL-4 or IL-6 in the culture medium led to an almost complete reduction of arginase-1 expression and activity in myeloid cells from aged CpG-ODN+IFA-treated mice ($p < 0.01$), which also occurred when both neutralizing antibodies were added together ($p < 0.01$). Although in myeloid cells from young CpG-ODN+IFA-treated mice the neutralization of either IL-4 or IL-6 reduced Arginase-1 expression and activity ($p < 0.01$), only the absence of both cytokines reduced it completely ($p < 0.001$). In resume, myeloid cells from CpG-ODN+IFA mice are activated in response to their local environmental signals. IL-4 and IL-6 from the extracellular medium are involved in arginase induction. The presence of either IL-4 or IL-6 is sufficient for arginase induction in myeloid cells from young treated mice whereas in the case of aged animals, both cytokines are required.

527. (660) NEUTROPHIL-DERIVED CIRCULATING FREE DNA (CF-DNA): AN ASSOCIATED MARKER FOR HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME DEVELOPMENT

Ramos, María Victoria¹; Mejias, María Pilar¹; Sabbione, Florencia²; Abrey-Recalde, María Jimena¹; Fernández-Brando, Romina Jimena¹; Amaral, María Marta³; Exeni, Ramón⁴; Trevani, Analía²; Palermo, Marina Sandra¹
*Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM*¹ *Lab. Inmunidad Innata, (IMEX)-CONICET, ANM*² *Lab de Fisiopatología, Dpto de Fisiología, Facultad de Medicina. UBA.*³ *Hospital Municipal del Niño, San Justo*⁴

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS), a vascular disease characterized by hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure is caused by enterohemorrhagic Shiga toxins (Stx)-producing bacteria. Besides Stx, inflammatory response mediated by neutrophils (PMN) is essential to HUS evolution. PMN have the capacity to release "neutrophil extracellular traps" (NETs) which are involved in the pathogenesis of several diseases. NETs are composed of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA), histones and PMN proteins such as proteases. The aim of this work was to investigate the presence of cf-DNA in HUS patients. We observed increased values of cf-DNA in plasma from HUS compared to healthy children (HC) ((HC: 5.1 ± 0.5 ; HUS: 10 ± 0.5) $\mu\text{g/ml}$, $n=15$, $*p < 0.05$). Moreover, we observed by confocal microscopy that DNA colocalized with myeloperoxidase in HUS plasma. These data and our previous results showing that Stx induces NETosis in PMN, suggest that increased cf-DNA found in HUS plasma could be due to NETosis produced by in patients. To investigate whether HUS PMN have an altered NETosis capacity, isolated peripheral PMN from HUS and HC were incubated with medium or phorbol myristate acetate (PMA), as positive control. After 4h, extracellular DNA and elastase activity were measured in the supernatants. No differences were found between both groups (DNA($\mu\text{g/ml}$)=Basal (HC: 1.2 ± 0.1 ; HUS: 1.1 ± 0.2); PMA (HC: 2.6 ± 0.3 ; HUS: 2.8 ± 0.1); Elastase(AU)=Basal (HC: 0.6 ± 0.1 ; HUS: 0.7 ± 0.2); PMA (HC: 1.1 ± 0.3 ; HUS: 1.2 ± 0.3), $n=5$). Isolated HUS PMN did not exhibit failure or exacerbation of their capacity to produce NETs. Whereas physiologic amounts of NETs are important in anti-infectious innate immune responses, aberrantly high levels of cf-DNA in circulation might also result in pathophysiologic conditions such as clotting of capillaries, impairment of microcirculation in the renal microvasculature, and tissue damage. In this way, PMN could contribute to inflammatory response in HUS patients.

528. (668) PULMONARY BACTERIAL CLEARANCE IN LIPO-POLYSACCHARIDE-INDUCED TOLERANCE VS. SHOCK MURINE MODELS

Rodríguez Rodríguez, Nahuel¹; Martire-Greco, Daiana¹; Landoni, Veronica Ines¹; Chiarella, Paula¹; Schierloh, Pablo¹; Rearte, Bárbara¹; Meiss, Roberto²; Isturiz, Martín Amadeo¹; Fernández, Gabriela Cristina¹
*Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM*¹ *División Patología Experimental, ANM*²

Repeated inoculation of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in mice generates a refractory state, where animals survive lethal doses of LPS and have low amounts of LPS-induced TNF. This state is also associated with defects in antibody responses. Our aim was to compare how the exposure to LPS affects pulmonary bacterial clearance as a measure of innate immune function. For this purpose, we used two models of LPS exposure. In the LPS-tolerance model, tolerance was induced by daily i.v. injections of increasing doses of LPS (5-100 $\mu\text{g/day/mouse}$) for 7 days. In the LPS-shock model a single high dose of LPS (50 $\mu\text{g/mouse}$) was administered i.v. Then the animals were challenged intratracheally with intestinal bacteria (5×10^6 CFU) and the number of remaining bacteria in the lung or bronchoalveolar lavage (BAL) was evaluated 4h post-infection on McConkey agar plates. In the LPS-tolerance model the bacterial clearance was higher compared to Control mice (Total CFU. Lung: C= $3.94 \times 10^5 \pm 1.02 \times 10^6$, Tol= $1.34 \times 10^5 \pm 0.90 \times 10^6$. BAL: C= $5.85 \times 10^5 \pm 0.57 \times 10^5$, Tol= $6.66 \times 10^4 \pm 2.22 \times 10^4$, $p < 0.0001$). In contrast, in the LPS-shock model bacterial clearance in the lung was decreased (Total CFU. Lung: C= $7.86 \times 10^4 \pm 0.24 \times 10^4$, Tol= $1.23 \times 10^5 \pm 0.25 \times 10^5$, $p < 0.05$. BAL: C= $2.19 \times 10^4 \pm 0.42 \times 10^4$, Tol=

$2.15 \times 10^4 \pm 0.31 \times 10^4$). No differences in the number of neutrophils (PMN) and alveolar macrophages in BAL or Lung after the bacterial challenge were observed. To determine the functional state of PMN that may explain the increased clearance observed in the LPS-tolerance model, an *in vitro* phagocytosis assay was performed using lung isolated PMN (Gr-1+) and FITC-labeled bacteria. The amount of ingested bacteria determined by flow cytometry (Mean fluorescence intensity, MFI) was higher in Tol Gr-1+ cells (MFI FITC: C= 518 ± 39 , Tol= 745 ± 70 , $p < 0.05$). These data indicate that sustained exposure to LPS increases the functionality of PMN, perhaps to compensate the functional decline of the adaptive immune system.

529. (670) MYOCARDIUM-DERIVED CYTOKINE DRIVES MONOCYTE RECRUITMENT AND MACROPHAGE PROFILE IN TRYPANOSOMA CRUZI-INFECTED HEART TISSUE

Sanmarco, Liliana María; Ponce, Nicolás Eric; Aoki, María Pilar
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICETUNC

The ability of monocytes/macrophages (Mo/Ma) to mobilize to where they are needed is central for their functions in promoting immune defense and driving inflammation (pro-inflammatory/anti-microbial M1 Ma) or tissue regeneration (fibrosis/wound healing M2 Ma). The factors that determine Mo/Ma recruitment into cardiac tissue and their profile during *T. cruzi* infection have not been characterized. The aim of the present work was to study the kinetic of cardiac Ma subsets and the crosstalk between Mo/Ma and infected myocardium. We observed a significant decrease in infiltrating granulocytes and Ma in heart tissue of infected IL6 deficient (KO) mice vs C57BL/6 (WT) mice ($p < 0.001$, $p < 0.01$ respectively). Adoptive transference of WT and KO spleen cells into infected KO or WT mice showed that only WT cells infiltrated the myocardium of KO mice while both transferred populations got into WT myocardium at comparable levels. Considering that WT and KO cells were proportionally equal in peripheral blood of both transferred groups of mice, the IL6 released by myocardium was clue for Mo/Ma influx. Additionally, while early at infection (4dpi) WT mice exhibited higher levels of cardiac M1 Ma (F4/80+CD86+CD206-) than M2 Ma (F4/80+CD86-CD206+) ($p < 0.05$), later the Ma populations were biased to sustained M2 subset. In contrast, KO mice never displayed a dominant M2 profile, and underwent more myocardial damage (measured as %CK-MB) ($p < 0.01$) that correlated with increased heart levels of inflammatory cytokines (IL17 and TNF α) and lower levels of anti-inflammatory mediators (IL4 and IL10) ($p < 0.05$). In consequence, infected KO presented increased mortality ($p < 0.001$). Together our data demonstrate a homeostatic role for IL6 released by myocardium as a critical factor for Mo/Ma influx and M2 polarization, these mechanisms may contribute to the development of an adequate immune defense and a concomitant anti-inflammatory response.

530. (535) IFN- β -DERIVED TUMOR CELLS INDUCES THE EXPRESSION OF IL27 ON DENDRITIC CELLS AND TLR3 ACTIVATION DECREASE PRO-TUMORIGENIC FACTORS ON TUMOR CELLS

Gatti, Gerardo¹; Nocera, David Andrés²; Roselli, Emiliano²; Araya, Paula²; Giraudo, Constancio¹; Maccioni, Mariana²
Fundación para el Progreso de la Medicina¹ Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC²

IFN- β is a potent activator of dendritic cells (DCs) and Th1 immunity. Moreover, IFN- β induces secretion of various cytokines on DCs, such as IL27. IL27 has been shown to enhancing the induction of Th1 immunity and the antiproliferative activity in tumor cells through the activation of interferon regulatory factors (IRFs). We have previously shown that cancer cells lines respond to poly I:C stimulation, producing IFN- β at levels that are capable of improving the activation status of DCs. We hypothesized that IFN- β -derived tumor cells could induce the expression of IL27 on DCs, which in turn, might regulate Th1 activation and the mecha-

nisms of apoptosis/proliferation in tumor cells. In this work, we evaluated the regulation of IL27 on DCs by IFN- β from tumor cells. Conditioned media were obtained from non-stimulated (CM) or poly I:C-stimulated B16 tumor cells (PIC-CM), and strong induction of IFN- β mRNA in poly I:C-activated B16 cells was detected. Mononuclear cells (MNCs) from spleen or bone marrow DCs (BMDC) increased significantly the expression of IL27 mRNA when were cultured in the presence of PIC-CM compared to CM at 4h and 24h post-culture ($p > 0.05$). In addition, MNCs or BMDCs cultured in the presence of PIC-CM showed a strong induction of IL6 mRNA ($p > 0.05$). On the other hand, poly I:C triggering on B16 cells down-regulated the expression of *vegf*, *Cx3cl1*, *Mmp9* and *tgfb* (3, 4, 4 and 6)-fold, respectively. In conclusion, our results show that poly I:C treatment decreased the expression of pro-tumorigenic factors on tumor cells and IFN- β -secreted tumor cells induces the expression of IL27 on DCs that could influence somehow in the tumor microenvironment. Further experiments will be performed to analyze the role of IL27-secreted DCs regarding Th1 immunity activation and antiproliferative activity on tumor cells.

531. (537) PROGESTIN-DRIVEN REGULATORY T CELLS PROMOTE AN AGGRESSIVE PHENOTYPE IN TRIPLE NEGATIVE BREAST TUMORS

Dalotto-Moreno, Tomás; Cerliani, Juan Pablo; Croci, Diego Omar; Méndez-Huergo, Santiago; Moses, Florencia; Rabinovich, Gabriel Adrián; Salatino, Mariana
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

The immune system plays key roles in the elimination of most tumors. Progesterone (Pg) can shape the immune response favoring a tolerogenic rather than a pro-inflammatory adaptive response. As hormone supplement therapies have been associated with increased frequency of malignant breast neoplasias, we investigated, using the triple negative 4T1 breast tumor, how progestins can regulate key immune cell populations in the tumor microenvironment and how progestin-induced immunosuppression influences to tumor progression. Balb/c mice treated with Pg or its synthetic analog, medroxyprogesterone acetate (MPA), showed an increased frequency of Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) in draining lymph nodes and displayed an impaired antitumor response evidenced by a decreased production of IL-17 and IFN- γ by CD4⁺ T cells ($p < 0.01$). Progesterin-treated tumor-bearing mice showed a higher frequency of both Tregs and PD1⁺TIM3⁺ exhausted tumor-associated T cells ($p < 0.05$). Although primary tumor growth was not altered, the number of lung metastases considerably increased in mice treated with progestins ($p < 0.01$). Both Pg and MPA favored stable differentiation and expansion of Tregs, leading to augmented immunosuppressive activity ($p < 0.01$). In the presence of progestins, *in vitro* differentiated Tregs showed higher expression of RANKL, a protein involved in malignant transformation. When co-cultured, *ex vivo* sorted- or *in vitro* differentiated Tregs increased invasiveness of 4T1 cells both *in vitro* and *in vivo*, promoting E-cadherin downregulation and Snail up-regulation ($p = 0.05$). Accordingly, we observed a progestin-driven expansion of the CD44⁺ stem cell-like population that formed mammospheres with augmented tumorigenicity and invasive phenotype. Our findings highlight the relevance of progestins in modulating immunoregulatory checkpoints in the tumor microenvironment and suggest a mechanism through which Tregs could directly promote a metastatic and aggressive phenotype on tumor cells.

532. (582) GALECTIN-1 AS A TARGET FOR PROSTATE CANCER IMMUNOTHERAPY

Contrufo, Geraldine; Jaworski, Felipe Martín; Gentilini, Lucas Daniel; González Pérez, Ignacio; Compagno, Daniel Georges; Laderach, Diego José
Instituto de Química Biológica de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA

Worldwide, Prostate Cancer (PCa) is one of the most frequent cancers in adult men. The lack of effective treatments has led the scientific community to explore new alternatives such as

immunotherapy. It is believed that immunization with 8-to-10-mer peptides containing subdominant epitopes may activate CD8+ T lymphocyte clones capable of recognizing tumor-associated antigens, induce tumor-specific cytotoxicity and bypass tolerance mechanisms. Galectin-1 (Gal-1), a β -galactoside-binding protein, is highly overexpressed in tumor cells. Our group has demonstrated its expression increases throughout human PCA progression, playing key roles in this process. We hypothesized that immunization with Gal-1-derived peptides may induce an immune response capable of modulating prostate tumor growth. Adult male C57BL/6 mice were immunized s.c. as follows: 3 injections of an immunomodulatory oligonucleotide (CpG-1826) followed by 2 injections of the Gal-1-derived peptide together with the Pan DR T helper epitope (PADRE). Immunized mice were challenged s.c. with syngenic TRAMP-C1 prostate tumor cells and tumor growth was subsequently assessed. We found that immunization with two of the assayed peptides were capable of reducing tumorigenicity ($p < 0.05$). Although the immunization with a third peptide did not alter tumorigenicity, it increased tumor-volume doubling time ($p < 0.05$). Furthermore, the lymphocyte activation profile was studied following the immunization protocol. Decreased tumorigenicity was associated with an increase in the percentages of CD8⁺CD44^{high} and CD4⁺CD44^{high} cells in the lymph nodes, and the increase in tumor-volume doubling time was linked to an increment in CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD44^{high} cells. Taken altogether, these results support Gal-1 as a novel and attractive target for PCA immunotherapy.

533. (635) TUMOR-INDUCED SENESCENT T (TIS-T) CELLS: A DYSFUNCTIONAL T CELL POPULATION WITH IMMUNOMODULATORY POTENTIAL

Ramello, María Cecilia; Canale, Fernando; Tosello Boari, Jimena; Acosta Rodríguez, Eva V.; Montes, Carolina L. Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET

Senescent T cells are reported to be increased in patients with cancer. Previously, we have demonstrated that CD4⁺ and CD8⁺ T cells from healthy donors, after *in vitro* co-incubation with a tumor cell line, undergo senescence characterized by the loss of costimulatory molecules expression (CD27-CD28-) and telomere shortening. Herein we show that CD4⁺ and CD8⁺ tumor-induced senescent T (TIS-T) cells were unable to produce cytokines such as IL-2, IFN γ and TNF after polyclonal stimulation. Although CD8⁺ control T cells (T cells without tumor co-incubation) and CD8⁺ TIS-T cells showed similar intracellular expression of granzymes B and A, degranulation in CD8⁺ TIS-T cells was significantly lower than in CD8⁺ control T cells after PMA/Ionomycin stimulation ($p = 0.024$). In concordance, we observed that CD4⁺ and CD8⁺ TIS-T cells significantly down-regulated the expression of TCR-CD3 zeta-chain ($p < 0.01$ vs. control T cells, in both cases), indicating that TCR-signaling is also impaired. In addition, CD4⁺ and CD8⁺ TIS-T cells did not express Blimp-1, and CD8⁺ TIS-T cells did not express Eomes as well. Furthermore, although T-bet was expressed in CD4⁺ and CD8⁺ TIS-T cells, they showed lower levels than control T cells. We also found that, CD4⁺ and CD8⁺ TIS-T cells completely down-regulated CD62L expression ($p < 0.01$ vs. control T cells, in both cases). Altogether, these results indicate that CD4⁺ and CD8⁺ TIS-T cells represent a dysfunctional T cell population. Analyzing the expression of modulatory molecules, we found that CD4⁺ and CD8⁺ TIS-T cells expressed higher levels of inhibitory receptors like Tim-3 and KLRG-1 but not PD-1. Interestingly, CD4⁺ and CD8⁺ TIS-T cells also expressed higher surface levels of E-cadherin (KLRG-1 ligand), galectin-9 (Tim-3 ligand) and PD-L1 (PD-1 ligand), suggesting that TIS-T cells may modulate themselves and may also regulate other immune cell subsets.

534. (636) DOXORUBICIN-TREATED CANCER CELLS RELEASE HMGB1 WHEN DYING THAT CAN MODIFY THE EXPRESSION OF ANGIOGENIC FACTORS IN A MYD88 DEPENDANT AND INDEPENDENT WAY

Roselli, Emiliano; Araya, Paula; Nocera, David Andrés; Núñez, Nicolás Gonzalo; Gatti, Gerardo; Maccioni, Mariana Dpto. Bioquímica Clínica - Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

HMGB1 (High mobility group box one) is a nuclear chromatin-binding protein that is released by necrotic cells, acting as a DAMP by binding to different receptors such as TLR4/TLR2/RAGE present on neighbor cells. HMGB1 participates in the "immunogenic cell death" promoting the antitumoral immune response but also can be a pro-angiogenic molecule acting on endothelial cells. Little is known about the effect of HMGB1 on cancer cells themselves. Here, we investigate if HMGB1 released by dying doxorubicin-treated murine melanoma B16 cells induces the expression of angiopoietin 2 (Ang2) and other angiogenic factors on other B16 cells in which the expression of MyD88 was silenced (B16shMyD88). B16 cells were treated with doxorubicin (Doxo, 1-10 μ M) and its cytotoxic effect was monitored. The release of HMGB1 was detected by western blotting in Doxo-treated B16 cell conditioned medium (Doxo-CM) but not in non-treated cells (CM). Doxo-CM and CM were added to B16 and B16shMyD88 cells for 24h and the expression of Ang 2 transcript was evaluated by qRT-PCR. A TLR3 ligand was used as a positive control and glycyrrhizin (Gly) was used as a HMGB1 inhibitor. The expression of Ang2 increased robustly in Doxo-CM treated B16 and B16shMyD88 cells (x6.0 and x5.6 respectively). Intriguingly, when Gly is added to inhibit HMGB1 a 20% inhibition in the expression of Ang2 is observed only when MyD88 is silenced. In addition, recombinant HMGB1 (rHMGB1-1 μ g/mL) was used to stimulate B16 and B16shMyD88 cells and through a proteome array a set of 53 angiogenic proteins were evaluated in the supernatants. ADAMTS1, PDGF-AA, VEGF, Tissue Factor were up regulated on a MyD88 dependant manner whereas others such as CD105 increased in a MyD88-independent way. Therefore, HMGB1 released by dying tumor cells can act on neighbour cells in a MyD88 dependant and independent way and promote angiogenesis.

535. (681) ANTI-METASTATIC EFFECT INDUCED BY METATYROSINE IN THE LMM3 MURINE TUMOR MODEL

Machuca, Damián Gabriel¹; Chiarella, Paula²; Montagna, Daniela²; Dran, Graciela²; Meiss, Roberto P³; Rugiero, Ral A² Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Laboratorio de Oncología Experimental (IMEX)-ANM-CONICET² Instituto de Estudios Oncológicos (IEO)-ANM³

Concomitant tumor resistance (CR) is the phenomenon by which a tumor-bearing host inhibits the growth of secondary tumor implants and eventually metastases, since they are secondary tumors naturally implanted in a primary tumor-bearing host. Although small-sized immunogenic tumors can induce an immunologically T-dependent CR, the mechanisms underlying the most universal manifestation of CR associated with large-sized immunogenic and non-immunogenic tumors remained elusive for years. Recently, using HPLC and MS and MS/MS spectrometry, we could identify circulating meta (m)-tyrosine and ortho (o)-tyrosine (two tyrosine isomers not present in normal proteins) as the main effectors of CR. Previously, we demonstrated that periodic inoculation of m-tyrosine (its anti-tumor effect is 10 times more robust than o-tyrosine) was able to inhibit the growth of spontaneous metastases generated in mice bearing C7H1 or LMM3 subcutaneous (sc) tumors, two mammary carcinomas that do not generate CR but are sensitive to the CR generated by other tumors. In this presentation, in an attempt to evaluate the survival of treated mice, we simulated a clinical situation: 5 x 10⁵ LMM3 tumor cells were inoculated sc in 25 BALB/c mice. At day 20, all the tumors were surgically excised when their volume was 600 mm³. Six mice that were examined at that day revealed the existence of 8 [3-15] (median [range]) macroscopic lung metastases and numerous micro-metastases before the onset of the treatment. The remaining 19 were divided into two groups that received either saline (controls, n=9) or a daily intra-venous injection of m-tyrosine (67

mg/kg, n=10) for the following 35 days. All the controls died at 41 ± 6 (mean \pm SE) days after surgery exhibiting a huge number of macro- and micro-metastases. In contrast, only 2 treated-mice died [days 56 and 104 after surgery]. The remaining 8 remain still alive 9 months after surgery ($p < 0,001$) indicating the strong anti-metastatic power of m-tyrosine.

536. (136) ALTERATIONS IN THYMOCYTES POPULATIONS DURING INFECTIOUS/INFLAMMATORY CONDITIONS

Baez, Natalia S.; Cerban, Fabio M.; Savid Frontera, Constanza; Rodríguez-Galán, María Cecilia
Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad De Ciencias Químicas, UNC, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Our previous work demonstrated that during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection, where a strong Th1 immune component is present, mature peripheral cells that express CD44, a marker of activated or memory T cells, are able to re-enter the thymus. Our recent immunofluorescence analysis demonstrated that CD44⁺ T cells in the thymus localized both in the thymic medullary and cortical areas. Besides, under this infectious process, we have observed that CD4⁺ and CD8⁺ simple positive (SP) thymocytes adopt a phenotype similar to mature T cells that localize in secondary lymphoid organs (SLO), based on the expression of the markers Qa2 and CD24 evaluated by flow cytometry (immature: Qa2^{lo} CD24^{hi} more mature: Qa2^{hi} CD24^{lo}). Moreover, recent studies in our group, using intrathymic staining with eFLUOR dye, suggested that conversion to a more mature phenotype occur mainly in the resident CD44^{lo} SP thymocytes in *T. cruzi* infected mice (control vs infected, $p \leq 0.05$). Interestingly, our recent finding revealed that early after *Candida albicans* infection (control vs infected, $p \leq 0.05$) or after systemic expression of IL-12 or IL-18 by hydrodynamic expression of their cDNAs (control vs treated, $p \leq 0.05$), SP CD44^{lo} thymocytes also acquired a more mature phenotype similar to what we reported for *T. cruzi* infection. The latest data let us to hypothesize that a Th1 cytokine inflammatory process rather than a microorganism specific phenomenon is driven this effect. Overall, our data indicate that the thymus is highly susceptible to systemic infectious/inflammatory processes, especially during the acute phase when high levels of IL-12 and IL-18 cytokine are produced. Our data demonstrate that not only peripheral T cell can re-enter the organ in these conditions but also resident SP thymocytes adopt a mature phenotype that would probably alter their own development and future behavior in SLO as T cells.

537. (412) AUTOPHAGY INDUCTION BY TLR2 LIGANDS REGULATES LEUKOCYTE RECRUITMENT IN THE BRAIN

Arroyo, Daniela Soledad¹; Gaviglio, Emilia Andrea¹; Peralta Ramos, Javier María¹; Bussi, Claudio¹; Avalos, Paula²; Cancela, María Liliana²; Iribarren, Pablo¹
*Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC*¹ *Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC)-CONICET-UNC*²

Microglial cells (MC) are phagocytes in the central nervous system that become activated in pathological conditions, resulting in microgliosis, manifested by increased cell numbers and inflammation in the affected regions. We previously demonstrated that TLR2 has the potential to induce autophagy in MC. Considering this, in this work we evaluated if autophagy play a role in the regulation of the activation and the recruitment of myeloid cells to the brain. We previously observed that injection of peptidoglycan (PGN; TLR2 ligand) from *S. aureus*, in mouse brain parenchyma (caudate putamen; CPU), resulted in a significant increase in the number of LC3B positive CD45⁺ microglia/macrophages cells in the site of injection ($p < 0,001$). In addition, coinjection of PGN and LY294002 or 3-MA (inhibitors of autophagy) failed to cause the increase of LC3B punctate parenchymal microglia ($p < 0,001$). In another set of experiments, we observed that PGN injection, increased the frequency CD11b/CD45⁺ cells (and particularly in the CD11b/CD45high fraction) in the CPU of mice compared to

controls ($p < 0,05$). We confirmed that PGN-induced recruitment of CD11b/CD45high cells was dependent by TLR2 activation, since injection of PGN in CPU of TLR2KO mice was unable to reproduce that effect ($p < 0,001$). Moreover, we found that PGN injection induced recruitment of different CD11b/CD45high population cells to the CPU. Therefore, we evaluated by flow cytometry the phenotype of the CD11b/CD45⁺ cells. We observed increased expression of MHC class II and CD86 molecules in these cells. Finally, we found that coinjection of PGN and LY294002 or 3-MA reduced the recruitment of CD11b/CD45high cells to the CPU and the expression of MHC class II and CD86 molecules in these cells. Our results suggest that autophagy induction by TLR2 agonists may regulate the leukocyte subpopulations in inflamed mouse brain.

538. (572) DIFFERENTIAL CHANGES IN ACTIVATION MARKERS ON CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN HIV (+) CHILDREN WITH DIFFERENT IMMUNO-VIROLOGICAL STATUS.

Quiroz, Héctor; Barboni, Graciela; Candi, Marcela; Gaddi, Eduardo; Balbaryski, Jeanette
Hospital General de Niños Dr. Pedro de Elizalde

The increase of the expression of activation markers on T lymphocytes is related to an adequate response of the immune system to the presence of pathogens. The expression of molecules such as CD38, HLADR, CD69, and others, is used to evaluate this response. HIV infection is characterized by the progressive immunologic impairment associated with a chronic immune activation. Both features are improved with antiretroviral therapy (ART). 43 HIV infected children treated with ART were enrolled in the study. Clinical, and immuno-virological evaluation was performed at baseline and after 12 \pm 5 months of follow-up (i,f). CD8⁺ CD38⁺ percentage level and mean fluorescence intensity of CD38 (MFI), and CD8+HLA-DR⁺, CD8+CD38+HLA DR⁺ percentage levels were assayed by flow cytometry. Same determinations were performed in a control group of 10 uninfected children. 27 patients under appropriate ART showed adequate and stable immuno-virological response (group A). Conversely, the others 16 children showed virological failure due to deficient adherence to treatment (group B). In 20 children of group A (74%), CD38 MIF, CD8+HLA-DR⁺ and CD8+CD38+HLA-DR⁺ percentage levels, diminish significantly ($p < 0.05$) between two points of follow-up : CD38 MIFi : 248 \pm 230, CD38 MIFf: 121 \pm 49; %CD8+HLA-DR+i: 70 \pm 28, %CD8+HLA-DR+f: 14 \pm 7; %CD8+CD38+HLA-DR+i: 64 \pm 26, %CD8+CD38+HLA-DR+f: 13 \pm 6, respectively, without change in CD8+CD38⁺ percentage levels. A not significant increase in the expression of such markers was observed in the remaining 7 children. Similarly, the difference in patients of group B was also not significant. A positive and significant correlation between CD38MIF-%CD8+HLA-DR⁺ ($r: 0.326$, $p: 0.002$) and CD38MFI-%CD8+CD38+HLA-DR⁺ ($r: 0.285$, $p: 0.008$), in the whole study group was recorded. The prolonged and specific inhibition of HIV replication related to an optimal adherence to ART, results in a progressive reduction of T cell activation markers expression.

539. (708) 23 YEARS FOLLOW-UP IN CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE

Bravo Kleiman, Alejandra; Moreira, Ileana; Comas, Dorina; Gómez Raccio, Andrea; Di Giovanni, Daniela; Gaillard, María Isabel; Bezrodnik, Liliana
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Chronic Granulomatous Disease (CGD) is a primary immunodeficiency caused by mutations in the NADPH oxidase which is responsible of respiratory burst in phagocytes. Patients affected by this condition suffer serious infections and inflammatory complications forming granulomas. Objectives: To record the clinical features and treatment outcome in 19 CGC patients and to report the follow-up of 3 of them after stem cell transplantation. Methods: Retrospective analysis of CGD patients records from the Immunology Department of a Children's Hospital from Nov 1991 to May 2014. Results: 19 patients were included (average follow-up 8.6 years). 18 have molecular diagnosis (12 X-linked, 6 autosomic

recessive) 1 is been studied. The mean age at onset was 1.2 yo and the age at diagnosis was 2.6 yo. The symptoms before diagnosis were: BCG lymphadenitis, pneumonia, adenitis, persistent fever, sepsis and urinary tract infection. Entities at diagnosis were: pneumonia with Aspergillus as the most prevalent germ, lymphadenopathy, abscesses and family history of CGD. The most frequent complications were pulmonary aspergillosis, adenitis, granulomas, abscesses and pulmonary tuberculosis. 3 patients received stem cell transplantation, all full matched, 2 unrelated and 1 related. 2 patients have good outcome with normal DHR test. The other transplanted patient does not achieve engraftment, and retransplantation is being planned. Four patients reached adulthood with good outcomes. Conclusions: Evaluation at the primary care level was often associated with a significant delay in the suspicion of immunocompromise (consultation delay 1.59 years). Initially, DHR test was performed and a quick corroboration of diagnosis was achieved (diagnostic delay in 0.083 y). BCG lymphadenitis was the most common clinical issue. Pulmonary aspergillosis was the most common clinical diagnosis and infectious complication of CGD. Hematopoietic precursors transplant can be considered as a therapeutic option.

540. (735) SUBSETS OF NAÏVE T CELLS IN PATIENTS WITH DI GEORGE SYNDROME

Rodríguez Broggi, María Guadalupe; Caldirola, María Soledad; Comas, Dorina; Hail, Fernanda; Bezrodnik, Liliana; Digiovani, Daniela; Gómez Raccio, Andrea; Galliard, María Isabel
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

The immunodeficiency due to thymic hypoplasia in patients with DiGeorge (DGS) results primarily of T cell lymphopenia. Most commonly, there is a mild to moderate peripheral blood CD4 lymphocytopenia with low to normal CD8 T lymphocytes. CD31CD45RACD4+ (CD4nCD31) cells represent a distinct population of naïve T cells with particularly low replicative history and high T cell receptor circle (TREC) content. To analyze the value of CD4CD45RA+ naïve (CD4n) and CD4nCD31 we investigated 21 patients (pts): median: 1yr (r: 0.08-18yr) with DGS diagnostic criteria and correlated with infections severity and/or autoimmunity (non cardiac complications). *Methods:* Lymphocytes count; T cells subsets: CD3CD4+ (LTCD4), CD3CD8+ (LTCD8), CD4n; CD4nCD31. *Results:* Clinical evaluation: 12/21 bacterial infections (2 with severe infections), 1 autoimmunity and 1 with intestinal T cell losses, which was excluded from the cohort. Laboratory: T cells subsets were compared with age matched controls and considered abnormal if lower than percentile 10 (P<10). 51% have low LTCD4 and 52% low LTCD8, CD4n were low (P<10) [median 375 (r: 21-1477/mm³)] in 16/21 (76%). CD4nCD31 low in 12/14 (86%); median 250 (r: 19-665/mm³). All patients with low CD4nCD31 had low CD4n too (correlation factor: r= 0.93). 2pts with severe infections have very low counts of CD4n: Pt.1(1yr): CD4n=32/mm³ (Pc10:1000/mm³) and Pt.2(2,5yr): CD4n=70/mm³ (Pc10: 430/mm³) *Conclusions:* LTCD4, LTCD8, CD4n and CD4nCD31 lymphopenia were common in DGS patients. Only the patients with very low CD4n (<100/mm³) associated more severe infections. CD4nCD31 counts did not show additional information respect of CD4n counts in these patients. *Comment:* an adequate follow up in the long term could give us new cut off points of the actual parameters or novel biomarkers with better correlations with clinical feature and functional assays.

541. (757) CXCR3 AND CCR5 CHEMOKINE RECEPTORS ARE CRUCIAL FOR DIABETOGENIC T-CELLS TO INDUCE DIABETES

Breser, María Laura¹; Korf, Hannelie²; Motrich, Rubén Darío¹; Van Hoeck, Jelter²; Gysemans, Conny²; Mathieu, Chantal²; Rivero, Virginia Elena¹
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET, Departamento de bioquímica clínica, Facultad de Ciencias Químicas. UNC¹ Clinical and Experimental Endocrinology, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium²

Type-1 diabetes is currently the most prevalent autoimmune disease worldwide. It is characterized by the destruction of beta cells by an autoimmune response that leads to insufficient or absent insulin production. NOD mice spontaneously develop a type-1 diabetes-like autoimmune disease, with the induction of specific Th1 and Tc1 immune responses. When activated, these Th1 or Tc1 cells express considerable levels of CXCR3 and CCR5 chemokine receptors suggesting the presence of organ-selective migration patterns. Herein, we aimed to advance in the current understanding of diabetogenic T cell migration patterns with special focus on CXCR3 and CCR5 chemokine receptors. Different experiments using NOD mice and TAK-779, a mimetic antagonist of CXCR3 and CCR5, were performed. Firstly and by control experiments, we ruled out the possibility that drug treatment affected macrophage and T cell activation or/and cytokine secretion abilities. On day 0, splenocytes from diabetic NOD mice were i.v. adoptively transferred into SCID-NOD recipient mice. From day 1 on, cell recipient mice were treated with TAK-779 (Treated) or vehicle (Control), and glycemia levels were monitored daily. After 4 weeks of continuous treatment, control animals showed a 100% diabetes incidence, while in treated animals it decreased up to 50% and remained stable for more than 10 weeks (p<0.01). However, when treatment administration ceased, disease protection reverted in treated animals in a time-dependent fashion. In this work, we identified that CXCR3 and CCR5 chemokine receptors are critical for diabetogenic T cells to migrate to the pancreas and concomitantly induce disease. From these findings, chemokine receptors antagonists emerge as promising therapeutic approaches to be investigated.

542. (394) INTERLEUKIN (IL)-17A HOMODIMER REDUCES PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE PRODUCTION BY INFLAMMATORY BOWEL DISEASE MUCOSA CULTURED EX VIVO

Curciarello, Renata^{1,2}; Biancheri, Paolo²; Ammoscato, Francesca²; Giuffrida, Paolo²; Macdonald, Thomas T²; Docena, Guillermo H¹
Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP¹ CIID, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, UK²

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic disorders in which pro-inflammatory cytokines are key players in the immunopathogenesis. Interleukin (IL)-17A was found to be up-regulated in mucosal lesions. IL-17A shares 50% homology with IL-17F, they may form IL-17AA and IL-17FF homodimers or IL-17A/F heterodimers. Since the role of IL-17 dimers is unknown in IBD, we studied the pro-inflammatory effect of IL-17AA, IL-17FF and IL-17A/F in intestinal samples of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) patients. Inflamed colonic biopsies from 17 IBD patients (6 UC and 11 CD) were cultured *ex vivo* for 24 hours with IL-17AA, IL-17FF or IL-17A/F (1 ng/ml). Mucosal myofibroblasts isolated from the inflamed colon of 4 CD and 4 UC patients were cultured with increasing concentrations (1-100 ng/ml) of each dimer or tumor necrosis factor (TNF)-a (20 ng/ml) as control. IL-6 and IL-8 were measured in culture supernatants by ELISA. We found in inflamed IBD biopsies that IL-17AA, but not IL-17FF, significantly reduced both IL-6 and IL-8 production, whereas IL-17A/F only decreased IL-8 release. No differences were observed between CD and UC samples. As expected, TNF-a stimulation significantly increased IL-6 and IL-8 production in CD and UC myofibroblasts. However, neither IL-17AA, nor IL-17FF, nor IL-17A/F modified the secretion of IL-6 and IL-8 in IBD myofibroblasts. In conclusion, we found that IL-17AA exerted an anti-inflammatory action on inflamed IBD biopsies, and this effect is not mediated by myofibroblasts. Further studies are needed to identify the cell target for IL-17AA in IBD mucosa.

543. (427) CYTOKINE EXPRESSION IN STRESSED MICE FED WITH PROBIOTIC STRAINS

Palomar, Martín¹; Perdígón, Gabriela^{1,2}; Maldonado Galdeano, Carolina^{1,2}

Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET¹ Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT²

The gastrointestinal tract and the immune system are sensitive to different stressor factors. In previous works, stressed mice model, showed changes in the intestinal microbiota composition and in the number of IgA-producing cells that was reverted by probiotics administration. The aim of this work was to determine the cytokine producing cells in the intestinal lamina propria of the small intestine, in intestinal fluid (IF), serum (S) and supernatant of intestinal epithelial cells (IECs), peritoneal macrophages (PMQ) and spleen macrophages (SMQ) of mice in the stress model and the changes induced by probiotics administration. BALB/c mice were stressed over 11 days in a stress protocol consisting of food deprivation during 12h/day (8:00 pm-8:00am) and diurnal immobilization for 3h. Mice were divided into 8 groups: Normal Control (NC), NC feed *Lactobacillus casei* CRL431 (NC+CRL431), NC feed *Lactobacillus paracasei* CNCMI-1518 (NC+ CNCMI-1518), NC feed with probiotic fermented milk (NC+PFM), stressed mice (S+H₂O), stressed mice feed *Lactobacillus casei* CRL431 (S+CRL431), stressed mice feed *Lactobacillus paracasei* CNCMI-1518 (S+ CNCMI-1518), and stressed mice feed with probiotic fermented milk (S+PFM). Samples of serum, intestinal fluid, IECs, PMQ and SMQ were taken at 12 day. The IL-10 production was measured by ELISA test and the cytokine+ cells (IL-1, IL-6, IL-10 and TNF α) were determined in intestinal tissue section by indirect immunofluorescence. Results show that probiotic strains and probiotic fermented milk restore cytokines+ cells to NC levels in gut of stressed mice ($p \leq 0.01$). IL-10 levels is decreased in stressed mice, the probiotic administration restored this values compared to NC ($p \leq 0.05$). The PMQ and SMQ supernatant not showed significant changes. Conclusion: The consumption of probiotics restores the cytokines levels to normal values, in stressed mice, improving the gut mucosal immune system.

- 544. (502) LA PROSTAGLANDINA E2 INHIBE EL PERFIL INFLAMATORIO INDUCIDO POR TGF-BETA SOBRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS**
Remes Lenicov, Federico; Varese, Augusto; Merlotti, Antonela; Sabatté, Juan; Geffner, Jorge; Ceballos, Ana
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS)-CONICET-UBA

En trabajos previos, hemos demostrado que las prostaglandinas (PG) del plasma seminal son esenciales para inducir un perfil tolerogénico en las células dendríticas (CDs) derivadas de monocitos. Sin embargo, el plasma seminal contiene altas concentraciones de TGF-beta, cuya presencia durante la diferenciación de CDs potencia un fenotipo inflamatorio. El objetivo de este estudio es caracterizar la interacción entre TGF-beta y las PG sobre la diferenciación de las CDs a partir de monocitos. El plasma seminal se obtuvo a partir de semen de donadores sanos. Las CDs fueron obtenidas a partir de monocitos cultivados con IL-4 y GM-CSF por 5 días, en ausencia (control) o presencia de TGF-beta (T-CDs), de PGE2 (PG-CDs), la combinación de estos últimos (PG+T-CDs) o de plasma seminal (PS-CDs). Se analizó el fenotipo de las CDs por citometría y se midió la producción de citoquinas por ELISA. Se estudió la capacidad de las CDs de expandir la población T CD4+CD25+FoxP3+ por citometría de flujo. Las T-CDs mostraron un fenotipo CD1a+CD14-. El agregado de PGE2 (10^{-9} a 10^{-6} M) durante la diferenciación inhibió el efecto de TGF-beta, obteniéndose un fenotipo CD1a-CD14+, coincidente con el obtenido para las PG-CDs y las PS-CDs. En el mismo sentido, mientras que las T-CDs produjeron altos niveles de IL-12p70 e IL-23 al ser estimuladas con LPS, el agregado de PGE2 inhibió estos incrementos. Los mismos resultados se obtuvieron realizando la diferenciación con plasma seminal libre de TGF-beta (fracción de peso molecular <3 kDa). En cultivos mixtos con linfocitos T alogéneos, las T-CDs inhibieron la expansión de células T CD4+CD25+FoxP3+ con respecto a CDs control (2,3% vs 5,3%), mientras que el agregado de PGE2 indujo la expansión de las mismas, tal como ocurrió con las PG-CDs y las PS-CDs

(7,3%, 9,9% y 8,6%, respectivamente). Estos resultados sugieren que la presencia de TGF-beta durante la diferenciación de CDs no altera el fenotipo tolerogénico inducido por las PG.

- 545. (545) AIRWAY EPITHELIUM PARTICIPATION IN THE NEONATAL PREVENTION OF EXPERIMENTAL ASTHMA**
García, Luciana¹; Leimgruber, Carolina¹; Uribe Echevarría, Elisa Margarita³; Errea, Agustina²; Rumbo, Martín²; Maldonado, Cristina Alicia¹
Centro de microscopía Electrónica, Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud (INICSA)-CONICET¹ Facultad de Ciencias Exactas, Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN)-UNLP² Servicio de Neumología, Sanatorio Allende, Córdoba³

Genetic and clinical data denotes airway epithelium (AE) role in the onset of the allergic airway inflammation (AAI). Several studies proved that microbial stimulus can protect newborn mice (nbm) from the AAI as well as provide a long-term defense from unrelated injuries in the AE. Our aim was to evaluate the impact of newborn microbial stimulus on epithelium host defense proteins (HDps), as Club cell secretory protein (CCSP), TLR4 and antimicrobial Surfactant D (SP-D) (IHQ/WB), cytokines (ELISA), and its correlation with AAI modulation. Balb/c NBM were exposed to intranasal (i.n.) PBS or LPS (200mg/ml-5 μ l), 3 times/ week on days 3-13 after delivery (AD). At 4 and 6 weeks AD, they were sensitized by i.p. 100 μ l OVA/Alumm (1mg/1mg/ml), and then assigned into 4 groups (n=10) and challenged for 10 consecutive days with i.n. OVA (1mg/ml) (LPS/OVA and PBS/OVA groups) or vehicle (LPS and PBS groups). Bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue were obtained ending the protocols. LPS mice, showed higher immunoreactivity for CCSP, SP-D and TLR4 in bronchiolar Club cells (CC) vs PBS group; in BAL they exhibited higher levels of TNF α and IFN γ ; significantly TSLP, a Th2 promoter cytokine expressed by AE, became negative ($p < 0.01$ vs PBS). To further investigate changes primed by LPS at AE, we evaluated HDp genes by RT-qPCR in bronchioles by laser dissection microscopy in LPS-exposed nbm and sacrificed at 4 weeks AD; TLR-4 and TNF α were increased in coincidence with their immunoeexpression. In correlation, in LPS/OVA group, CC phenotype was better preserved, AB-PAS positive cells were reduced ($p < 0.001$ vs OVA) and the increased expression of epithelial HDp was similar to LPSmice in spite of the AAI; eosinophils and the levels of IL-4 and TSLP, were reduced in BAL. These results are indicative of the long-term preservation of innate defenses promoted in AE that protected from a Th2-biased and contributed to a more balanced immune response in front to allergens.

- 546. (592) SHORT CHAIN FATTY ACIDS PRODUCT OF MICROBIAL FERMENTATION MODULATE MYELOID CELL ACTIVATION IN VITRO**
Errea, Agustina¹; Irarorda, Carolina²; Cayet, Delphine³; Abraham, Analía²; Garrote, Graciela²; Sirard, Jean Claude³; Rumbo, Martín¹
Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA)-CONICET-UNLP² Institut Pasteur Lille, France³

Mucosal immune response may be modulated by microbial metabolites. The recent discovery of several signaling receptors able to sense short chain fatty acids (SCFA) have placed these molecules as putative mediators of host-microbial interaction, instead of considering them as mere inert terminal metabolic products. SCFA are present in high levels in large intestinal lumen where they are produced by intestinal microbiota. The aim of this work was to determine if SCFA (butyrate, propionate, acetate and lactate) can modulate the properties of activated bone marrow derived macrophages (BMMs) or dendritic cells (BMDCs). C57BL/6 was used as bone marrow source. BMMs were derived upon 9 days differentiation in presence of M-CSF and BMDCs were derived upon 9 days of differentiation in presence of GM-CSF. Cells were stimulated with 100 ng/mL of *E.coli* LPS, in presence of different

concentrations of the different SCFA. Activation of BMDCs was monitored by changes in surface expression of CD40, CD80 and CD86 and IL6 and IL12 production upon overnight incubation. Secretion of IL6 and IL12 was evaluated as indicator of BMM stimulation. In all cases SCFA modulated surface expression of CD40 in BMDCs ($p < 0.05$). Butyrate and propionate showed these effects at concentrations higher than 1 mM whereas lactate and acetate modulated surface expression at concentrations higher than 10 mM. No changes were observed in IL12 production whereas butyrate and propionate affected IL6 generation at concentrations higher than 10 mM ($p < 0.05$). In three independent experiments similar results were observed. In the case of BMM, lactate showed inhibition of IL6 and IL12 production at concentrations higher than 20 mM ($p < 0.05$). In coincidence with reports that indicate protective effects of some SCFA in colitis models, our results indicate that SCFA, in concentrations similar to found in large bowel lumen, can modulate activity of myeloid cells activated by TLR signals.

547. 593) TEAR FILM HYPEROSMOLARITY DISRUPTS THE IMMUNE TOLERANCE OF THE OCULAR SURFACE: A POTENTIAL INITIATOR OF DRY EYE?

Guzmán, Mauricio¹; Keitelman, Irene Angélica¹; Sabbione, Florencia¹; Trevani, Analía Silvina^{1,2}; Giordano, Mirta Nil-da^{1,2}; Galletti, Jeremías Gatón¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Depto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA²

Introduction: Tear film hyperosmolality is commonly observed in dry eye, but its exact role in the pathogenesis of this ocular surface disorder is unknown. A localized form of autoimmune disease, dry eye involves disruption of the ocular surface's immune homeostasis, but the sequence of events that initiates it is unclear. Objective: To assess conjunctival immune tolerance in a murine model of hyperosmolality stress. Study design: 8- to 12-week-old female Balb/c mice were instilled isoosmolar (0.3 Osm) or hyperosmolar (3 Osm) saline on both eyes 3 times daily for 5 days. Ovalbumin (OVA) was instilled on both eyes at different time points. After subcutaneous immunization with OVA in adjuvant (day 8), induced T cell responses were measured by the delayed-type hypersensitivity (DTH) response in the footpad (day 15). In some experiments, the T cells in draining lymph nodes (day 5) were evaluated by flow cytometry. Supernatants from Pam212 epithelial cells exposed to iso- or hyperosmolar medium were assayed in a phagocytosis assay with the Raw 2647 macrophage cell line. Results: Compared to non-instilled immunized mice, OVA-instilled mice developed reduced DTH responses, as did their OVA+isoosmolar saline-instilled cage mates ($p < 0.05$). By contrast OVA+hyperosmolar saline-instilled mice exhibited full DTH responses. In the latter, T cells in draining lymph nodes showed increased expression of activation (CD69, CD25) and memory (CD44) markers. Supernatants from Pam212 cells exposed to hyperosmolar medium for 4h, but not to control medium, increased the phagocytic activity of a macrophage cell line, as did lipopolysaccharide. Conclusion: Tear film hyperosmolality is sufficient to abrogate conjunctival tolerance towards an innocuous antigen in mice. This effect is probably derived from the proinflammatory cascade that hyperosmolar stress elicits on the conjunctival epithelium.

548. (260) TOXOPLASMA GONDII INFECTION MODULATES SYSTEMIC ALLERGIC IMMUNE RESPONSE

Fenoy, Ignacio; Sánchez, Vanesa; Soto, Ariadna; Picchio, Mariano; Perrone Sibilia, Matías; Aldirico, María de los Ángeles; Martín, Valentina; Goldman, Alejandra
Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente (CESMA)-UNSAM.

In agreement with epidemiological studies, we previously showed that *T. gondii* infection prevents allergic airway inflammation. The mechanisms would be related to the strong Th1 response induced against the parasite and to regulatory cells induction. The aim of the present study is to analyze whether *T.*

gondii allergy modulation extents to a systemic level or it is only confined to the lung. BALB/c mice were orally infected by *T. gondii* cysts. Acute and chronic infected animals were ip sensitized with the allergen (OVA)/alum and one week later mice were aerosols challenge (TOa and TOc respectively). Control groups include naive, acute and chronic infected mice (N, Ta y Tc) as negative control and allergic mice (OVA-sensitized and challenged) as positive control (O). Splenocytes were *ex vivo* cultured and OVA stimulated to evaluate cytokine production and proliferative capacity. Infection before allergic sensitization resulted in a diminished in Th2 cytokines (IL-4: N 4±3, Ta 27±15, Tc 3±1, O 393±98, TOa 192±38', TOc 21±7'; IL-5: N 50±31, Ta 7±2, Tc 10±10, O 503±173, TOa 110±55', TOc 89±50'; IFN-γ: N 52±13, Ta 52±16, Tc 20±3, O 72±24, TOa 257±92', TOc 40±21; pg/ml±SEM) and it also resulted in a lower proliferative capacity (N 2673±570, Ta 3876±947, Tc 2580±400, O 12892±1650, TOa 1310±427''', TOc 1794±358'''; ΔCPM±SEM) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs O group, ANOVA with Bonferroni's test *a posteriori*). Direct cutaneous anaphylaxis was next assayed. Infection before allergic sensitization diminished the anaphylactic reaction, indicating that mice in both TO groups show lower vasodilatation and vascular permeability due to lower cutaneous mast cell degranulation. Our results extend earlier work and show that, in addition to lung airway inflammation, *T. gondii* infection can suppress allergic responses at systemic level. These results open the possibility that this protozoan infection could modulate other allergic disorders such as atopic dermatitis or oral allergies.

HEMATOLOGÍA 1

549. (162) ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS ERITROCITARIAS EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS TRATADAS CON PROANTOCIANIDINA EXTRAÍDA DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC).

García, Gloria¹; Crosetti, Diego¹; Dominighini, Alicia¹; Urli, Leda¹; Galliano, Sebastián¹; González, José¹; Monti, Juan²; Lambertucci, Flavia²; Ronco, María Teresa²; Wagner, Marcelo³; Carnovale, Cristina E³; Luquita, Alejandra¹
Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario¹ Cátedra de Fisiología, Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de Rosario, CONICET² Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³

Las infusiones de *Lc* o muérdago criollo se utilizan en medicina popular 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 del índice de rigidez (IR) y de estomatocitos. Una fracción enriquecida en Proantocianidinas fue obtenida de *Lc* (PLC). Se analizó el efecto del tratamiento con PLC sobre la concentración de Co y las propiedades reológicas eritrocitarias en ratas hipercolesterolemicas. 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). Luego, los animales fueron inyectados i.p. durante 3 días cada 24 horas, con solución fisiológica (C) (n=6) o con PLC 3 mg /100g peso corporal (T) (n=6). El día 4, se anestesiaron, y se obtuvo sangre por punción cardíaca. Se determinaron Co (método enzimático), CoHDL y CoLDL en plasma. En sangre: Co de membrana por método enzimático (previa lisis hipotónica y extracción lipídica), forma eritrocitaria por microscopía y cálculo del Índice Morfológico (IM), IR por filtración a través de membranas nucleopore y ordenamiento lipídico (OL) estimado por el parámetro hiperfino Amax T// del ácido 5-doxil esteárico, unido al C en posición 5 de la bicapa, utilizando Resonancia Paramagnética Electrónica. Resultados: (media ± ES). Co plasmático (mg%): C: 89,66 ± 2,29, T: 61,18 ± 3,30*, Co HDL: C: 23,11 ± 0,65, T: 15,57 ± 0,60*; Co LDL: C: 29,92 ± 2,27, T: 16,13 ± 1,33*. IM: C: - 2,45 ± 0,08, T: -2,18 ± 0,11 (ns); IR: C: 5,71 ± 0,18; T: 5,16 ± 0,22 (ns); Co de membrana (mg%): C: 1,23 ± 0,10, T: 0,84 ± 0,09*; OL: C: 56,90 ± 0,08, T: 56,90 ± 0,07 (ns), (* $p < 0.05$ vs C, ns: no

significativo vs C). Conclusión: El tratamiento con la fracción de Lc enriquecida en Proantocianidinas conduce a un descenso del colesterol plasmático sin producir alteraciones hemorreológicas en ratas hipercolesterolémicas.

550. (255) LAS PLAQUETAS INTERACCIONAN CON COXSACKIEVIRUS B Y JUEGAN UN PAPEL CRÍTICO EN LA PATOGENESIS DE LA MIOCARDITIS VIRAL.

Rivadeneira, Leonardo¹; Soledad, Negrotto¹; Jaquenod De Giusti, Carolina²; Ure, Agustín²; Mena, Hebe A.¹; Schattner, Mirta¹; Gómez, Ricardo M.²

Laboratorio de Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹ Laboratorio de Virus Animales, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata²

Los Coxsackievirus B (CVB) causan la mayoría de las miocarditis relacionadas con enterovirus humanos, su receptor (CAR) se expresa en plaquetas (PL) y su modelo murino de miocarditis ha sido utilizado ampliamente en estudios de patogénesis. Con el objetivo de analizar el rol de las plaquetas (PL) en la patogénesis de las infecciones virales, exploramos la interacción de PL con CVB. La interacción entre CVB y PL humanas fue demostrada por detección del ARNm de las cepas CVB1 y 3 (RT-PCR) y de una proteína viral (citometría de flujo e inmunofluorescencia). Las partículas infecciosas detectadas en sobrenadantes y pellets ($3,8 \pm 1,0$ y $2,6 \pm 0,7$ Log₁₀PFU/10⁶ PL infectadas) no aumentaron en función del tiempo, sugiriendo que CVB no replica en PL. La unión de CVB fue independiente de CAR y resultó en un aumento de P-selectina ($17 \pm 2^*$ intensidad de fluorescencia media (IFM)) y fosfatidilserina ($26 \pm 3^*$ IFM) vs. PL no infectadas (6 ± 1 y 11 ± 3 IFM). El rol de las PL en la severidad de la miocarditis inducida por CVB3 fue evaluado en ratones C57BL/6J depletados (o no) de PL (suero anti PL). Los ratones infectados mostraron una trombocitopenia rápida ($4,1 \times 10^9$ vs. no infectados: $5,8 \times 10^9$ /mL) que se correlacionó con un aumento de fosfatidilserina plaquetaria ($53 \pm 5^*$ vs. no infectados: 11 ± 3 IFM) y en la formación de agregados mixtos ($34 \pm 4^*$ vs. no infectados: $8 \pm 4\%$), sin modificación de la P-selectina o del factor von Willebrand. En ratones infectados y deplecionados de PL, la mortalidad ($75^*\%$), el título viral en sangre ($3,1 \pm 0,9^*$ Log₁₀PFU/10⁶mL) y corazón ($2,4 \pm 0,7^*$ Log₁₀PFU/10⁶mg) y la miocarditis fueron significativamente mayores que en ratones infectados y recuento plaquetario normal (25% , $1,8 \pm 0,4$ Log₁₀PFU/10⁶mL, $0,6$ Log₁₀PFU/10⁶mg), mientras que los niveles plasmáticos de IgG fueron menores ($0,81 \pm 0,02$ vs. $1,16 \pm 0,07^*$ Abs 450nm). N=3-7, *p<0.05. Nuestros datos revelan que las PL desempeñan un papel crítico en la sobrevida y respuesta inmune del huésped contra la infección por CVB3.

551. 355) CUANTIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA PHILADELPHIA POSITIVO.

Ferri, Cristian Alberto¹; Riccheri, Cecilia²; Bietti, Julieta²; Cedola, Alejandra²; Bianchini, Michele³; Aversa, Luis⁴; Pennesi, Sandra⁴; Milone, Gustavo²; Larripa, Irene¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹ Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda (GATLA)² Fundación Cáncer (FUCA), Instituto Alexander Fleming³ Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez⁴

El cromosoma Philadelphia (Ph) producto de la t(9;22)(q34;q11) origina el gen de fusión BCR-ABL1, el cual se observa en un 3% a 5% de los casos con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) pediátrica. Estos pacientes poseen muy mal pronóstico y alta probabilidad de recaída con el tratamiento convencional es por ello que se han desarrollado protocolos más agresivos que incluyen inhibidores de tirosina quinasa. El objetivo de este estudio fue cuantificar los transcritos BCR-ABL1 en los pacientes LLA Ph+ en las diferentes etapas del tratamiento (AI, RA1, RA2, RA3, Protocol II) para evaluar la cinética del clon tumoral en respuesta a la quimioterapia más imatinib 300 mg/m²/día. Se analizaron 25

pacientes del protocolo GATLA (Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda) LLA-Ph+ 2011 que incluye a pacientes de 1 a 21 años diagnosticados con LLA Ph+, durante un período de seguimiento de 32 meses (Mediana=15 meses). Para determinar el valor basal de referencia de BCR-ABL1 se estudiaron 11 muestras de médula ósea al diagnóstico, siendo el valor obtenido de 55,5% (rango 29%-92%). La respuesta molecular se definió como óptima (RMO) o indetectable (RMO-I) si los valores de transcritos fueron \leq a 0,055% o no detectables respectivamente. Los resultados preliminares muestran una sobrevida global de $79\% \pm 10\%$ y una sobrevida libre de eventos de $67\% \pm 10\%$ a los 12 meses. El porcentaje de pacientes que alcanzaron RMO en las diferentes fases del estudio (AI, RA1, RA2, RA3, Protocol II) fueron 13,3%; 41,2%; 33,3%; 45,5% y 76,9%; respectivamente. De 17/25 pacientes evaluables en mantenimiento y post-trasplante, 88% (15/17) lograron RMO y de ellos el 87% (13/15) presentaron RMO-I. Nuestros datos preliminares demuestran la efectividad de la terapia combinada y confirman la utilidad de la cuantificación del BCR-ABL1 como marcador de respuesta al tratamiento en LLA Ph+.

552. (400) PROTEÍNAS FOSFATASAS INVOLUCRADAS EN LA FALTA DE ACCIÓN PROLIFERATIVA DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN CÉLULAS CON CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN ERITROIDE

Chamorro, María Eugenia; Maltaner, Romina; González, Guadalupe; Vittori, Daniela; Nesse, Alcira
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, (IQUIBICEN)-CONICET

Previamente demostramos la asociación de la falta de acción proliferativa de la eritropoyetina carbamilada (cEpo) en células con capacidad de diferenciación eritroide (UT-7) con un aumento del factor inhibitorio p27^{Kip1}, el arresto del ciclo celular y la incapacidad de mantener una fosforilación sostenida de Akt y FOXO3a. Sin embargo la activación de Jak2 por cEpo, al igual que por Epo, al inicio de la señalización sugirió que la acción diferencial entre las eritropoyetinas estaría a nivel de los intermediarios de la señalización de proliferación. Con el fin de investigar esta hipótesis profundizamos el análisis de la activación de vías de proliferación. En presencia de cEpo, tanto la fosforilación de Jak2 como la de ERK fue detectada sólo a los 15 min (Western blotting), disminuyendo significativamente a los 60 min (cEpo60' vs. Epo60', P<0,05, n=3). Postulamos que el efecto diferencial entre cEpo y Epo estaría asociado al silenciamiento de vías de señalización; evaluamos entonces, la inducción de la fosfatasa PTP1B. Se corroboró el aumento de su expresión en presencia de cEpo, con respecto a la de Epo (citometría de flujo; cEpo vs. Epo, P<0,05, n=3), acompañado por un aumento significativo de la actividad enzimática (cEpo vs. Epo, P<0,05, n=4). La observación de colocalización (microscopía confocal) de PTP1B con el heteroreceptor (REpo/RBc) sustenta la propuesta de que la fosfatasa defosforila la señalización de cEpo, interrumpiendo la proliferación celular. Además, se incrementó la proliferación de células UT-7 por cEpo en ensayos de inhibición de PTP1B con Cingel 2Me ($33,3 \pm 4,4\%$, P<0,05) y con el inhibidor de fosfatasa o-vanadato ($46,4 \pm 5,4\%$, P<0,01, n=3), con respecto a ensayos sin inhibidor. Aunque no se alcanzó el nivel de activación celular por Epo se explica al menos en parte, la desactivación del heteroreceptor. El rol del proteasoma en la terminación de la señal sería clave para dilucidar la acción diferencial entre Epo y cEpo sobre células eritroides.

553. (506) INTERACCIONES ENTRE BRUCELLA ABORTUS Y PLAQUETAS: UN POSIBLE MECANISMO ANTI-BACTERIANO

Velásquez, Lis Noelia¹; Delpino, M. Victoria²; Milillo, M. Ayelén¹; Giambartolomei, Guillermo H.²; Pozner, Roberto G.¹; Barrionuevo, Paula¹
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina¹ Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET- UBA²

La brucelosis humana posee un amplio espectro clínico y presenta una gran tendencia a la cronicidad. Las plaquetas, junto con

los neutrófilos y los monocitos, son una de las primeras células con las que se encuentran las bacterias al ingresar al organismo. Sin embargo, se desconoce si *B. abortus* es capaz de establecer alguna interacción con plaquetas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue investigar la posible interrelación entre *B. abortus* y las plaquetas y su implicancia en el crecimiento bacteriano. Para esto, se aislaron plaquetas humanas de sangre periférica (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 plaquetas/ml) y se incubaron con *B. abortus* (1×10^7 bacterias) por 24 h. Luego, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) realizando diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas en placas de agar tripeína soya para evaluar la supervivencia bacteriana. En estas condiciones, las plaquetas fueron capaces de disminuir significativamente el número de UFC de manera concentración dependiente ($p < 0,01$). Resultados similares fueron obtenidos cuando se utilizaron bacterias pre-tratadas por 30 min con suero proveniente de dadores sanos o de pacientes con brucelosis activa, indicando que la capacidad microbicida de las plaquetas no depende de la opsonización de *B. abortus* ($p < 0,01$). A su vez, mediante microscopía confocal demostramos que la inhibición del crecimiento bacteriano se asocia con una interacción física entre bacterias y plaquetas. Utilizando *B. abortus*-GFP, observamos que el $70 \pm 5\%$ de las bacterias formaba agregados con las plaquetas. Este fenómeno podría explicar la inhibición en el crecimiento bacteriano dado que las plaquetas poseen la habilidad de liberar proteínas microbicidas. En conjunto, estos resultados demuestran que en nuestras condiciones experimentales *in vitro* las plaquetas pueden interactuar directamente con *B. abortus* y sugieren un potencial rol para estas células en la protección frente a la infección temprana.

554. (667) LOS POLIMORFISMOS 1236TT Y 3435TT DEL GEN MDR1 SE ASOCIAN A PEOR RESPUESTA TERAPÉUTICA EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Weich, Natalia; Ferri, Cristian; Larripa, Irene; Fundia, Ariela Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina

El tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) con imatinib (IM) muestra una excelente respuesta hematológica, citogenética y molecular. Sin embargo, alrededor del 30% de los pacientes pueden presentar resistencia, originada principalmente por mutaciones en el gen *ABL1*. Otros mecanismos de resistencia se asocian con variaciones genéticas en el gen *MDR1/ABCB1* que influye en la farmacocinética del IM. A fin de evaluar la relación de los polimorfismos en *MDR1* y la respuesta al IM, se estudiaron 60 pacientes (32 mujeres y 28 hombres, edad media 50 ± 2 años) con resistencia al tratamiento. La falta de respuesta al IM se definió a nivel citogenético y molecular en 2 estudios consecutivos, en los cuales se observó persistencia del cromosoma Philadelphia y altos niveles de transcritos *BCR-ABL1*. Se evaluaron 3 polimorfismos de nucleótido único (SNP): c.1236C>T, c.3435C>T y c.2677G>T/A. mediante PCR múltiple alelo-específica. El estudio de mutaciones en el gen *ABL1* se hizo por RT-PCR y secuenciación. El nivel del transcripto *BCR/ABL1* se determinó por qRT-PCR. La asociación de cada SNP con la evolución clínica se determinó considerando el cambio de tratamiento como un evento de respuesta insatisfactoria o intolerancia al IM. Las curvas de Kaplan-Meier muestran que los pacientes con genotipos 1236TT ó 3435TT tuvieron peor respuesta al tratamiento respecto de los restantes genotipos (CC/CT) ($p=0,017$, $p=0,0046$, respectivamente). Los individuos portadores de ambos genotipos (1236TT+3435TT) sufrieron un cambio de tratamiento a los 14,47 meses respecto de los portadores de los otros genotipos (35,93 meses) ($p=0,0043$). Estos resultados sugieren que los SNPs 1236TT y 3435TT podrían ser considerados como marcadores pronóstico de respuesta al tratamiento con IM.

555. (705) FUNCIÓN DEL TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1 Y ZIP14 (SLC39A14) EN PULMÓN EN UN MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO

Giorgi, Gisela; Fernández Delias, Florencia; Roque, Marta E Laboratorio de Fisiología Humana, Universidad Nacional del Sur

El pulmón está en continua exposición al Fe del ambiente externo y como consecuencia, en contacto con especies reactivas del oxígeno cuya acción sobre el ciclo del Fe no ha sido esclarecida en este tejido. Objetivo: evaluar los efectos del exceso de Fe sobre la función pulmonar estudiando proteínas claves del Fe como el Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1), ZIP14, Prohepcidina y Ferritina. Para ello, desarrollamos un Modelo de Sobrecarga de Fe (SFe) con Ratones hembras CF1 ($n=12$ /grupo, diseño pareado) divididos en 2 grupos: 1) SFe: ip. Fe-Sacarato, cada 3 días/12 días (3g/Kg pc); 2) Adecuado Fe (Control): NaCl(0,9%). Se siguieron las normas internacionales de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAE-UNS). *Determinaciones*: Fe-tisular; $\mu\text{mol/g}$. *IHQ*: anti-DMT1, anti-ZIP14, anti-Prohepcidina; anti-Ferritina; *Western Blot*: anti-DMT1; anti-ZIP14. *Estadística*: t-student; $p < 0,05$. Se observó aumento significativo del Fe pulmonar en SFe ($23,3 \pm 7,7$), respecto al Control ($0,3 \pm 0,5$). DMT1 se localizó en la membrana apical en células epiteliales de las vías respiratorias (CEVR) en SFe y mostró distribución citoplasmática homogénea en el Control. Por WB no se observaron cambios en DMT1. En CERV la inmunomarcación de ZIP14 fue más evidente en SFe que en el Control; WB mostró aumento de ZIP14 en sobrecarga. Por IHQ, la expresión de Prohepcidina en CEVR y macrófagos fue similar en SFe y en Control, por lo que no tendría un rol regulatorio. La localización de Ferritina fue evidente en el citoplasma apical en CEVR en SFe, mientras que su expresión citoplasmática fue homogénea en el Control. En CERV, la localización de DMT1 desplazada hacia la membrana apical y el aumento de ZIP14 visto en sobrecarga, reflejarían el rol importador del Fe de ambas proteínas. La Ferritina presente en el citoplasma apical de CEVR representaría un mecanismo de liberación apical del Fe. Estos resultados muestran que el pulmón posee mecanismos de protección frente al exceso de Fe mediado por DMT1, ZIP14 y Ferritina.

556. (728) MODELO DE DEFICIENCIA DE HIERRO: FUNCIÓN DE TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES 1 Y ZIP14 (SLC39A14) EN TEJIDO PULMONAR

Giorgi, Gisela; Roqué, Marta E Laboratorio de Fisiología Humana, Universidad Nacional del Sur

La identificación del Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1) y ZIP14 (SLC39A14) en pulmón, abrió interesantes expectativas para el conocimiento de la homeostasis del Fe y sus alteraciones en deficiencia del biometal. Ratones hembras CF1 ($n=6$ /grupo, diseño pareado) fueron divididos en dos grupos: 1) Deficiencia de Fe (DFe): flebotomías crónicas del seno retroorbital bajo anestesia (5 días/32 días); 2) Adecuado Fe (Control): anestesia (5 días/32 días). Se siguieron las normas internacionales de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAE-UNS). *Mediciones*: Fe-tisular ($\mu\text{mol/g}$), *IHQ*: anti-DMT1, anti-ZIP14, anti-Prohepcidina, anti-Ferritina/ anti-rabbit-HRP. *Western Blot*: anti-DMT1; anti-ZIP14/ anti-rabbit(HRP); *Estadística*: t-student $p < 0,05$. No se observaron cambios significativos en el Fe pulmonar en los dos grupos ($0,10 \pm 0,02$ vs $0,13 \pm 0,06$), mientras que disminuyeron significativamente en bazo ($25,7 \pm 2,1$ vs $4 \pm 0,9$) e hígado ($2,6 \pm 0,1$ vs $1,1 \pm 0,3$) en DFe (Control vs. DFe). DMT1 se localizó en la membrana apical en células epiteliales de las vías respiratorias (CEVR) en DFe, comparado con la localización intracelular del Control. Por WB se observó un aumento significativo de los niveles de DMT1 en DFe. En CEVR en DFe, la expresión de ZIP14 fue leve comparada con el Control; WB mostró disminución de ZIP14 en DFe. El pro-peptido Prohepcidina fue identificado en CEVR y macrófagos sin cambios en ambos grupos, por lo que no tendría un rol regulatorio. Concluimos que la estabilidad en los niveles de Fe y de Ferritina pulmonar indicaría que este tejido captaría eficientemente el Fe cuando la demanda es alta, a diferencia del hígado y bazo cuya depleción es evidente en deficiencia de Fe. DMT1 sería el transportador que eficientemente captaría el Fe evitando la drástica depleción en pulmón, teniendo ZIP14 un rol menos relevante. Este estudio reporta una nueva vía presente en el pulmón involucrada en la captación de Fe mediada principalmente por DMT1.

- 557. (751) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CITOGENÉTICA/ MOLECULAR Y DELECIÓN DEL DERIVADO 9 EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**
 Gutiérrez, Leandro; Abelleyro, Martín; Ferri, Cristian; De Brasi, Carlos; Larripa, Irene
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET, Academia Nacional de Medicina

La LMC se caracteriza por el cromosoma Philadelphia (Ph) producto de la t(9;22)(q34;q11) dando origen al gen quimérico *BCR-ABL1*. Un 15-30% de los casos presentan deleciones en el cromosoma derivado 9 [der(9)], las que han sido asociadas a peor pronóstico. Estas deleciones involucran al recíproco *ABL1-BCR* y se cree que ocurren simultáneamente con la t(9;22). El pobre pronóstico relacionado con estas deleciones ha sido asociado con un mecanismo de haploinsuficiencia de genes supresores de tumor. El objetivo de este trabajo fue detectar pacientes con deleciones en el der(9) y evaluar su respuesta citogenética y molecular. Se analizaron 32 casos de LMC al diagnóstico, de los cuales en 20 pudo realizarse el seguimiento a los 12 meses de iniciado el tratamiento con inhibidores de tirosina kinasas (ITKs). Se empleó el estudio citogenético, FISH doble fusión (LIVe Probes, Lexcel in Vitro) y RT-PCR de los transcritos *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR* para caracterizar deleciones sobre el der(9). Por otra parte se realizó qRT-PCR (MolecularMD One-Step qRT-PCR BCR-ABL Kit) para cuantificar el nivel de respuesta molecular en ambos grupos (delecionados vs. no delecionados) a los 12 meses de iniciado el tratamiento. El 28% (9/32) de los casos mostró deleciones sobre el der(9). En el 54,5% (5/9) de los mismos, solo se observó el clon con deleciones, mientras que en el 45,5% (4/9) restante se observó la presencia de al menos 2 clones en el mismo paciente (con y sin deleción), apoyando la idea que en un subgrupo de pacientes, éstas ocurrirían como un segundo evento, indicando evolución clonal. Sin embargo, el análisis estadístico de la respuesta citogenética a los 6 y 12 meses, así como la reducción logarítmica del número de copias del gen *BCR/ABL1* por qRT-PCR, a los 12 meses de tratamiento con ITKs no mostraron diferencias significativas. Nuestros resultados muestran que bajo tratamiento con ITKs, la presencia de deleciones sobre el der(9) no indican un peor pronóstico.

NEFROLOGÍA 1

- 558. (55) DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE NEFRONES COMO CONSECUENCIA DE LA INHIBICIÓN DE LA ENDOTELINA DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL RIÑÓN DE RATA.**
 Balonga, Sabrina Elizabeth; Ortiz, María del Carmen; Albertoni Borghese, María F.; Moreira Szokalo, Rocío; Barchuk, Magali; Schneider, Ana; Majowicz, Mónica
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Se usaron ratas Sprague-Dawley de ambos sexos recién nacidas a las que se les administró bosentan, inhibidor no selectivo de los receptores de endotelina (ET), por vía oral, desde el día 1 al día 20 de vida postnatal. Grupos experimentales: machos controles (MC), machos bosentan (MB), hembras controles (HC) y hembras bosentan (HB). Los animales se sacrificaron el día 21, y se extrajeron ambos riñones. Con el riñón derecho se realizó el recuento del número de glomérulos totales mediante un método de digestión ácida. Con el riñón izquierdo se realizaron las siguientes tinciones: hematoxilina-eosina para analizar la estructura renal y medir parámetros morfométricos renales, tricrómico de Masson, sirius red y detección inmunohistoquímica de α -actina para evaluar fibrosis. Se determinaron parámetros de función renal. Se realizó ANOVA de 2 factores y test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Resultados significativos: Número de glomérulos totales: sólo disminuyó en MB vs MC [84733±2708 vs 101499±3526]*, Número de glomérulos/mm² de corteza yuxtamedular: sólo disminuyó en MB vs MC [10,2±0,8 vs 12,9±0,8]*, Superficie de filtración renal de corteza yuxtamedular (μ m²):

disminuyó en MB vs MC [44297±3720 vs 55406±3496]* y en HB vs HC [52496±4108 vs 61697±5208]*, no se hallaron diferencias significativas en estos mismos parámetros en la corteza externa; el clearance de creatinina (ml/min/100g) no cambió significativamente y la proteinuria (mg/24hs/100g) aumentó sólo en MB vs MC [3,16±0,3 vs 1,96±0,3]*; *p<0,05, n=10. No se observaron signos de fibrosis temprana al analizar los cortes de riñón correspondientes a tricrómico de Masson, Sirius red e inmunohistoquímica para α -actina. La inhibición de ET en el período postnatal temprano altera la nefrogénesis del riñón de rata disminuyendo el número de nefrones en los machos. Este cambio junto con el aumento de la proteinuria, podría predisponer al desarrollo de hipertensión y/o enfermedad renal en la adultez.

- 559. (130) LA INTERACCIÓN ENTRE LAS TOXINAS SHIGA TIPO 2 Y SUBTILASA PODRÍA CONTRIBUIR A LA PATOGÉNESIS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE MEDIADORES PRO-INFLAMATORIOS LIBERADOS POR EL ENDOTELIO RENAL.**
 Álvarez, Romina Soledad¹; Jancic, Carolina²; Girard, Magalí Celeste¹; Albertoni, Haydée³; Ibarra, Cristina¹; Amaral, María Marta¹
Laboratorio de Fisiopatología, Instituto de Fisiología y Biofísica (IFIBIO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina.² Sección Nefrología Infantil, Servicio de Pediatría, Hospital Nacional Alejandro Posadas³

Las células epiteliales y endoteliales renales cooperan en la reabsorción de agua y solutos, secreción e inflamación. En el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se observa la destrucción del endotelio y el epitelio renal por acción de la toxina Shiga (Stx). La Subtilasa (SubAB), identificada en cepas de *E. coli* productor de Stx (STEC), también contribuiría al SUH. Previamente, demostramos que el co-tratamiento con Stx2 + SubAB, por 24, 48 y 72 hs, no tiene efectos aditivos ni sinérgicos sobre la viabilidad de células endoteliales glomerulares humanas (HGEC). En este trabajo: 1) se estudió la acción citotóxica de Stx2 (1 ng/ml) y SubAB (150 ng/ml) sobre la viabilidad del epitelio renal humano (HK-2) y de la bicapa HGEC/HK-2 medida a las 72 hs por incorporación de rojo neutro. 2) se evaluaron los efectos citotóxicos de Stx2 y/o SubAB en presencia del medio condicionado (MC) de HGEC o HK-2. 3) se identificaron, por ELISA, algunos de los mediadores solubles presentes en los MC que aumentan a las 24 hs de incubación con SubAB (1500 ng/ml) y Stx2 (10 ng/ml) como TNF- α e IL-6. El co-tratamiento (Stx2+SubAB) no mostró efectos aditivos ni sinérgicos sobre la viabilidad celular de HK-2 y de la bicapa HGEC/HK-2 (n=6, ns). En cambio, Stx2+SubAB causó una disminución de la viabilidad celular en HK-2 que fue significativamente mayor en presencia de MC de HGEC que en medio de arresto celular (45,1 ± 0,7% vs 56,2 ± 2,4%, n=4, p<0,05). Además, Stx2 y SubAB aumentaron la liberación de TNF- α e IL-6 en las HGEC. La presencia de factores del endotelio renal potenciaría el daño causado por Stx2+SubAB sobre el epitelio renal. La interacción de ambas toxinas podría tener consecuencias importantes en la patogénesis del SUH asociada a la infección con cepas de STEC productoras de Stx2 y SubAB.

- 560. (132) EXPRESIÓN RENAL Y EXCRECIÓN EN EXOSOMAS URINARIOS DEL TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS 5 (OAT5) Y DE LA PROTEÍNA CAVEOLINA 2 (CAV2) EN RATAS TRATADAS CON CISPLATINO.**
 Bulacio, Romina Paula; Torres, Adriana Mónica
Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, CONICET

Las caveolinas son proteínas integrales de membrana presentes en las caveolas, un subtipo de raft lipídico, y tienen un rol funcional en los procesos de transporte vesicular. Oat5 es un transportador de aniones orgánicos que se expresa exclusiva-

mente en riñón. Recientemente hemos hallado un aumento en la excreción urinaria de Oat5 antes de alteraciones en marcadores tradicionales en un modelo de insuficiencia renal aguda causado por cisplatino (IRA-Cis). Por este motivo, Oat5 en orina se ha propuesto como un biomarcador temprano de IRA-Cis. Caveolina 2 (Cav2), una de las principales proteínas caveolares, co-localiza y regula funcionalmente a un miembro cercano de la familia de Oat5, Oat1. Nuestro objetivo consistió en evaluar la expresión renal y la excreción en exosomas urinarios de Oat5 y Cav2 en ratas Wistar macho adultas con IRA-Cis. Grupos experimentales: tratadas 4 días antes con una dosis de cisplatino de 5 mg/kg p.c., i.p. (T, n=6); controles (C, n=16). Se recolectó: plasma para evaluar los niveles de urea (Urp) por espectrofotometría, orina de 24h para la obtención de exosomas urinarios (eu), tejido renal, y se analizó Oat5 y Cav2 en eu y en membranas apicales renales (map) por Immunoblotting. Resultados: Urp(g/L): C=0,28±0,01, T=2,94±0,24*; Oat5map(%): C=100±3, T=50±3*; Oat5eu(%): C=100±4, T=299±13*; Cav2map(%): C=100±3, T=3,40±0,05*; Cav2eu(%): C=100±12, T=303±44*. Test t-Student (*) p< 0,05. La IRA-Cis se corroboró a través del aumento observado en la Urp en las ratas T. Oat5 y Cav2 se hallaron aumentados en eu y disminuidos en map, siendo además la primera vez que ambas proteínas son detectadas en eu. El estrés oxidativo causado por el cisplatino probablemente aumente la excreción de Oat5 y Cav2 desde la map hacia la orina a través de la vía exosomal. Por ende, estos resultados preliminares sugerirían que Cav2 podría co-localizar con Oat5 y que probablemente esté involucrada en la regulación de la excreción urinaria de Oat5 en este modelo de IRA-Cis.

561. (145) EXCRECIÓN URINARIA DEL TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS 5 (OAT5) EN INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR METOTREXATO (M) EN RATAS.

Severin, María Julia; Trebucovich, María S.; Buszniesz, Patricia; Brandoni, Anabel; Torres, Adriana M. Area Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, CONICET

M es un antifolato ampliamente utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes. La nefrotoxicidad inducida por M limita su efectividad aumentando el riesgo de desarrollar toxicidades asociadas. Oat5 se expresa exclusivamente en la membrana apical del túbulo proximal renal. Nuestro laboratorio ha sido pionero en la detección de Oat5 en orina. Se ha propuesto a la excreción urinaria de Oat5 (Oat5o) como un biomarcador temprano de insuficiencia renal aguda inducida por mercurio, cisplatino e isquemia. El objetivo de este trabajo fue evaluar Oat5o en ratas Wistar macho adultas tratadas con diferentes dosis de M en comparación con parámetros tradicionales indicadores de daño renal. Grupos: controles (C, n=8), inyección única i.p. de M 40mg/kg p.c. (M40, n=4), 120mg/kg (M120, n=5), 180mg/kg (M180, n=6) y 360mg/kg (M360, n=3). A las 48h de la inyección, se evaluaron urea (U) y creatinina (Cr) en plasma. Oat5o se determinó por inmunoblotting. ANOVA plus Newman-Keuls (a) p<0,05 vs C, (b) p<0,05 vs M40, (c) p<0,05 vs M120, (d) p<0,05 vs M180, (e) p<0,05 vs M360. Resultados: Peso renal/ Peso corporal(x10⁻³): C=7,1±0,1, M40=7,4±0,2, M120=7,0±0,1^{d,e}, M180=7,7±0,2^{a,c}, M360=7,8±0,2^{a,c}, U(g/L): C=0,27±0,01, M40=0,31±0,01^e, M120=0,35±0,02^e, M180=0,44±0,07^{a,e}, M360=1,19±0,12^{a,b,c,d}, Cr(mg/L): C=5,79±0,20, M40=5,07±0,16^e, M120=5,24±0,30^e, M180=5,97±0,41^e, M360=8,17±0,88^{a,b,c,d}, Clearance Cr(mL/min/100g p.c.): C=0,59±0,03, M40=0,66±0,04^e, M120=0,62±0,03^e, M180=0,59±0,05^e, M360=0,39±0,04^{a,b,c,d}, Oat5o(%): C=100±1, M40=97±2^{c,d,e}, M120=199±10^{a,b,e}, M180=233±34^{a,b,e}, M360=767±42^{a,b,c,d}. Todos los parámetros estudiados se modificaron en M360 mientras que Oat5o fue significativamente mayor a partir de la dosis de 120mg/kg. Estos resultados revelan que Oat5o se altera a dosis de M en la cuales no se detectan modificaciones en los parámetros tradicionales. Oat5o podría postularse como un biomarcador temprano de daño renal inducido por M.

562. (277) EL α -ÁCIDO LIPOICO PROTEGE AL RIÑÓN FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL DURANTE UN PROCESO INFLAMATORIO COMO LA ENDOTOXEMIA

Vanasco, Virginia; Cimolai, María Cecilia; Marchini, Tilmoteo; Magnani, Natalia; Evelson, Pablo; Álvarez, Silvia Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET-UBA

Durante los procesos inflamatorios, es importante mantener un estado redox celular adecuado a fin de preservar la función de la mitocondria. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del α -ácido lipoico (LA) sobre el metabolismo oxidativo del riñón y la función mitocondrial de ratas tratadas con LPS (endotoxemia experimental). Se utilizaron ratas Sprague-Dawley (hembras de 45 ± 5 días) y se inyectaron i.p. con LPS 10 mg/kg. Las determinaciones se realizaron luego de las 6 h. El co-tratamiento con LA (100 mg/kg) previno: a) el incremento (20%, p<0,01) en la producción de NO mitocondrial, b) la disminución (30-40%, p<0,05) de las actividades de los complejo I y complejo IV mitocondriales, c) la disminución del potencial de membrana mitocondrial (26%, p<0,05) y d) la oxidación de las cardiolipinas (76%, 0,001). No se observaron diferencias significativas en el consumo de O₂ mitocondrial, en la actividad del complejo II y en la producción de ATP cuando el grupo LPS se comparó con el grupo LPS+LA. Este trabajo proporciona nueva evidencia de que el ácido α -lipoico protege al riñón del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial presentes en la endotoxemia. Este trabajo fue realizado con subsidios PIP, UBA y ANPCYT. Virginia Vanasco y María Cecilia Cimolai contribuyeron de igual manera a la realización del trabajo.

563. (278) LA OUABAÍNA PROTEGE A LAS CÉLULAS ENDOTELIALES Y EPITELIALES RENALES HUMANAS DEL DAÑO CAUSADO POR LA TOXINA SHIGA TIPO 2 Y LA CITOTOXINA SUBTILASA, SIN ALTERAR LA FUNCIONALIDAD DE LA BOMBA NA⁺/K⁺ ATPASA.

Girard, Magali Celeste; Álvarez, Romina Soledad; Amaral, María Marta; Ibarra, Cristina Laboratorio de Fisiopatogenia. Instituto de Fisiología y Biofísica (IFIBIO)-CONICET. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La toxina Shiga tipo 2 (Stx2) causa apoptosis del endotelio y epitelio renal en pacientes con Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Además, la Subtilasa (SubAB) también induce apoptosis de células endoteliales glomerulares humanas (HGEC), pudiendo contribuir al desarrollo del SUH. Previamente, demostramos que el pre-tratamiento con Ouabaina (OUA) 20 nM disminuye la apoptosis de Stx2 sobre las HGEC y sobre la línea de epitelio renal humano (HK-2). También protege a las HGEC de la apoptosis por SubAB. Los objetivos fueron: 1) Analizar la funcionalidad de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa en presencia de OUA 20 nM. Monocapas de HGEC o HK-2 se crecieron en un soporte permeable montado en una cámara de Ussing modificada y se midió la corriente de corto-circuito (Isc) antes y después de la incorporación de 20 nM y 3 mM de OUA. 2) Estudiar el efecto de la OUA 20 nM sobre la proliferación celular de HGEC y HK-2. Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer con Azul Tripán y se estudió el ciclo celular con Ioduro de Propidio y por citometría de flujo. 3) Evaluar si el pre-tratamiento con OUA protege a las HK-2 de la citotoxicidad de SubAB. HK-2 se pre-trataron con OUA (5-30 nM) por 24 hs y luego se incubaron con SubAB (200 ng/ml) por 48 hs y en presencia de OUA. La viabilidad se determinó por incorporación de rojo neutro. La OUA 20 nM no alteró la Isc en HGEC ni en HK-2, mientras que la concentración 3 mM la disminuyó significativamente (p< 0,05, n=3). Además, el recuento celular fue mayor (48%, p< 0,05, n=3) cuando las HK-2 se trataron con OUA 20 nM. Este resultado correlaciona con un incremento (20%) de las células proliferantes (población G2/M) OUA: vs Ctrl, n=2. Por otra parte, OUA (5-10 nM) protegió a las HK-2 de la citotoxicidad de SubAB (OUA + SubAB: 103,0 ± 3,2% vs 70,2 ± 2,1%; n=3, p<0,05). La OUA evitaría el daño

renal causado por Stx2 y SubAB por disminución de la apoptosis y aumento de la proliferación celular, sin alterar la funcionalidad de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa.

564. (580) SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y FOSFORILACIÓN DE LA BOMBA DE Na⁺, K⁺-ATPASA RENAL EN EL DESARROLLO DE HIPERTENSIÓN SAL SENSIBLE EN RATAS WISTAR ADULTAS OVARIECTOMIZADAS.

Di Ciano, Luis¹; Azurmendi, Pablo¹; Colombero, Cecilia²; Oddo, Elisabet¹; Levin, Gloria²; Arrizurieta, Elvira¹; Nowicki, Susana²; Ibarra, Fernando¹
Instituto de Investigaciones Medicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires¹ Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr. César Bergadá (CEDIE)-CONICET²

Cuando las ratas Wistar ovariectomizadas (oVx) consumen dieta hipersódica (HS), la mayor defosforilación de la subunidad α 1 de la bomba de Na⁺, K⁺-ATPasa (NKA), se acompaña de menor excreción de sodio e hipertensión arterial (*Clin Exp Hypertens* 2013). El sistema dopaminérgico renal, que ejerce sus efectos natriuréticos fosforilando la NKA, podría estar alterado en ratas oVx-HS. Se estudiaron ratas Wistar hembras intactas (HI) y oVx a los 60 días de vida, y los estudios comenzaron a los 150 días. Los animales consumieron dieta HS (NaCl 1% en agua de bebida por 5 días) o normal (NS). Se determinó presión arterial media (PAM) y excreción urinaria de sodio y dopamina (DA). Se estudio el receptor D1 (D1R) y D2 (D2R) de DA, señales intracelulares como el citocromo P450A4 (CYP4A), proteína quinasa C (PKC), AMPc y el estado de fosforilación de NKA por western blot. En ratas HI la dieta HS aumentó la excreción urinaria de DA y sodio, se fosforiló NKA y aumentó la expresión de CYP4A (p <0,02), sin cambios en la PAM. El bloqueo específico de D1R en HI-HS revirtió la fosforilación de NKA (p<0,05), disminuyó la excreción de sodio en un 50% y aumentó la PAM (p<0,05). En oVx-HS, la excreción de sodio fue menor (2,08±0,03 vs 3,14±0,03 mmol/día/100gPC, p<0,05) y la PAM mayor (135±4 vs 112±2 mmHg, p <0,05), NKA esta más defosforilada que en HI-HS (p<0,01), sin cambios en CYP4A ni en la excreción de DA. El bloqueo de D1R en oVx-HS no cambió el estado de fosforilación NKA, la excreción de sodio y la PAM. D1R fue menor en oVx-NS (p<0,05). D2R, AMPc y expresión PKC no variaron entre los grupos. La alteración del sistema de señalización de la dopamina renal producida por la ovariectomía podría ser responsable de la deficiente fosforilación de NKA, la menor excreción de sodio y el desarrollo de hipertensión sensible a la sal.

565. (648) EFECTOS DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO ATRIAL SOBRE EL TRANSPORTE TUBULAR DE DOPAMINA: ROL DE LOS TRANSPORTADORES DE CATIONES ORGÁNICOS COMO MECANISMO POTENCIADOR DE LA EXCRECIÓN RENAL DE SODIO.

Rukavina Mikusic, Natalia Lucía^{1,5}; Kouyoumdzian, Nicolás Martín^{1,5,6}; Kravetz, María Cecilia^{1,2}; Gorzalczy, Susana²; Carranza, María Andrea^{2,6}; Del Mauro, Julieta²; Trida, Verónica³; Hocht, Christian²; Gironacci, Mariela⁴; Fernández, Belisario Enrique^{1,5,6}; Choi, Marcelo Roberto^{1,5,6}
Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² Cátedra de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³ Cátedra de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴ Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)⁵ CONICET⁶

Introducción: La biodisponibilidad tubular de dopamina (DA) depende de su manejo por los transportadores de cationes orgánicos (OCTs). Se desconoce si el péptido natriurético atrial (ANP) modula el transporte tubular de DA a través de los OCTs. Objetivos: demostrar *in vivo* si la infusión de ANP potencia los efectos diuréticos y natriuréticos de la DA exógena a través de la regulación de los OCTs y su impacto sobre la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa renal. Metodología: Se utilizaron ratas macho Spra-

gue Dawley, grupos estudiados: control (C), ANP (5 µg/kg bolo + infusión a 10 µg/kg/hr), DA (100 µg/kg/hr), DA+D-22 (10 µg/kg/hr), DA+ANP, DA+ANP+D-22. Se determinó diuresis, excreción urinaria de sodio, excreción urinaria de DA, expresión de OCTs y D1-receptor en corteza renal, captación renal *in vitro* de ³H-DA y actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa. Resultados (±ESM): el ANP o DA incrementaron la diuresis y la excreción urinaria de sodio y de DA respecto a C (p<0,05), mientras que para ANP+DA estos efectos fueron mayores que ambos tratamiento por separado (p<0,05). El bloqueo de OCTs con D-22 revirtió estos efectos en el grupo DA y DA+ANP (p<0,05). La expresión proteica de OCTs y D1-R no presentó cambios significativos en el grupo ANP vs C. La captación renal de DA aumentó en presencia de ANP (9,22±0,8 vs C: 6,82±0,09*), efecto revertido por D-22 (ANP+D-22: 3,42±0,44 vs ANP: 9,22±0,8*). La infusión con ANP o DA inhibió la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa (DA: 50±7*, ANP: 46±5* vs C: 100±0). La co-infusión de ANP+DA produjo una sobre-inhibición vs ANP o DA solos (ANP+DA: 13,2±1,5 vs DA: 50±7*, ANP: 46±5*). El bloqueo con D-22 redujo esta inhibición (DA+D-22: 85±7 vs DA: 50±7*, DA+ANP+D-22: 37,4±4 vs ANP+DA: 13,2±1,5*), *p<0,05. Conclusión: el ANP aumenta la biodisponibilidad de DA en la luz tubular al estimular su transporte por los OCTs. Este efecto se traduce en una mayor excreción urinaria de DA, menor actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa y mayor natriuresis y diuresis.

566. (746) ERK1/2 PROMUEVE LA FOSFORILACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A2 EN CÉLULAS DE TÚBULO PROXIMAL RENAL

Acquiere, Andrea B^{1,2}; Gorostizaga, Alejandra B¹; Mori Sequeiros García, María M¹; Paz, Cristina¹; Méndez, Carlos F^{1,2}
Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)¹ Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²

Hemos reportado que en células de túbulo proximal, dopamina (DA) regula la actividad de ERK1/2 con la participación de PKC y de especies reactivas del oxígeno. Dado que la fosforilación de fosfolipasa A₂ (FLA₂) incrementa su actividad enzimática intrínseca, nuestro objetivo fue analizar la regulación de la actividad de FLA₂ por DA y el rol de ERK1/2 en la misma en células de la línea OK (*opossum kidney*). El análisis por RT-PCR reveló la expresión mayoritaria de la isoforma IVA de FLA₂. La determinación de la actividad de la enzima por fluorimetría indicó que DA (10⁻⁶M) promueve la activación de FLA₂ en forma dependiente del tiempo, con un máximo a los 15 min (control: 2,58±0,04; DA: 3,46±0,10 U/mg, p<0,01) y que la preincubación con los inhibidores de la activación de ERK1/2 (PD98059, 5x10⁻⁵M) o de PKC (Ro-318220, 10⁻⁸M) o con el antioxidante N-acetilcisteína (10⁻³M) anula el efecto de DA sobre la FLA₂. Estos resultados se confirmaron mediante western blot con un anticuerpo anti-fosfo-FLA₂. MKP-1 es una fosfatasa que desfosforila a ERK1/2, inactivándola. En células transfectadas para la sobreexpresión de MKP-1, se observó una reducción en el efecto de DA sobre ERK1/2 y FLA₂, confirmando el rol de ERK1/2 en la fosforilación y activación de FLA₂. Se analizó la localización subcelular de FLA₂ IVA por microscopía de epifluorescencia y confocal, registrándose un incremento en la intensidad de la señal de fosfo-FLA₂ a nivel nuclear y perinuclear. El ácido araquidónico (AA) liberado por la FLA₂ puede ser metabolizado por las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2) y 5-lipooxigenasa (5-LOX). DA incrementó la expresión de ambas proteínas en forma dependiente del tiempo, efecto evidente a los 30 min y máximo a las 2 horas. Nuestros resultados demuestran la activación de FLA₂ por DA y su translocación al núcleo por un mecanismo mediado por ERK1/2 que conduciría la liberación de AA y su metabolización por COX-2 y 5-LOX.

567. (786) ESTUDIO LONGITUDINAL DE MARCADORES INFLAMATORIOS RENALES, VASCULARES Y DE FUNCIÓN RENAL EN ESTADIOS PRECOCES DE LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE (ADPKD)

Martínez, María Florencia¹; Oddo, Elisabet Mónica¹; Palmitano, Juan²; Forcada, Pedro³; Arrizurieta, Elvira Emilia^{1,4};

Martín, Rodolfo Santiago^{1,3,4}; Fraga, Adriana Raquel^{1,4}; Azurmendi, Pablo Javier¹
Riñón Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM)-CONICET-UBA¹ Gastroenterología, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM)-CONICET-UBA² Hospital Austral³ CONICET⁴

La ADPKD muestra gran variabilidad en su progresión y su estudio podría revelar nuevas variables que expliquen su evolución. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la progresión temporal del filtrado glomerular (FG), volumen renal total (VRT) y marcadores vasculares en 18 pacientes ADPKD normotensos (26,8±1,4 años, 11 mujeres) en un seguimiento longitudinal de 7 años. Se determinó proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), (excreción urinaria de albúmina (UACR), proteínas totales (PT) en orina, FG estimado por fórmula MDRD, VRT, presión arterial sistólica (PS) y diastólica (PD) y espesor de la íntima media carotídea (IMT). Se registró el uso de medicación antihipertensiva. Durante el seguimiento MCP-1 y PT aumentaron 38±5 y 152±39%, alcanzando 292±61 ng/gCr y 135±22 mg/gCr (p<0,05 vs basal), respectivamente, sin cambios en UACR. El FG disminuyó 1,9±0,7 ml/min/1,73m²/año y el VRT aumentó 88±17 ml/año, respectivamente. Los valores de PS, PD e IMT no se modificaron. El análisis de regresión múltiple mostró que el aumento de VRT se asocia al aumento en MCP-1, PS, PD y a los niveles de UACR y PT (r=0,78, r ajustado = 0,44, p<0,03). La caída del FG dependió del aumento de VRT, PS y PT así como del tratamiento antihipertensivo (r=0,71, r ajustado=0,35, p<0,04), mientras que cambios en PD se relacionaron con aumentos en IMT (r=0,48, p<0,04). El perfil estructural y funcional renal podría ser modificado por el componente inflamatorio y de excreción de proteínas, mientras que la presión arterial y su tratamiento modificarían el FG y el compromiso vascular de la enfermedad. Los datos sugieren así, que un seguimiento estricto de dichas variables podría pronosticar mejor el ritmo de evolución de la ADPKD.

INFECTOLOGÍA, INFLAMACIÓN E INMUNOLOGÍA 2

568. (435) PRODUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN RECOMBINANTE ENTRE ANTÍGENOS DE SECRECIÓN TEMPRANA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ESAT-6 Y CFP-10: CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA EN CÉLULAS DE INDIVIDUOS INFECTADOS CON EL PATÓGENO

Rovetta, Ana Inés¹; Peña, Delfina¹; Hernández Del Pino, Rodrigo E.¹; Recalde, Gabriela María²; Tateosian, Nancy¹; Gutiérrez, Marisa³; Palmero, Domingo J.⁴; Colombo, María Isabel²; García, Verónica E.¹

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (UBA); Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN) UBA-CONICET¹ Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Mendoza.² Sección Bacteriología de la Tuberculosis, Hospital General de Agudos "Dr. E. Tornú" División Tisiología, Hospital de Infecciosas "Francisco J. Muñiz"³

ESAT-6 y CFP-10 son antígenos de secreción temprana de *M. tuberculosis* (*Mtb*), ausentes en la cepa BCG. Ambos son secretados conjuntamente como complejo 1:1 con capacidad de disminuir los niveles de ROS en macrófagos e inhibir la activación T, perjudicando el correcto funcionamiento del sistema inmune. Así, generamos una proteína de fusión (EC) ESAT-6/CFP-10, emulando el complejo que forman *in vivo*, para estudiar su inmunogenicidad y efecto sobre la autofagia en células de individuos con infección activa por *Mtb* (pacientes tuberculosos-TB) e individuos con infección latente (LTBI). La EC se construyó a partir de plásmidos conteniendo las secuencias de ambos antígenos, amplificando los segmentos y uniéndolos por PCR. Una vez clonada y purificada, se corroboró su secuencia, pureza y capacidad de inducir respuesta inmune. Utilizando células

mononucleares de sangre periférica (CMSP) de TB, LTBI y dadores sanos (DS) estimuladas con EC, evaluamos la producción de citoquinas y proliferación celular. Como resultados previos sugieren que ESAT-6 tendría una participación en la respuesta autofágica en macrófagos infectados, investigamos el efecto de EC en la inducción de autofagia en monocitos de los individuos en estudio. La estimulación de CMSP con la proteína EC, o con las proteínas recombinantes individuales ESAT-6 y/o CFP-10, indujo niveles comparables de IFN- γ por linfocitos T y proliferación celular tanto en TB como en LTBI, pero como se esperaba, no produjo respuesta en DS, corroborando su especificidad. Asimismo, el estímulo de EC conjuntamente con lisado de *Mtb* (*Mtb*-Ag), inhibió los niveles de IFN- γ frente a los producidos por *Mtb*-Ag solo (p<0,05). Además, EC indujo mayores niveles de LC3-II (proteína marcadora de autofagia) que ESAT-6 solo, pero observamos una disminución de los mismos al estimular las células con EC+*Mtb*-Ag. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren la potencialidad de la proteína de fusión EC para el estudio de los mecanismos de defensa contra *Mtb*.

569. (436) EFECTO DE DOPAMINA EN CÉLULAS MONOCITO-MACROFÁGICAS HUMANAS EN CONDICIONES INFLAMATORIAS

Parrado, Andrea C.; Salaverry, Luciana; Lombardo, Tomás; Scotto, Florencia; Blanco, Guillermo; Canellada, Andrea; Gentile, Teresa; Rey-Roldán, Estela
Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

La dopamina (DA) es una molécula inmunoregulatoria que modula las funciones de varios tipos de células, además de su rol como neurotransmisor. Se sabe que células del sistema inmune, pueden tanto captar como sintetizar dopamina, sin embargo su rol en macrófagos humanos continúa en estudio. Previamente demostramos que la dopamina aumentó la producción de la quemoquina IL-8, pero no de la citoquina IL-1 β , sin afectar la vía de transcripción de NF κ B ni la actividad de metaloproteína 9 en una línea celular monocítico-macrofágica humana THP-1. En este trabajo evaluamos el efecto de DA en ausencia y presencia de estado inflamatorio (tratamiento con LPS), sobre la producción de las citoquinas IL-6, TNF- α (ELISA), actividad de metaloproteína (MMP, zimografía), producción de óxido nítrico (ON, reactivo de Griess) y de anión superóxido (O₂⁻, citometría de flujo) en dicha línea. Las células fueron incubadas con DA (10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M) en presencia/ausencia LPS (1 mg/ml). Observamos que DA no alteró significativamente la producción de IL-6, mientras que los niveles de TNF- α tienden a aumentar. DA aumentó (10⁻⁶ M, p<0,05; 10⁻⁵ M, p<0,01) la actividad de MMP-9 estimulada con LPS en forma dosis dependiente. Los niveles de ON y anión superóxido, no fueron modificados por DA en ausencia de LPS. Los resultados preliminares indicarían que la DA podría estar implicada en la respuesta inflamatoria a través de MMP y en parte por TNF- α , sin participación de IL-6 o de especies reactivas del oxígeno. Esto contribuiría al entendimiento de DA en las funcionalidades de los macrófagos y al equilibrio entre los sistemas nervioso e inmune.

570. (457) CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES POR EL VIRUS JUNÍN

Mena, Hebe Agustina¹; Negrotto, Soledad¹; Jaquenod De Giusti, Carolina²; Schattner, Mirta¹; Gómez, Ricardo M²
Laboratorio de Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM¹ Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)- CONICET-UNLP, La Plata²

Los pacientes infectados con el arnavirus Junín (JUNV) que padecen Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) muestran altos niveles de IFN-I que correlacionan con el pronóstico, sugiriendo que el IFN-I posee un papel relevante en la patogénesis. Nuestro objetivo fue caracterizar la infección de las células dendríticas plasmacitoides (pDCs), principales responsables de los niveles

de IFN-I del huésped, por el JUNV. Las pDCs aisladas de sangre periférica humana (hpDC) fueron infectadas con la cepa atenuada (C#1) o patogénica (P) de JUNV (multiplicidad de infección=1) durante 1 h a 37°C y luego cultivadas en RPMI/SFB 10% e IL-3 (20 ng/ml), $n=3-6$, * $p<0,05$ (ANOVA). Inicialmente, demostramos la susceptibilidad de las hpDC al detectar en los cultivos infectados ARN y antígeno viral por RT-PCR e inmunofluorescencia y virus infeccioso en los sobrenadantes. Aunque la infección por JUNV no indujo ni necrosis ni apoptosis (tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina), activó e indujo la maduración de las hpDC medido por el aumento de la expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica como -ABC, HLA-DR y CD86 (C#1: $312\pm 31^*$, $780\pm 46^*$ y 145 ± 10 y P: $742\pm 41^*$, $918\pm 49^*$, $191\pm 18^*$ intensidad de fluorescencia media (IFM), citometría de flujo) vs. hpDC no infectadas (184 ± 11 , 506 ± 21 y 110 ± 12 IFM) y en la maduración como CD83 (C#1: $29\pm 3^*$ y P: $58\pm 5^*$ vs. 10 ± 2 IFM). Utilizando una línea celular modificada genéticamente para reportar niveles de IFN-I en base al número de células fluorescentes, se observó que los mismos eran significativamente mayores en los sobrenadantes de los cultivos infectados con P comparados con los de C#1 en 1-4 dpi ($n=3$, $p<0,05$ (ANOVA)). Los resultados demuestran que las hpDC son susceptibles a la infección por JUNV y podrían explicar los altos niveles de IFN I en pacientes con FHA aunque la respuesta es selectiva acorde a la cepa viral sugiriendo que estas células podrían participar en la patogénesis de la FHA.

571. (496) DESARROLLO DE TÉCNICAS DE MARCACIÓN RADIOACTIVA IN VITRO PARA DETERMINAR PERFILES PROTEÓMICOS DIFERENCIALES Y BIOMARCADORES EN FRACCIONES CITOPLÁSMICAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS CON BACTERIAS O TRATADOS CON AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO TOLL (TLRS)

Asensio, Cristian Jorge Alejandro^{1,2}; *García, Rodolfo C.*²
*Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-CONICET, UCA*¹ *International Centre for Genetic Engineering (ICGEB), Trieste, Italia*²

Es crucial encontrar biomarcadores proteicos intracelulares específicos de cada tipo de respuesta inmune innata. En macrófagos el compartimiento citoplásmico habitado por bacterias es el que sufre mayor número de alteraciones en su proteoma, vías de señalización, tráfico y arquitectura. Para encontrar dichos biomarcadores desarrollamos técnicas *in vitro* de marcación radioactiva de proteínas citoplásmicas en la línea de macrófagos humanos THP1, infectados o no con bacterias. Para ello realizamos reacciones de fosforilación y nucleotidilación en presencia de las bases apropiadas marcadas con ³²P. Los patrones marcados difieren según la reacción y base radioactiva utilizada incrementando las probabilidades de éxito. La marcación *in vitro* de fracciones aventaja la marcación metabólica por no alterar las vías de señalización y condiciones de cultivo. Las marcaciones permitieron detectar en forma cuantitativa, sensible y reproducible algunas proteínas no abundantes (dificiles de visualizar con las coloraciones Coomassie y argéntica). En las fracciones citosólica (S100), de membranas totales (P100) y de vesículas (fagosomas incluidos) encontramos perfiles proteicos marcados diferencialmente y biomarcadores debidos a infección y/o ligación de TLRs. En particular, caracterizamos un biomarcador que resulta siempre incrementado específicamente por la ligación del TLR2. Es el único existente para TLRs. Es una nueva variante postraduccional, citosólica de la chaperona HSPA5. Permite comparar y validar distintos ligandos del TLR2 (bacterianos o sintéticos) y caracterizar las consecuencias espacio-temporales de la ligación. Con nuestra técnica la sensibilidad de detección del biomarcador aumentó 20 veces respecto a la mejor coloración argéntica. Los resultados con los agonistas de TLR2 no se evidenciaron en la línea HeLa, carente de dicho receptor. Concluimos que sólo mediante esta técnica altamente sensible se caracteriza en macrófagos un biomarcador de ligación del TLR2

572. (498) INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EMPLEANDO PORFIRINAS SINTÉTICAS COMO FOTOSENSIBILIZADOR

*Martínez, María del Carmen*¹; *Mora, Jimena*²; *Álvarez, M. Gabriela*²; *Durantini, Edgardo N*²; *Fukuda, Haydeé*^{1,3}; *Lombardo, M. Elisa*^{1,3}
*Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*¹ *Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales (FCEFQYN), Universidad Nacional de Río Cuarto*² *Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET- UBA*³

La inactivación fotodinámica (IFD) puede ser una alternativa a los antibióticos y antisépticos para el tratamiento de infecciones localizadas, particularmente para aquellas causadas por organismos resistentes a agentes antimicrobianos convencionales. La IFD se fundamenta en la acumulación preferencial de un fotosensibilizador (FS) en las células microbianas y la posterior iluminación induce la actividad fotodinámica produciendo en la célula un daño letal. Las porfirinas son efectivas para combatir parasitosis (trpanosomiasis y leishmaniasis), como así también bacterias Gram positivas. En este trabajo evaluamos el efecto de una porfirina sintética, 5,10,15, 20-tetrakis[4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil] porfirina (A₄) y su forma protonada A₄⁺ como FS para inactivar *Staphylococcus aureus*. La viabilidad bacteriana se determinó por recuento de las UFC/ml en placas con agar Tripteína Soja. La iluminación se realizó con luz blanca, 0,5 mW/cm². Al trabajar en oscuridad, con 2 concentraciones fijas de porfirinas (1,95 y 2,5µM) observamos que el tiempo tratamiento a partir del cual se manifiesta el efecto inhibitorio fue 15 y 20 minutos para A₄⁺ y A₄ respectivamente. Al incubarse 30 minutos en oscuridad los valores de IC50 fueron de 6,2±0,7µM para A₄ y 1,7±0,2µM para A₄⁺. Cuando el tratamiento fue de 15 minutos en oscuridad y 15 minutos de iluminación, los valores de IC50 fueron significativamente menores, 3,7±0,4µM para A₄ y 1,2±0,2µM para A₄⁺. Para ambas porfirinas, la citotoxicidad de A₄ ensayada sobre células Vero, y evaluada con el ensayo de MTT, fue alrededor de 7 veces mayor para las células sin irradiar que para las irradiadas. Los índices de selectividad fueron de 43,5 y 5,97 ($p<0,05$) para el tratamiento sin y con iluminación respectivamente. Este estudio nos permitiría postular a la IFD con A₄ y, particularmente, A₄⁺ como FS y empleando luz blanca para el tratamiento de infecciones localizadas originadas por bacterias Gram positivas.

573. (503) POTENCIAL PROLIFERATIVO Y FIBROGÉNICO DEL SUERO DE PACIENTES CON ÚLCERA VENOSA CRÓNICA

*Crocco, Melisa Candela*¹; *Mengarelli, Roberto Hernán*²; *Kelmansky, Diana Mabel*²; *Fuchs, Alicia Graciela*¹
*Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, Universidad Abierta Interamericana*¹ *Facultad de Medicina - Grupo Interdisciplinario de Cicatrización de Heridas, Universidad Abierta Interamericana*² *Instituto de Cálculo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*³

El 10% de la población de América del norte y Europa presenta algún tipo de insuficiencia venosa y de ellos el 1,5% presentaría úlceras sin tendencia al cierre. Durante la reparación de tejido cutáneo los fibroblastos sintetizan y remodelan la matriz extracelular. En una úlcera el tejido necrótico inhibe la proliferación y migración de fibroblastos imposibilitando la cicatrización. El objetivo del estudio fue evaluar el potencial proliferativo y fibrogénico del suero de pacientes con úlcera venosa crónica (UVC). Previa firma del consentimiento informado se extrajeron por punción femoral 15ml de sangre venosa de hombres con UVC. El suero obtenido se inactivó y se esterilizó. Se evaluaron los efectos de los sueros de pacientes y del control comercial de hombres sanos (5 y 10%v/v) sobre la proliferación en cultivo de células epiteliales Vero (técnica de MTT) y sobre el contenido de colágeno (contenido de hidroxiprolina). El suero de pacientes con UVC (n=12) promovió la proliferación celular con aumentos significativos respecto del control en 70% y 40% de los casos (5% y 10% respectivamente) sin embargo, no mostró diferencias en la promoción de la síntesis de colágeno. Tanto al 5% como al 10% la promoción sérica de

la proliferación y la deposición de colágeno parecen ser independientes del tamaño de la úlcera y del pronóstico clínico. No obstante, unificando los resultados del contenido de colágeno (5% y 10%) se observa que el suero proveniente de úlceras mayores a 150cm² (n=6) incrementó la deposición respecto al suero de úlceras menores a 80cm² (n=6; p=0,09). Los resultados sugieren la existencia de factores proliferativos en el suero de pacientes con UVC. Para confirmarlo se analizará el contenido de distintos factores en el suero por el método de ELISA. La compleción de este estudio contribuirá a comprender las diferentes capacidades de reparación tisular entre los pacientes con UVC y confirmará el carácter sistémico de esta patología.

574. (514) INFECCIÓN EXPERIMENTAL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL POR EL VIRUS POLIOMA MURINO

Torres, Jordi; Navarrete Datwiller, María José; Herrera, Julián; Bullentini, Laín; Reinoso, Gabriela; Niño, Viviana; Sanjuan, Norberto
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los virus Polioma (Py) humanos JC provocan la leucoencefalopatía multifocal progresiva y no hay modelos experimentales que permitan estudiar la infección por Py del Sistema Nervioso Central (SNC). La inoculación subcutánea o intranasal de ratones con el virus Py murino no compromete al SNC. Eso puede deberse a la ausencia de receptores para el virus en el SNC o a su incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. En este trabajo se estudió la capacidad del virus para infectar el SNC luego de la inoculación intracerebral (ic) y de astrocitos de ratón cultivados in vitro. Se inocularon ratones neonatos C3H BiDa con 5 x 10⁵ ufp de la cepa de Polioma A2 o de la RA, que difieren en sólo 3 aminoácidos, uno de ellos localizado en el loop de la proteína mayor de la cápside, VP-1, que reconoce al receptor celular. Los animales fueron sacrificados a los 7 días post-infección y se practicaron necropsias completas. La presencia del Py fue detectada por inmunoperoxidasa en cortes parafinados usando un suero primario contra VP-1. Se realizaron cultivos primarios de astrocitos de embriones de ratones de 18-19 días sobre cubreobjetos de vidrio, cuya naturaleza fue confirmada por inmunofluorescencia indirecta contra la proteína GFAP. Se observó que ambas cepas de Py pueden replicar en el SNC luego de su inoculación ic, infectando neuronas, células gliales, células ependimarias y de los plexos coroideos. Sorprendentemente, Py se diseminó hacia tejidos periféricos a partir del SNC, infectando la médula renal y las glándulas salivares. Los astrocitos fueron infectados in vitro por ambas cepas de Py. Se concluye que Py puede infectar al SNC tanto in vivo cuanto in vitro y que, a partir de allí puede diseminarse a órganos periféricos, siendo la polaridad de la barrera hematoencefálica la limitante para que el virus disemine en este sentido y no en el inverso. Se propone a este sistema como un nuevo modelo experimental para estudiar la relación entre Py y el SNC.

575. (518) EFECTO SELECTIVO DE IMIQUIMOD USANDO CÉLULAS MURINAS NORMALES Y TUMORALES: POSIBLE IMPLICANCIA TERAPÉUTICA

Rocco, Rodrigo; Alegre, Nadia; Wainstok, Rosa; Gazzaniga, Silvina
Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Imiquimod (IQ) es un inmunomodulador aprobado para el tratamiento de ciertas patologías cutáneas. Sin embargo, su efecto citotóxico directo sobre diferentes fenotipos celulares es poco conocido. Previamente hemos descripto (SAIC 2013) efectos deletéreos sobre células de hemangioma murino. Para explorar si existe un efecto selectivo de IQ (0-100 µg/ml), se usaron 3 líneas murinas como modelo: H5V para hemangioma, 1G11 para endotelio normal y B16 para melanoma. Se ensayó su efecto sobre la viabilidad, la migración mediante ensayos de herida y la organización de haces de actina evidenciados mediante fluorescencia con faloidina-TRITC. Se registró una mortalidad del 50%

tras la exposición por 24 hs a concentraciones de IQ de entre 10-20 µg/ml y 20-30 µg/ml para H5V y B16, respectivamente. No obstante, 1G11 no presentó un comportamiento similar. Los ensayos de herida, tras 14 hs de tratamiento, mostraron una disminución de la migración del 54,3 ± 2% para 5 µg IQ/ml (p<0,05), concordando con cambios observados a nivel de F-actina. El 76,8 ± 2% de las células H5V tratadas mostraron una disposición de los haces consistente con células quiescentes. En B16 se observó una reducción de la migración (64,8 ± 2%; p<0,05) para 5 µg IQ/ml. Sin embargo, su citoesqueleto no presentó modificaciones, conservando el aspecto migrante. En contraposición, 1G11 no vio afectada su capacidad migratoria y mantuvo su distribución polarizada de los haces de actina. En suma, estos resultados evidencian la selectividad citotóxica de IQ sobre los diferentes fenotipos, afectando mayormente aquellas células con características tumorales. Estos ensayos dan pie a continuar los estudios en pos de ampliar el espectro de utilización terapéutica de IQ.

576. (546) PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOPROTECTORAS CELULARES Y EXTRACELULARES DE CLOSTRIDIUM CHAUVOEI POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS (FPLC).

Caliri Ortiz, María Emilia; Guerra, Rodrigo Alberto; Gómez Barroso, Arturo; Cofiñas, Teresa Inés; Villa, María Cecilia
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis

C. chauvoei es el agente causal de la mancha, enfermedad mortal que afecta principalmente al ganado. También se ha informado la capacidad de producir infección en el humano. Para el control de la mancha se emplean vacunas de formulaciones polivalentes, basadas en cultivos entero-formolados, que no siempre alcanzan un 100% de protección. En animales vacunados se registran brotes de enfermedad que pueden deberse a que no se cumplen los planes de vacunación o a la falta de estandarización de la composición y concentración de los antígenos. El objetivo de este trabajo es aportar al mejoramiento de vacunas contra la mancha, mediante la identificación de la capacidad inmunoprotectora de proteínas celulares y extracelulares inmunorreactivas de *C. chauvoei*, purificadas por técnicas cromatográficas por FPLC para lograr formulaciones antigénicas de mayor eficiencia y menor reactividad. Se realizaron cultivos de *C. chauvoei* ATCC 10092 en condiciones anaerobias, separación de las células por centrifugación y posterior precipitación fraccionada de proteínas extracelulares con 70, 60y 40% de (NH₄)₂SO₄. Las fracciones fueron dializadas, y sembradas en columna de intercambio aniónico (Resource Q) de 1ml empleando un equipo Akta Prime Plus (GE Healthcare Amersham). Las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas en SDS-PAGE. A partir de las fracciones extracelulares se purificaron las proteínas inmunorreactivas de 130 kDa y 42 kDa identificadas por MALDI TOF como piruvato flavodoxina ferredoxina oxidoreductasa y Flagelina FLiA (S) o Proteína de Germinación de Espora. A partir de la fracción celular (SC) se obtuvieron predominancia de las proteínas de 53 kDa identificada como Chaperonina GroEl y de 69 kDa, ambas inmunoreactivas. Las formulaciones correspondientes a la fracción precipitada al 70% y SC fueron las de mayor capacidad protectora (66%). Los ratones inoculados con estas formulaciones antigénicas no presentaron reactividad en el sitio de inoculación.

577. (584) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA APOPTOSIS EN GLÁNDULA MAMARIA BOVINA INFECTADA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS DURANTE LA INVOLUCIÓN ACTIVA

Andreotti, Carolina S¹; Pereyra, Elizabeth A¹; Sacco, Sofía C¹; Beccaria, Camila¹; Ortega, Hugo H^{1,3}; Calvino, Luis F^{2,3}; Dallard, Bibiana E^{1,3}
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET)-CONICET-UNL¹ Estación Experimental Agropecuaria Rafaela Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)² Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral³

Trabajos previos han demostrado mayores porcentajes de proliferación y apoptosis en glándula mamaria (GM) bovina infectada crónicamente con *S. aureus* respecto a GM sana, lo que podría explicarse como un intento de la GM para contrarrestar el daño causado por la infección crónica. El objetivo del trabajo fue evaluar y establecer diferencias en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl2, de la proteína proapoptótica Bax y del receptor Fas en GM bovina infectada crónicamente por *S. aureus* y en GM sana durante la involución activa. Se utilizaron cuartos sanos e infectados crónicos por *S. aureus* provenientes de vacas Holstein. Se obtuvieron muestras de tejido mamario a los 7, 14 y 21 días luego del último ordeño para la realización de técnicas de inmunohistoquímica. Los porcentajes de área inmunomarcada para Bcl2 se vieron afectados por la infección intramamaria (IIM) ($p < 0,001$) y por el tiempo de la involución ($p < 0,001$), observándose interacción entre ambos factores ($p = 0,01$). Los porcentajes de inmunomarcación para Bcl2 fueron mayores en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). En cuartos infectados, los mayores porcentajes de expresión de Bcl2 se observaron al día 21 de la involución ($p < 0,05$). La expresión de la proteína Bax se vio influenciada por la IIM ($p < 0,001$), observándose mayores porcentajes de inmunomarcación en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). La expresión de Fas se vio influenciada por la IIM ($p < 0,001$) y por el tiempo de la involución ($p < 0,001$), observándose interacción entre ambos factores ($p = 0,003$). Los porcentajes de inmunomarcación para Fas fueron mayores en cuartos infectados respecto a sanos en todos los periodos evaluados ($p < 0,001$). Las proteínas reguladoras de la apoptosis evaluadas se comportaron de manera diferencial en cuartos infectados con respecto a sanos lo que podría afectar el proceso de remodelación de la GM durante la involución.

578. (597) CARACTERIZACIÓN DE LA FORMACIÓN DE NETS (NEUTROPHIL EXTRACELULAR TRAPS) INDUCIDA POR LEPTOSPIRAS
 Scharrig, Emilia¹; Carestia, Agostina²; Pretre, Gabriela¹; Ferrer, María F¹; Schattner, Mirta²; Gómez, Ricardo M¹
 Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)-CONICET¹ Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM²

La leptospirosis es una zoonosis mundial reemergente causada por espiroquetas del género *Leptospira* cuya patogénesis no está aclarada. Los neutrófilos poseen un importante papel en la eliminación de patógenos mediante fagocitosis, degranulación y NETs. En este trabajo estudiamos la influencia de la concentración, la patogenicidad, la viabilidad, la movilidad de leptospirosis y el efecto de las plaquetas en la formación de NETs por polimorfonucleares (PMN) humanos, en ensayos *in vitro*. Las cepas patogénicas *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (LIC) y serovar Manilae (LIM), y la saprófita *Leptospira biflexa* serovar Patoc (PATOC) fueron capaces de inducir NETs (DNA en el sobrenadante, fluorimetría) de manera dependiente de la concentración. El máximo nivel de DNA se alcanzó con las 3 cepas a una concentración de 1×10^7 leptospirosis/ml ($0,55 \pm 0,07$; $0,38 \pm 0,05$; $0,33 \pm 0,05$ y $0,05 \pm 0,01$ ug/ml de DNA, en PMN incubados o no con LIC, LIM y PATOC respectivamente, $n=6$). Comparando LIC con PATOC, se observó que la viabilidad y la patogenicidad son factores importantes en la generación de NETs mediada por leptospirosis, ya que los niveles de DNA fueron mayores en los sobrenadantes de las bacterias vivas que en las inactivas y en los de las patogénicas respecto a las saprófitas. LICv=, $0,57 \pm 0,11$ vs LICi=, $0,41 \pm 0,10$ *; PATOCv=, $0,33 \pm 0,05$ vs PATOCi=, $0,2 \pm 0,07$ ug/ml*, * $p < 0,05$ t-test; LICv vs PATOCv**, ** $p < 0,01$ t-test). No se observaron diferencias significativas en la capacidad de formación de NETs mediada por leptospirosis (patogénicas o saprófitas) móviles o mutantes inmóviles. Mientras la estimulación de plaquetas con lipopolisacárido (LPS) potenció la formación de NETs ($0,45 \pm 0,07$; $0,83 \pm 0,05$ * $p < 0,05$; ug/ml de DNA en PMN estimulados con LPS o LPS y plaquetas), LIC no tuvo efecto. En conclusión, nuestros datos muestran que *Leptospira* induce la formación de NETs y que la vitalidad y la patogenicidad son factores importantes, no así la movilidad, ni el reconocimiento por plaquetas.

579. (605) LA INTERACCIÓN DE ESCHERICHIA COLI O157:H7 CON EL EPITELIO INTESTINAL HUMANO ESTIMULA LA PRODUCCIÓN DE LA TOXINA SHIGA

Albanese, Adriana Andrea¹; Gerhardt, Elizabeth¹; Amigo, Natalia²; Cataldi, Angel²; Zotta, Elsa¹; Ibarra, Cristina¹
 Laboratorio de Fisiopatogenia, Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO)-CONICET¹ Instituto de Biotecnología, Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA)-Castelar²

En este trabajo se evaluaron parámetros fisiológicos y morfológicos en colon humano incubado con E. coli O157: H7 cepa 125/99 (stx₂+) (125/99wt). Los fragmentos de colon se obtuvieron de cirugías realizadas en pacientes con cáncer. La mucosa se separó del resto del tejido, se lavó y montó como un diafragma en una cámara modificada de Ussing. Los compartimientos mucoso y seroso se bañaron con solución Ringer a 37°C y se burbujó con 95% O₂/5% CO₂. El flujo neto absorptivo de agua (Jw) y la corriente de cortocircuito (Isc) se registraron simultáneamente mediante un dispositivo experimental puesto a punto en el laboratorio. Cuando ambos parámetros se estabilizaron (Jw = $0,16 \pm 0,02$ µl/min.cm², Isc = $27,4 \pm 2,9$ µA/cm²), el lado mucoso del tejido se incubó con 200 µl de 125/99wt o la correspondiente mutada en stx₂ (125/99Δstx2), ambas crecidas hasta fase exponencial. Como control negativo se usó una E. coli comensal no patógena aislada de materia fecal humana. La citotoxicidad se determinó en ensayos de viabilidad de células Vero por incorporación de rojo neutro. La cepa 125/99wt pero no la 125/99Δstx2 produjo una inhibición de Jw y una selectiva destrucción de la superficie colónica a 1 h de incubación sin modificar la Isc. Estos efectos no se observaron cuando el tejido se incubó con el sobrenadante de cultivo filtrado (SN) de 125/99wt. La citotoxicidad en células Vero fue 400 veces mayor en la solución Ringer del lado mucoso luego de la exposición del tejido a 125/99wt con respecto al SN 125/99wt. La citotoxicidad corresponde a Stx2 ya que fue neutralizada por pre-incubación (1h, 37°C) con un anticuerpo monoclonal anti-Stx2. Los resultados indican que la inhibición de Jw y los daños histológicos son inducidos por Stx2 cuya producción aumenta por la interacción del epitelio intestinal con las bacterias. La identificación de los factores del huésped responsables del aumento de Stx2 puede conducir a nuevas estrategias para controlar las infecciones por E. coli O157:H7.

580. (612) EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS DENDRÍTICAS: IMPLICANCIAS EN EL DESARROLLO DE VACUNAS ANTITUMORALES

Moreno Ayala, Mariela A.¹; De Laurentiis, Andrea²; Castro, María G.³; Seilicovich, Adriana¹; Candolfi, Mariamela¹
 Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-CONICET-UBA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)-CONICET-UBA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires² Department of Neurosurgery, University of Michigan, USA³

Previamente evaluamos agonistas de receptores tipo toll (TLR) para usar como adyuvantes de vacunas de células dendríticas (CDs) en modelos murinos de cáncer de mama. La activación de CDs con un agonista de TLR9 (CpG₈₂₁) tiene un efecto antitumoral más potente que con un agonista de TLR7/8 (R848). Además, la combinación de R848 con CpG bloquea el efecto antitumoral de las vacunas. Ahora estudiamos mediante qué mecanismos R848 inhibe el efecto proinflamatorio de CpG en las CDs. Cuando evaluamos el contenido de citoquinas en el medio de las CDs observamos que CpG estimuló la producción de IL-12, efecto que fue bloqueado por R-848 [C: 34 pg/ml; CpG: 76*; R: 48; CpG+R: 55; * $p < 0,05$ vs C, ANOVA]. CpG también incrementó la producción de IL-10, pero R848 no afectó su liberación basal o inducida por CpG [C: 132 pg/ml; CpG: 509*; R: 316; CpG+R: 562*; * $p < 0,05$]. Como ambos agonistas activan NFκB, evaluamos si esta vía estaría involucrada en el efecto observado. Para ello incubamos las CDs en presencia del inhibidor de NFκB (BAY117082), el cual bloqueó la producción de IL-12 e IL-10 inducida por CpG solo o

combinado con R848 (IL-12: CpG:120; CpG+BAY:60*; CpG+R:65; CpG+R+BAY:55; IL-10: CpG:580,5; CpG+BAY:230*; CpG+R:540; CpG+R+BAY:350*; *t* de Student apareado). Estos resultados indican que NF- κ B participa en la secreción de citoquinas inducida por CpG, pero no media la inhibición del efecto proinflamatorio de CpG inducida por R848. Luego evaluamos el papel del óxido nítrico en este efecto. La inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) con NAME revirtió el efecto inhibitorio de R848 sobre la producción de IL-12 inducida CpG (CpG:78; CpG+NAME:74; CpG+R:56; CpG+R+NAME:88*). Además, el bloqueo de NOS redujo la producción de IL-10 en CDs activadas con CpG. (CpG:230; CpG+NAME:75*; CpG+R:150; CpG+R+NAME:170). Nuestros resultados sugieren que la activación de NOS inducida por TLR inhibe la activación de CDs. Es posible que la inhibición de NOS en vacunas de CDs potencie su efecto antitumoral.

581. (627) EFECTO DEL HUMO DE TABACO EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA CELULAR Y EN LA EXPRESIÓN DE FACTORES PRO-INFLAMATORIOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

Marazita, Mariela Claudia¹; Dugour, Andrea²; Marquioni Ramella, Melisa¹; Figueroa, Juan Manuel²; Suburo, Ángela¹
Facultad de Ciencias Biomédicas- Universidad Austral¹
Fundación Pablo Cassará²

La Degeneración Macular asociada con la Edad (DMAE) representa una de las principales causas de discapacidad visual irreversible en mayores de 65 años. La edad y el hábito de fumar se incluyen entre sus principales factores de riesgo. El componente inflamatorio en esta patología es esencial para su progresión. Objetivos: Estudiar la inducción de senescencia celular por un concentrado de humo de cigarrillo (CHC) y H₂O₂ en células del Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR). Evaluar la expresión diferencial de factores inflamatorios asociados a senescencia. Hipótesis: El desbalance en los niveles de ROS, inducido por CHC o H₂O₂, promueve daños en el ADN que activan el mecanismo de senescencia celular. La activación del mecanismo de senescencia celular modifica la expresión de factores inflamatorios, que podrían contribuir al estado de inflamación crónica propio de la enfermedad. Metodología: Células ARPE-19 fueron incubadas con CHC (150 mg/ml por 24 horas, Murty Pharma.) o H₂O₂ (150 mM, 90 minutos y 24 horas de cultivo en medio fresco). Se evaluaron focos de gH2AX y 8-oxo-guanina (8-oxoG) por inmunofluorescencia. Se evaluó el nivel intracelular de ROS utilizando la sonda H2DCFDA. La inducción de senescencia por CHC o H₂O₂ fue estudiada por la detección de la actividad de β -galactosidasa por tinción con X-Gal y la expresión de p21 por Western Blot. Los niveles de citoquinas fueron analizados por qPCR y ELISA. Resultados: CHC y H₂O₂ promovieron la formación de focos de gH2AX. El daño por CHC aumentó significativamente los niveles intracelulares de ROS ($p < 0,01$) y los focos de 8-oxoG ($p < 0,01$). Tanto CHC como H₂O₂ activaron el mecanismo de senescencia celular. El antioxidante N-acetilcisteína revirtió este efecto. Los cultivos senescentes aumentaron significativamente la expresión y secreción de IL6 ($p < 0,001$) e IL8 ($p < 0,0001$). Conclusiones: La inducción de senescencia celular, por CHC o H₂O₂, promueve la expresión de factores inflamatorios en células del EPR.

582 (643) PARTICIPACIÓN DE MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILOS EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL MELANOMA MURINO B16-F1

Campisano, Sabrina¹; Gazzaniga, Silvina²; Mordoh, José³; Wainstok, Rosa^{1,3}
Laboratorio de Biología Tumoral, Departamento de Química Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET-UBA,¹ Laboratorio de Biología Tumoral, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires² Fundación Instituto Leloir, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA)-CONICET³

La vacunación con células dendríticas (CD) provenientes de médula ósea, cargadas con células tumorales apoptóticas/ne-

cróticas (ApoNec) induce protección contra el melanoma murino B16F1. Nuestro propósito fue evaluar si los macrófagos y neutrófilos reclutados en el sitio de vacunación son necesarios en dicha protección. Para ello, se determinó la producción de óxido nítrico (NO) y la actividad de la enzima arginasa en los sitios de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD+/ApoNec (vacuna compuesta por CD CD11c+ retenidas en la columna de separación magnética) y CD-/ApoNec (compuesta por la fracción eluida). También se abordaron determinaciones *in vitro*, en cada una de las fracciones (CD, CD+ y CD-), antes y después del cocultivo con ApoNec. Las células presentes en los sitios de ratones inmunizados con CD-/ApoNec y CD+/ApoNec produjeron mayor cantidad de NO ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente), respecto a los animales control vacunados con CD o PBS (CD-/ApoNec vs. CD; media: 9,4 vs. 2,9), (CD-/ApoNec vs. PBS: 9,4 vs. 3,0), (CD+/ApoNec vs. CD: 10,3 vs. 2,9), (CD+/ApoNec vs. PBS: 10,3 vs. 3,0); mientras que aquellas presentes en los sitios de ratones inmunizados con CD/ApoNec produjeron NO de forma comparable a los controles. Los lisados de ratones vacunados con CD+/ApoNec produjeron urea de forma comparable a los controles, mientras que los de ratones vacunados con CD-/ApoNec y CD/ApoNec produjeron una cantidad menor ($p < 0,01$) (CD-/ApoNec vs. CD: 13,5 vs. 26,0), (CD-/ApoNec vs. PBS: 13,5 vs. 25,1), (CD/ApoNec vs. CD: 11,9 vs. 26,0), (CD/ApoNec vs. PBS: 11,9 vs. 25,1). Concluimos que un bajo reclutamiento de macrófagos M1 y neutrófilos N1 en el sitio de ratones inmunizados con CD/ApoNec no sería determinante en la protección alcanzada *in vivo*; mientras que la disminución de macrófagos M2 y neutrófilos N2 en el sitio, cumpliría un rol más importante en la inducción de protección contra el melanoma murino B16F1.

583. (694) EVOLUCIÓN CLÍNICA EN UNA COHORTE DE PACIENTES HEMOFÍLICOS CON COINFECCIÓN HIV-HCV

Aloisi, Natalia¹; Monzani, María Cecilia¹; Badano, María Noel¹; Parodi, Cecilia¹; Corti, Marcelo²; Neme, Daniela³; Primiani, Laura²; De Bracco María Marta, ¹; Baré, Patricia¹
Academia Nacional de Medicina¹ Fundación de la Hemofilia²

El aumento de complicaciones hepáticas en poblaciones infectadas con los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y de la hepatitis C (HCV) deriva en la necesidad de implementar tratamientos para la infección por HCV. Con el objetivo de evaluar la progresión clínica, se estudiaron características virológicas e inmunológicas en 66 pacientes hemofílicos expuestos por más de 30 años a ambas infecciones. Se consideraron muestras secuenciales de plasma, analizando edad, tiempo de infección, enzimas hepáticas (γ -GT, ALT, AST) cargas virales de HIV y HCV, recuento de linfocitos T-CD4+. Se estudió la distribución de polimorfismos genéticos asociados a progresión clínica (IL28b y CCR5). Se calcularon APRI, FORNS y Fib-4 como marcadores subrogantes de enfermedad hepática. El análisis estadístico se realizó con *t* de Student, Mann Whitney y Chi cuadrado. La comparación de los parámetros antes de la implementación de las terapias antirretrovirales (ART) y luego de 25-30 años de infección mostró un aumento de CD4+ (357 vs 500 céls/mm³; $p < 0,0001$) y una disminución de carga viral de HIV (4,14 vs 2,4 copias/ml; $p < 0,0001$) demostrando el control de esta infección en la mayoría de los pacientes. Al analizar los marcadores de progresión hepática en el mismo intervalo, se hallaron niveles de AST más elevados ($p < 0,0001$) y menor recuento de plaquetas (213 vs 186 x 10³/ μ l; $p = 0,013$). La distribución de los polimorfismos genéticos fue similar al de los controles sin hallar correlación con otros parámetros. Combinando APRI, FORNS y FIB-4, el 22,5% de los pacientes se hallaban en estadios de fibrosis F0-F1 (APRI < 1 + Fib4 < 1,45 + FORNS < 4,2). Solo el 7,5% mostró un APRI > 2 + FORNS > 4,2 + Fib4 > 3,45 indicando una complicación hepática avanzada. El 70% de la población presentaba valores intermedios de APRI, FORNS y Fib4 que impiden tener datos precisos del daño. Estos resultados indican la necesidad de realizar monitoreos en estos pacientes para proporcionarles los tratamientos antivirales disponibles que eviten la progresión hepática a condiciones más severas.

584. (696) ROL DE LA AUTOFAGIA EN LA REPLICACIÓN DEL VIRUS JUNÍN (JUNV)

Pérez Vidakovic, María Laura A¹; Ure, Agustín E¹; Pozner, Roberto G²; Rivadeneyra, Leonardo²; Gómez, Ricardo M¹ Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)-CONICET, Universidad Nacional de La Plata¹ Laboratorio de Trombosis Experimental, Academia Nacional de Medicina (ANM)-CONICET²

Como parte integral del sistema inmune, la autofagia participa en la detección de virus e inducción de defensas antivirales; p. ej., transfiere selectivamente ácidos nucleicos virales a endosomas para estimular la respuesta inmune del hospedador. En contraparte, los virus han desarrollado estrategias que alteran la autofagia y promueven uno o varios de los estadios de su ciclo viral. La familia Arenaviridae está compuesta por virus RNA, algunos responsables de fiebres hemorrágicas (FH) mortales en humanos. En nuestro país, el virus Junín (JUNV) provoca la FH Argentina (FHA), una enfermedad endemo-epidémica con una tasa de mortalidad de 20%. Actualmente 5 millones de individuos se consideran en riesgo de contraer FHA. Diversos estudios sugieren que los virus pueden utilizar la autofagia para promover su replicación y brotación viral. Este trabajo tiene por objetivo estudiar el rol de la autofagia como proceso celular involucrado en la replicación de JUNV. Para evaluar si la infección con JUNV induce la autofagia, se realizaron experimentos in vitro en líneas celulares A549 y Vero infectadas con JUNV (cepa atenuada candid#1 y cepa virulenta P) en presencia o ausencia de inhibidores de la autofagia. Mediante estudios de microscopía confocal se observó la colocalización de JUNV con el marcador de autofagosomas LC3 solo en células A549. La presencia de bafilomicina A1, un inhibidor de autofagia, afectó la capacidad de JUNV de infectar solo las células A549 y en consecuencia se observó una disminución de la acumulación de agregados de LC3. La inhibición de la autofagia también afectaría la replicación y brotación de JUNV, ya que se observó una disminución en el título viral cuantificado en el sobrenadante de los cultivos de células A549 infectados en presencia de bafilomicina. Nuestros resultados indicarían que JUNV utiliza la autofagia para su replicación. Sin embargo la capacidad de inducir autofagia celular sería dependiente del tipo celular en estudio.

585. (747) IMPACTO DE LOS NIVELES ELEVADOS DE GLUCEMIA EN LA MORBIMORTALIDAD DE PACIENTES SÉPTICOS

Rodríguez Boock, Jennifer¹; Incahuanaco, Liberth¹; Flores, Karen¹; Rodríguez, Milton²; Angeloro, Pablo²; Pacheco, Sandaly¹; Pacheco, Fabio J¹ Universidad Adventista del Plata¹ Sanatorio Adventista del Plata²

Los cambios inflamatorios se asocian a un estado hiperglucémico e insulinoresistencia en respuesta al estrés. La literatura relaciona estos cambios a alteraciones metabólicas que influyen en la secreción y acción de hormonas, modulando la respuesta inmune al alterar la función leucocitaria y liberación de citocinas. Por ende, es importante conocer el impacto que tienen esos cambios en un estado de respuesta inflamatoria sistémica como en la sepsis. Se tuvo como objetivo determinar los niveles de glucemia, días de internación, Asistencia Respiratoria Mecánica y los scores de SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) según el estado vital al egreso. Se incluyeron 54 pacientes con sepsis de la Unidad de Terapia Intensiva del Sanatorio Adventista del Plata, Entre Ríos. Se tomaron los datos de valores de glucemia en los días 1, 3, 5, 10 y 14 del ingreso al estudio, así como el estado vital al egreso sanatorial, días de Asistencia Respiratoria Mecánica y de internación en UTI y scores de SOFA. La mortalidad al egreso fue de 12,3% (n=7). Los valores de glucemia sérica de los pacientes que fallecieron fueron más altos que de los vivos en el mismo período. Los promedios de glucemia según el estado vital fueron estadísticamente diferentes en los días 3 (p=0,039), 5 (p=0,000) y 10 (p=0,037). Se encontró una correlación positiva débil entre los días de internación en UTI y los valores de glucemia tomados en el día 5 (r=0,349; p=0,015); y una correlación positiva

media entre los días de ARM y valores de glucemia en los días 5 (r=0,484; p=0,001) y 10 (r=0,441; p=0,009). El score de SOFA (11,57) fue más alto en los pacientes fallecidos con una diferencia estadísticamente significativa (p=0,008). Hubo relación entre glucemias superiores a 120mg/dl y una mayor morbimortalidad. Se recomienda realizar nuevos estudios que valoren la glucemia con el objetivo de controlar alteraciones en el metabolismo de la glucosa como tratamiento adyuvante de la sepsis.

586. (753) REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR POR ALFA-1-ANTITRIPSINA EN EL DESARROLLO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Ortiz, Gustavo; Salica, Juan Pablo; Gallo, Juan Eduardo Universidad Austral

La retinopatía diabética (RD) es la causa más frecuente de ceguera en la población en edad laboral e involucra procesos inflamatorios. Las herramientas clásicas de que dispone el oftalmólogo para limitar la reacción inflamatoria están circunscriptas a anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) y corticoides, cuya aplicación prolongada genera efectos locales y sistémicos indeseables. En este trabajo, se busca evaluar el efecto sobre la RD de la alfa-1-antitripsina (AAT), un anti-inflamatorio endógeno. Al segundo día de vida postnatal, ratas Wistar recibieron una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). Aquellos animales que luego de 2 días de la aplicación de STZ presentaron glucemias mayores a 200 mg/dl fueron clasificados como diabéticos. En el grupo experimental, se aplicó una inyección intravítrea de AAT (Prolastin C; volumen final: 2µl). En los mismos animales, se aplicó buffer intravítreo en el ojo contralateral. Mediante western-blot e inmunofluorescencia, se analizó la expresión de NFκB, MMP-9 y MMP-12 en muestras de retina. Animales no diabéticos que recibieron tratamiento se utilizaron como control. Los animales fueron sacrificados a la semana 26. No se observaron diferencias significativas en la expresión de NFκB p50 y p100 entre las diversas condiciones experimentales. Las retinas de ojos diabéticos tratados con AAT presentaron una actividad gelatinasa menor de MMP-9 y una expresión mayor de MMP-12 respecto a las retinas de ojos diabéticos tratados con buffer. Asimismo, las retinas de animales no diabéticos presentaron niveles significativamente más bajos de MMP-12 y MMP-9 que aquellos encontrados en animales diabéticos tratados con AAT. Resultados de nuestro estudio sugieren que la expresión de la MMP-9 y MMP-12 estarían reguladas por AAT, siendo esto de importancia para la remodelación de la matriz extracelular, hecho presente en el desarrollo de la retinopatía diabética. Conocer los mecanismos que regulan este proceso nos permitirá identificar nuevos blancos terapéuticos y desarrollar drogas que reduzcan el proceso inflamatorio causa del edema macular asociado a la retinopatía diabética.

587. (834) IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI TOF DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS DE CLOSTRIDIUM SEPTICUM PARCIALMENTE PURIFICADAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA RÁPIDA DE PROTEÍNAS (FPLC).

Guerra, Rodrigo Alberto; Caliri Ortiz, María Emilia; Gómez Barroso, Arturo; Cortiñas, Teresa Inés; Villa, María Cecilia Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de 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. El objetivo de este trabajo fue identificar proteínas antigénicas con posible capacidad inmunoprotectora a partir de fracciones celulares y extracelulares de *C. septicum*, purificadas mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). La purificación e identificación de proteínas antigénicas con capacidad inmunoprotectora de *C. septicum*, contribuirá a la

formulación de vacunas contra el edema maligno más protectoras y menos reactivas. 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 70, 60 y 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Luego se dializaron y sembraron en columna de intercambio aniónico (Resource Q) de 1ml y/o columna de exclusión molecular Sephacryl S-300, empleando un equipo Akta Prime Plus (GE Healthcare Amersham). Las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en SDS-PAGE. Se lograron purificar por FPLC e identificar por MALDI TOF entre otras, las proteínas: Proteína de superficie probable hemaglutinina/ adhesina (FHA) (150 kDa), Proteína conservada de *C. tetani* E 88 (135 kDa), Protóxina de la toxina alfa de *C. septicum* (46 kDa), Fructosa bifosfato aldolasa (Fba 1p) (31 kDa). Se observó una respuesta de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con diferentes combinaciones antigénicas, principalmente hacia las proteínas de alto peso molecular identificadas.

CARDIOVASCULAR 2

588. (371) EL SISTEMA DE TIORREDOXINA-1 PARTICIPA DEL MECANISMO DE PROTECCIÓN DEL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Pérez, Virginia¹; Mazo, Tamara¹; Gómez, Anabella¹; Cicale, Eliana²; Casanova, Verónica²; D'Annunzio, Verónica²; Gelpi, Ricardo J.¹

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular¹ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular - Subsección Facultad de Veterinaria, Universidad de Buenos Aires²

La tiorredoxina-1 (Trx1) es parte de un sistema antioxidante que mantiene la homeostasis redox en la célula. Dado el rol importante que tiene el estrés oxidativo en la injuria por isquemia/reperusión (I/R), y particularmente en el poscondicionamiento isquémico (PI), el objetivo de este trabajo es estudiar si la Trx1 participa en el mecanismo de protección del PI. Materiales y métodos: Se utilizaron ratones FVB (Wt), transgénicos dominantes negativos con la actividad casi nula de Trx1 (DN); y ratones con sobreexpresión cardiaca de Trx1 (Trx1). Se realizaron 30min de isquemia (I) y 120min de reperusión (R) mediante la técnica de Langendorff (grupo I/R). En el grupo PI, luego de la isquemia se realizó un protocolo de 6 ciclos de R/I de una duración de 10seg cada uno. Se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), la presión diastólica final del VI (PDFVI) y el tamaño de infarto (trifeniltetrazolio). Resultados: El tamaño de infarto en el grupo Wt-PI disminuyó con respecto a los Wt-I/R ($40,0 \pm 1,9$ vs $54,6 \pm 2,4$ $p < 0,05$), pero esta protección se abolió en el grupo DN-PI ($47,7 \pm 1,1$ vs $54,3 \pm 3,9$). El grupo con sobreexpresión de Trx1-I/R logró mimetizar la protección del PI con un valor de $31,1 \pm 2,7\%$ ($p < 0,05$ vs Wt-I/R). Por otro lado, la PDVI disminuyó luego de la I/R sin cambios entre los distintos grupos, mientras que la PDFVI se incrementó luego de la I/R, y tampoco se evidenciaron cambios significativos entre los grupos. Conclusión: Nuestros datos sugieren que la disminución de la actividad de la Trx1 abole la protección del PI, y que por el contrario su sobreexpresión mimetiza el efecto protector del PI frente al tamaño de infarto. A partir de estos resultados preliminares, es posible sugerir que la Trx1 se encuentra involucrada, al menos en parte, en el mecanismo de protección del PI.

589. (388) IMPLICANCIAS DEL SISTEMA ENDOTELINÉRGICO ENDÓGENO CENTRAL EN LA HIPERTENSIÓN DOCA-SAL. EFECTOS SOBRE PARÁMETROS CARDIOVASCULARES Y LA TIROSINA HIDROXILASA HIPOTALÁMICA

Guil, María Julia¹; Morales, Vanina Paola¹; Cassinotti, Luis Roberto¹; Balabasquer, Lucía¹; Bianciotti, Liliana Graciela²; Vatta, Marcelo Sergio¹

Cátedra de Fisiología, Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Cátedra de Fisiopatología, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET,

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²

Previamente demostramos que tanto la actividad como los niveles totales y fosforilados de la tirosina hidroxilasa (TH) estaban incrementados en una región simpatoexcitatoria como el hipotálamo posterior (HP) de animales hipertensos DOCA-Sal. En experimentos realizados ex vivo, observamos que el tratamiento de dicha área con endotelinas (ETs) inducía aumentos en la transmisión noradrenérgica en las ratas hipertensas. En función de estos antecedentes planteamos evaluar la interacción entre sistema endotelinérgico endógeno central y el sistema catecolaminérgico en el HP de ratas hipertensas DOCA-Sal y el impacto en la fisiología cardiovascular. Con el objeto de responder este interrogante se evaluó la implicancia del receptor de ETs tipo A (ETA) administrando vía intracerebroventricular (icv) un antagonista específico del mismo (BQ-610, 20 $\mu\text{M}/1\mu\text{l}/\text{min}$). Se determinó la presión arterial (PA) y la frecuencia cardíaca (FC) durante una hora post-inyección. Posteriormente se sacrificó a los animales y se extrajo el HP. La administración icv del antagonista produjo una disminución en los niveles de la PA, respuesta observada principalmente sobre la presión sistólica y FC de animales hipertensos (30 mmHg y 47 bpm, respectivamente). Los niveles totales y fosforilados (THP) de la TH determinados por Western Blot fueron significativamente mayores en animales DOCA-Sal vs controles ($p < 0,05$). La administración aguda del antagonista redujo las cantidades de THP en serina 19, 31 y 40 a valores que no difieren de los hallados en ratas normotensas. Sin embargo no se observaron diferencias en los niveles de TH total determinados. Los resultados indican que el sistema endotelinérgico endógeno estaría involucrado en este modelo de hipertensión arterial. Así mismo podemos concluir que la estimulación del receptor ETA es necesaria para sostener la actividad de la TH en el HP y que esto podría relacionarse con la descarga simpática incrementada característica del modelo DOCA-Sal.

590. (437) EFECTO DE LA MODULACIÓN β -ADRENÉRGICA DE LA CONTRACTILIDAD CARDIACA POR EL ÓXIDO NÍTRICO ENDÓGENO SOBRE LA CARDIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR LA HIPOXIA CRÓNICA

La Padula, Pablo; Etchegoyen, Melisa; Bonazzola, Patricia; Costa, Lidia E.

Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Prof. Dr. Alberto C. Taquini", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

En estudios previos mostramos que el óxido nítrico (NO) endógeno participa en el mecanismo de cardioprotección que se desarrolla durante la aclimatización de ratas a la hipoxia hipobárica. En el presente trabajo se evaluó el rol de la respuesta β -adrenérgica y su modulación por NO en la cardioprotección por aclimatización a la altura. Los experimentos se realizaron en músculos papilares aislados de ventrículo izquierdo de ratas sometidas a 58,7 kPa en una cámara de hipopresión durante 8 meses (HH) y en sus respectivos controles a 101,3 kPa (C). Ambos músculos papilares de cada rata se estudiaron paralelamente, uno suplementado con el sustrato de la NO sintasa (NOS) L-arginina (Arg) 2 mM, para obtener la máxima producción fisiológica de NO, y el otro en presencia del inhibidor N-omega-nitro-L-arginina (NNA) 2 mM, para bloquear la generación de NO. Se determinó secuencialmente, en condiciones isométricas, la tensión desarrollada basal (TDb), la respuesta a isoproterenol 10^{-4} M (ISO), y la sensibilidad a 60 min de hipoxia y 30 min de reoxigenación (H/R). Los resultados se expresan como media \pm SE en % de TDb, la cual fue similar en ambos grupos. La respuesta al ISO con máximo NO fue mayor en HH (168 ± 6) que en C (129 ± 5), $p < 0,001$; no se modificó al bloquear la NOS en C, en tanto que en HH fue superior con Arg que con NNA (147 ± 7), $p < 0,05$. La recuperación de la actividad contráctil post H/R fue superior en HH con Arg (74 ± 8) que en C (51 ± 4) y que en ambos grupos con NNA (H: 53 ± 2 ; C: 52 ± 3), $p < 0,01$. Se concluye que la respuesta β -adrenérgica puede ser estimulada por NO endógeno en animales aclimatizados a la altura, y esta modulación participa en el mecanismo de cardioprotección, el cual se anula al bloquear la producción de NO.

591. (452) EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE PACIENTES CHAGÁSICOS CON PERSISTENCIA DE *T. CRUZI*

Blasco, Romina Laura¹; Miler, Noemí¹; Velázquez, Daniela¹; Sembaj, Adela²; Tobares, Sandra²; Lo Presti, Silvina¹; Bazán, Carolina¹; Strauss, Mariana¹; Baez, Alejandra¹; Rivarola, Walter¹; Paglini, Patricia¹

*Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional Córdoba*¹ *Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular*² *Servicio de Cardiología de Clínica Sucre*³

Se propusieron diferentes hipótesis para explicar la patogenia de la miocardiopatía chagásica. Actualmente se considera a la enfermedad como producto de la interacción entre el genoma del parásito y del humano. Sin embargo ninguna hipótesis explica por qué el 30% de los infectados evoluciona hacia una enfermedad cardíaca y el 70% permanece asintomático, como tampoco la amplia variabilidad clínica. En el presente trabajo se estudiaron 48 pacientes con serología positiva para Chagas (HAI, ELISA y TIF), edad 61,39± 2,35, para determinar mediante PCR (en una única toma de sangre), si el *T. cruzi* persiste en circulación en estos pacientes y establecer una posible asociación entre los polimorfismos A572D y H568D del gen de la subunidad alfa del canal de sodio voltaje dependiente tipo V (SCN5A) con parámetros clínicos y del ECG, a fin de detectar variantes genéticas que contribuyan a identificar en forma temprana alteraciones electrocardiográficas. Se realizó examen clínico, ECG y ecocardiograma. De los 48 pacientes el 23% la PCR fue negativa y en el 77% positiva. Los síntomas más frecuentes de los pacientes PCR (+) fueron disnea, 40% palpitaciones y 21% angor. Las alteraciones en el ECG y ecocardiograma fueron: CAI 36%, bradicardia sinusal 23%, BRD 16,6%, HAI e hipertrofia de ventrículo izquierdo 10%, disfunción diastólica 50% y deterioro de la fracción de eyección en un 15%. Al 22% de los pacientes PCR (+) se les analizaron los polimorfismos propuestos, encontrando que existiría una tendencia en los portadores del genotipo homocigota (AA) del polimorfismo A572D a presentar disnea y angor, mientras que en heterocigotos arritmias y palpitaciones. El genotipo heterocigota fue el más frecuente para el polimorfismo H558R, necesitando mayor cantidad de implantes de marcapasos y revelando las palpitaciones como síntoma predominante. No se encontraron diferencias dentro de los polimorfismos en cuanto a los parámetros electrocardiográficos y ecocardiográficos.

592. (487) POLIMORFISMOS L55M Y Q192R EN EL GEN DE LA PARAOXONASA1 (PON1) Y RIESGO CARDIOVASCULAR. DIFERENCIAS DE GÉNERO.

Riviere, Stephanie¹; Gariglio, Luis O²; Porcile, Rafael²; Fuchs, Alicia G¹; Potenzoni, Miguel A²; Fridman, Osvaldo^{1,3} *Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, Universidad Abierta Interamericana (UAI)*¹ *Hospital Universitario. Universidad Abierta Interamericana*² *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)*³

Introducción: Paraoxonasa, enzima asociada a la HDL, previene la oxidación de la LDL. Existen dos polimorfismos en la región codificante del gen PON1 en las posiciones Gln192Arg (Q192R) y Leu55Met (L55M). La variante 192R se asoció con aumento de riesgo de enfermedad coronaria en caucásicos. Objetivos: Investigamos la contribución de estas variantes genéticas de la PON1 sobre sus actividades de paraoxonasa y arilesterasa y sobre el perfil lipídico de sujetos con un evento cardiovascular (casos) y en controles. Métodos: Examinamos 172 controles y 104 casos. Los polimorfismos L55M y Q192R fueron genotipificados por PCR-RFLP en ADN de sangre entera. Determinaciones bioquímicas por autoanalizador Metrolab 2300. Criterio de exclusión: Embarazo, consumo de complejos multivitamínicos y menores de 18 años. Se obtuvo consentimiento informado. Protocolo aprobado por comité de ética del Hospital Universitario. Resultados: El alelo 55M de la PON1 disminuye su actividad de paraoxonasa y el 192R la aumenta (p=0,001), sin diferencias entre controles vs casos y varones vs

mujeres. El alelo 55M muestra menor actividad de arilesterasa sólo en varones (p<0,001). En varones con alelo 192R, casos tuvieron menor actividad de arilesterasa que controles (p=0,0084) pero en mujeres, caso disminuyó con 55M (p=0,0098). En varones casos con los alelos 55M o 192R, colesterol total fue más elevado que en controles (p=0,041 y p=0,014 respectivamente) y menor en mujeres caso con el alelo 192R (p=0,0004) que en controles. HDL fue menor en mujeres caso con los alelos 55M o 192R que en los controles con esos mismos alelos (p=0,0031 y p=0,003 respectivamente). LDL fue menor en mujeres caso con el alelo 192R que en los controles con ese mismo alelo (p=0,0017). Conclusiones: Observamos diferencias de género frente a la presencia de los polimorfismos de la PON1 tanto en su actividad de arilesterasa como en el perfil lipídico.

593. (495) EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD DE PRESIÓN ARTERIAL: RELACIÓN CON PARÁMETROS DE DISFUNCIÓN BARORREFLEJA EN EXAMEN CLÍNICO Y ELECTROCARDIOGRÁFICO

Rodeles, Luz María^{1,2}; Vicco, Miguel Hernan^{1,2}; Dorigo, Catalina Inés^{1,2}; Pampinella, Agustina¹; López, Victoria¹; Pessolani, María Florencia¹; Benitez, Agustina¹; Salva, María Lucrecia¹; Musacchio, Héctor Mario^{1,2}

*Hospital J. B. Iturraspe*¹ *Cátedra de Clínica Médica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral*²

Introducción: El barorreflejo (BR) es el principal mecanismo de ajuste de presión arterial (PA) a corto plazo, por lo cual su alteración puede producir cambios bruscos que se relacionan a mayor morbimortalidad cardiovascular. La variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) y de PA se evalúa por Holter y MAPA, poco disponibles en la práctica clínica hospitalaria. Objetivos: Evaluar la correlación de parámetros clínicos y registros ECG breves con los obtenidos por Holter y MAPA en la valoración de disfunción BR para identificar si estos pacientes presentan mayor variabilidad de PA. Métodos: Observacional. Inclusión: >18 años. Exclusión: condiciones/drogas que modifiquen PA y/o FC. Al ingreso, 3 mediciones de PA y DII de 10". Sensibilidad BR por maniobra de Valsalva (MV) estandarizada. Se realizaron MAPA y Holter. Resultados: 53 personas con edad de 47 ±13,78 años, de los cuales 50,9% (n=27) fueron hombres. 28 no tenían comorbilidades, 7 fueron hipertensos, 10 diabéticos y 8 presentaron ambas patologías. El 56,6% presentó alteración del BR por MV. Se observó menor VFC en el grupo con hipofunción BR por SDNN Holter (p=0,01). Hubo correlación moderada entre los valores de SDNN Holter y ECG de 10" (r=0,58) así como entre rMSSD por ambos métodos (r=0,51). 3 variables resultaron capaces de explicar el 45% de la variación del SDNN del Holter: edad, FC post/pre MV y TAD al 1° min post MV/5° min. No hubo correlación entre las mediciones manuales con las de MAPA. Los pacientes con hipofunción por MV tuvieron mayor media de PAS por MAPA (p=0,006), no hallándose diferencias en DS. Utilizando LF/HF, el grupo con ratio >2 presentó mayor número de elevaciones mayores a 2 DS de PAS (p=0,04). Conclusión: Desde el consultorio podrían evaluarse SDNN, rMSSD de ECG 10" y 3 variables clínicas para estimar VFC de Holter. El aumento de LF/HF podría vincularse a mayor variabilidad por hiperactividad simpática, alteración que se relaciona a disfunción BR.

594. (497) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA (CMMO) QUE SOBREEXPRESAN HIF-1-ALFA MUTADO SOBRE EL TAMAÑO DE INFARTO Y LA FUNCIÓN VENTRICULAR EN UN MODELO OVINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO (IAM)

Hnatiuk, Anna P¹; Ong, Sang G²; De Lorenzi, Andrea²; Cerdá, Miguel²; Trejo, Leonardo²; Olea, Daniela¹; Locatelli, Paola¹; Laguens, Rubén¹; Wu, Joseph³; Crottogini, Alberto¹

*Universidad Favaloro*¹ *Hospital Universitario Fundación Favaloro*² *Stanford Cardiovascular Institute, Universidad de Stanford*³

Introducción. La magnitud del remodelamiento ventricular post-IAM y, por ende, la severidad de la insuficiencia cardíaca resultante, dependen del tamaño inicial del área necrótica. Por otro lado, el HIF1-alfa es un factor de transcripción de proteínas vasculogénicas como eritropoyetina (EPO), angiopoyetina1 (ANGP1), factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Hipotetizamos que la inyección de CMMO modificadas para sobreexpresar un HIF-1-alfa mutado (para no ser degradado en normoxia) reduciría el tamaño de infarto y mejoraría la función ventricular (VI) en un modelo ovino de IAM. **Métodos.** Ovejas con ligadura coronaria recibieron en la zona peri-IAM CMMO transfectadas con un plásmido minicircular codificante para HIF-1-alfa mutado humano (Grupo CMMO-mHIF, n=4), CMMO no transfectadas (Grupo CMMO, n=4), o PBS (Grupo Placebo, n=4). Un día y 30 días post-IAM se realizó resonancia magnética nuclear para medir tamaño de infarto y fracción de eyección ventricular (FEy). Además, en la zona peri-IAM de CMMO-mHIF y CMMO se cuantificó expresión (RT-qPCR) de EPO, ANGP1, VEGF e iNOS a los 7 días post-tratamiento (ovejas adicionales). **Resultados.** El tamaño de infarto se redujo $50,7 \pm 8,2\%$ en CMMO-mHIF (de $9,9 \pm 0,5$ a $4,9 \pm 0,6$ ml $p < 0,01$, $X \pm DS$, t-test), $8,6 \pm 5,9\%$ en CMMO (de $11,4 \pm 1,8$ a $10,5 \pm 2$ ml $p = NS$) y $9,7 \pm 4,6\%$ en Placebo (de $9,3 \pm 0,3$ a $8,4 \pm 0,7$ ml, $p = NS$). La FEy aumentó $40,2 \pm 17,8\%$ en CMMO-mHIF ($p < 0,05$), $28,43 \pm 11,21\%$ en CMMO ($p = NS$) y $5,84 \pm 12,04\%$ en Placebo ($p = NS$). La expresión de mHIF, EPO, ANGP1 e iNOS fue positiva sólo en CMMO-mHIF, siendo significativa ($p < 0,001$) para iNOS, EPO y ANGP1. La expresión de VEGF fue positiva en CMMO y CMMO-mHIF siendo significativa ($p < 0,001$) sólo en CMMO-mHIF. **Conclusión.** En ovejas con IAM, las CMMO que sobreexpresan un HIF1-alfa mutante que no se degrada en normoxia reduce el tamaño de IAM y mejora la función VI, probablemente por expresión de factores de crecimiento proliferativos transcritos por mHIF.

595. (553) INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE TRH CARDIACA EN UN MODELO DE HIPERTROFIA CARDIACA "ADAPTATIVA" POR NATACIÓN FORZADA

Peres Díaz, Ludmila¹; Landa, María S¹; Schuman, Mariano L¹; Álvarez, Azucena L¹; Toblli, Jorge E²; Pirola, Carlos J¹; García, Silvia I¹
Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; IDIM-CONICET¹ Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán²

La TRH cardíaca participa en el desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC) (Schuman et al 2011). Nos planteamos si la TRH participa de la HC fisiológica o adaptativa en respuesta al ejercicio (corazón del atleta). Contrapuesta a la HC patológica con fibrosis, apoptosis, hipertrofia del miocito y disfunción cardíaca, la HC fisiológica es reversible, y posee una morfología normal con presencia de función cardíaca aumentada. Desarrollamos un modelo de ejercicio. Utilizamos 3 grupos de ratones C57: Control seco (C), Control sumergido (CS) y Nadador (N), éste, sometidos a un protocolo de ejercicio riguroso, dividido en etapa de adaptación y entrenamiento. Adaptación: (10 d) sometidos a nado durante 10 min en cada sesión (mañana/ tarde, separadas por 4 h), incrementando de a 10 min por día por sesión, hasta llegar a 90 min por sesión. Entrenamiento: (20 d) sometidos a nado durante 90 min en dos sesiones diarias, separadas por 4 hs. Los CS fueron sumergidos por 60 seg todas las sesiones para evaluar estrés. Los C sólo estuvieron en el mismo ambiente, sin ejercicio. Los animales fueron pesados, sacrificados y se extrajo el corazón para medir los niveles de BNP, BMHC (marcadores de hipertrofia), colágeno III y I (indicadores de fibrosis), y TRH por RT-PCR-tr. 3 ratones de c/grupo se derivaron para estudios de inmunohistoquímica. Los animales N disminuyeron su peso corporal (g) (N: $38 \pm 1,2$ vs CS: $42,5 \pm 1$ $p \leq 0,05$) y presentaron un índice hipertrófico (peso corazón/long tibia) aumentado vs CS ($p \leq 0,05$). A favor del modelo de hipertrofia "no patológica", observamos niveles similares en la expresión de BNP, BMHC y colágeno III entre N vs CS ($p = NS$), aún así en este modelo, observamos un aumento significativo de la expresión de TRH y su receptor tipo I en el ventrículo izquierdo

($p \leq 0,02$) en los ratones N vs CS. El aumento de la expresión del tripeptido y su receptor plantea la posible participación del mismo en la hipertrofia adaptativa de roedores.

596. (561) PARTICIPACIÓN DE ACUAPORINA-1 EN LA MIGRACIÓN ENDOTELIAL INDUCIDA POR ERITROPOYETINA

Maltanerí, Romina Eugenia; Chamorro, María Eugenia; González, Guadalupe; Nesse, Alcira; Vittori, Daniela
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET

Actualmente se reconoce a la eritropoyetina (Epo) como una citoquina pleiotrópica y se ha demostrado su acción proangiogénica, estimulando la proliferación y la migración de células endoteliales. En ensayos previos confirmamos la acción promigratoria de Epo sobre cultivos primarios de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Con el fin de dilucidar los mecanismos responsables de dicho efecto, estudiamos el rol de acuaporina-1 (AQP-1) -proteína con función de canal de agua, relevante en la migración celular- y posibles cambios en su expresión o actividad debidos al tratamiento con Epo. Empleando como modelo experimental la línea celular EA.hy926 (derivada de HUVEC), evaluamos migración endotelial (*scratching*). El tratamiento con el inhibidor de acuaporinas $HgCl_2$ (5-20 μM ; 5 h) impidió el cierre de la herida en forma dependiente de la concentración, sin afectar la viabilidad celular (MTT). Al igual que en HUVEC, el tratamiento con Epo (200 ng/mL; 15 h) disminuyó significativamente el tamaño de la herida con respecto al control (valores relativizados a tiempo inicial; Epo: $53 \pm 2,9\%$ vs. Control: $76 \pm 2,1\%$; $p < 0,05$; $n = 4$). Este efecto promigratorio fue paralelo a un aumento ($23 \pm 8,3\%$) en la expresión de AQP-1 inducida por Epo a 48 h (citometría de flujo; Epo vs. Control, $p < 0,05$; $n = 3$). Ensayos de competencia con GM-CSF sugieren que el efecto de Epo es mediado por un receptor distinto del EpoR homodímero. Por otra parte, dado que el derivado carbamilo de Epo (cEpo), no eritropoyético, presenta capacidad citoprotectora en tejidos no hematopoyéticos, fue interesante evaluar su posible actividad promigratoria en endotelio. En presencia de cEpo la migración celular fue menor que con Epo y no fue afectada significativamente la expresión de AQP-1. Los resultados resaltan la importancia de AQP-1 en la migración endotelial, y aportan nueva información sobre la regulación de este canal de agua, así como también sobre los mecanismos de acción de Epo en el endotelio.

597. (671) PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA VÍA NEURAL DE PROTECCIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO REMOTO.

Goyeneche, María A.; Donato, Martín; Buchholz, Bruno; Garmendia, Cristian; Rodríguez, Manuel; Gelpi, Ricardo J.
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El Precondicionamiento Isquémico Remoto (PCr) es un fenómeno de cardioprotección por el cual, breves episodios de isquemia-reperusión realizados en tejidos u órganos alejados al corazón, reducen el tamaño del infarto producto de un episodio de isquemia miocárdica prolongada. El mecanismo a partir del cual se ejerce esta protección no ha sido completamente dilucidado. El objetivo del presente estudio fue determinar la participación del nervio vago, los receptores muscarínicos y el óxido nítrico como parte de la vía eferente de protección del PCr. Se utilizaron ratas, las cuales fueron divididas en un grupo control (Grupo 1, $n = 8$), cuyos corazones fueron extraídos del animal, perfundidos según la técnica de Langendorff y sometidos a 30 minutos de isquemia global seguido de 120 minutos de reperusión. En el grupo 2 ($n = 9$) se repitió el protocolo anterior, pero previo a la isquemia miocárdica, se realizó un protocolo de PCr que consistió en 3 ciclos de isquemia/reperusión de la arteria femoral derecha. El mismo protocolo se realizó en el grupo 3 ($n = 7$) donde previo al estímulo preconditionante se realizó una vagotomía bilateral. En los grupos 4 ($n = 6$) y 5 ($n = 8$), se repitió el protocolo del grupo 2

pero las ratas fueron tratadas, durante todo el protocolo de PCR, con atropina (3mg/Kg) y L-NAME (100µM), respectivamente. Se midió el tamaño del infarto utilizando trifeníl tetrazolium. Un episodio de isquemia miocárdica de 30 minutos provocó un infarto de 49,56±4,54. El PCR disminuyó el tamaño del infarto a un 30,66±2,89 (p<0,05). La vagotomía bilateral abolió el efecto protector del PCR sobre el tamaño del infarto (53,26±4,29%). El mismo efecto se observó en los grupos tratados con atropina (46,10±4,99%) y L-NAME (45,36±3,26%). En conclusión, el PCR reduce el tamaño del infarto utilizando una vía eferente vagal colinérgica y un mecanismo que involucra al sistema del óxido nítrico.

598. (698) LA ESTIMULACIÓN VAGAL REALIZADA ANTES DE LA ISQUEMIA O EN LA REPERFUSIÓN REDUCE EL TAMAÑO DE INFARTO DE MIOCARDIO EN EL RATÓN

Kelly, Jazmín¹; Buchholz, Bruno¹; Méndez Diodati, Nahuel¹; Casanova, Verónica²; Gullace, Federico²; Cicale, Eliana²; Gelpi, Ricardo J¹
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires¹ Bioterio Central, Facultad de Veterinaria. Universidad de Buenos Aires²

La estimulación vagal (EV) ha demostrado tener efectos benéficos en la injuria por isquemia y reperusión miocárdica; siendo menos conocidos los efectos y mecanismos de protección cuando se la aplica antes de la isquemia o al inicio de la reperusión. El objetivo fue estudiar si la EV en la reperusión reduce el tamaño de infarto de manera similar a la EV pre-isquémica y si en ambas la protección es mediada por receptores muscarínicos. En ratones FVB machos se realizó una isquemia miocárdica regional de 30 min y 2 h de reperusión sin EV (I/R, n=6); con EV pre-isquémica por 10 min (I/R-EVP, n=6); con EV pre-isquémica y atropina (I/R-EVP+A, n=5); con EV en los primeros 10 min de la reperusión (I/R-EVR, n=5); y con EV en la reperusión y atropina (I/R-EVR+A, n=5). Se cateterizó el ventrículo izquierdo para medir la presión sistólica (PSVI), la +dP/dt_{max}, la -dP/dt_{max}, la presión de fin de diástole (PDFVI) y la frecuencia cardíaca (FC). Luego se midió el área de riesgo por tinción con azul de Evans y el área de infarto con TTC. A los 5 min de EV la FC disminuyó un 11% respecto al basal en el grupo I/R-EVP. Asimismo, a los 5 min de EV la FC se redujo un 9% en el grupo I/R-EVR. Los efectos de la EV sobre la FC fueron bloqueados con la atropina. Durante la isquemia se observa un aumento de la PDFVI y una reducción de la PSVI, la +dP/dt_{max} y la -dP/dt_{max} en todos los grupos, sin diferencias significativas entre ellos. La EV redujo el tamaño de infarto tanto cuando se aplicó previo a la isquemia (44,6±3,5%) como en la reperusión (43,7±1,9%) respecto al grupo I/R (65,6±1,7%) (p<0,05). No se observó una reducción significativa del infarto al administrarse atropina en la EV pre-isquémica (54,4±1,5%). La atropina no bloqueó el efecto protector de la EV en la reperusión (41,6±3,5%). En conclusión, en el ratón la EV previo a la isquemia reduce el tamaño del infarto por vía muscarínica. En cambio la EV en la reperusión reduce el infarto de manera similar a la EV pre-isquémica, pero por mecanismos diferentes

599. (745) EL DÉFICIT DE GALECTINA 3 AFECTA EL PROCESO REPARATIVO Y ACELERA EL REMODELAMIENTO VENTRICULAR DESFAVORABLE POST-INFARTO DE MIOCARDIO EN RATONES

Martínez Naya, Nadia Laura¹; González, Germán E.¹; Casaglia, Pablo¹; Aruanno, María Eugenia¹; Morgunovsky Michell, Isaac L.¹; Noli Truant, Sofía²; Fernández, Marisa²; Volberg, Verónica¹; Malchiodi, Emilio²; Morales, Celina¹; Gelpi, Ricardo J.¹
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular (INFICA)-CONICET-UBA¹ Cátedra de Inmunología e Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA.²

Objetivo: Previamente evaluamos el rol del déficit de Gal-3 sobre el remodelamiento (RV) y la función ventricular (FV) post-infarto de miocardio (IM). En el presente trabajo hipotetizamos que el déficit de Gal-3 afecta el proceso reparativo post-IM y acelera

el RV desfavorable y la disfunción ventricular post-IM en ratones. Métodos: Ratones C57 y Gal-3 KO fueron sometidos a la ligadura permanente de la arteria coronaria o sham y divididos en 4 grupos: 1) C57 Sham (n=5); 2) Gal-3KO Sham (n=3); 3) C57+IM (n=13); y 4) Gal-3KO+IM (n=16). A los 7 días, los animales fueron anestesiados con Avertin (0,01 ml/g IP), se realizó ecocardiografía para evaluar la estructura y FV, seguidamente se cuantificó el tamaño de IM (tricroómico de Masson), el infiltrado de macrófagos y fibrosis

	C57 Sham	Gal3 KO Sham	C57+IM	Gal3 KO+IM
DDVI (mm)	3,9±0,3	3,5±0,3	4,4±0,1	4,8±0,2 †*
DSVI (mm)	2,6±0,3	2,5±0,3	3,5±0,1 †	4,1±0,2 †*
FE (%)	71±5	64±3	47±2 †	36±3 †*
TIM (%)			40±5	67±5 *
Fibrosis IM (%)			29±2	14±2 *
Macrófagos F4+/80+ IM			14±1	3±1 *

de la zona de IM. Resultados: (Promedio ± ESM)

TIM: tamaño de IM; DSVI y DDVI: diámetro sistólico y diastólico del VI; FE: fracción de eyección. † p<0,05 C57IM y Gal-3KO IM vs C57 Sham; * p<0,05 Gal-3KO IM vs C57IM Conclusión: El déficit de Gal-3 incrementa el tamaño del IM, previene el infiltrado de macrófagos y la fibrosis acelerando el remodelamiento y la disfunción ventricular. Esto sugiere que Gal-3 es un factor importante para el inicio y desarrollo del proceso reparativo, el RV y la FV post-IM.

600. (754) ÓXIDO NÍTRICO EN TEJIDO CARDIACO DE RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO: EFECTO DE (-)-EPICATEQUINA

Calabro, Valeria¹; Piotrkowski, Bárbara¹; Fischerman, Laura¹; Vázquez-Prieto, Marcela²; Galleano, Mónica¹; Fraga, César Guillermo¹

Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET-UBA¹ Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET; Departamento de Patología Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza²

La sobrecarga de fructosa en ratas se considera un modelo de Síndrome Metabólico (SMet), siendo la hipertensión, la hipertrigliceridemia y la resistencia a la insulina características típicas de este modelo. El presente trabajo evalúa la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) en tejido cardíaco de ratas con SMet y su modulación por (-)-epicatequina (EC). Para ello, ratas Sprague-Dawley machos se dividieron aleatoriamente en tres grupos y recibieron durante 8 semanas: i) dieta control y agua corriente (C); ii) dieta control y 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida (F) y iii) EC suplementada en la dieta (20mg/kg peso/día) y 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida (FEC). Se observó un aumento significativo de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el grupo F respecto al C (227±11 vs. 166±7 pmoles [14C] L-citrulina/g peso fresco.min, p<0,01). Los animales que recibieron EC mostraron la mayor actividad de NOS comparado con los grupos C y F (FEC: 264±4 pmoles [14C] L-citrulina/g peso fresco.min, p<0,001 vs. C y p<0,05 vs F). Estos resultados fueron asociados con un aumento significativo en los niveles de fosforilación de la isoforma endotelial de la NOS en los grupos F y FEC, con respecto al C (p-eNOS1177/eNOS total, C: 3,2±0,2; F: 3,8±0,3* y FEC: 3,8±0,3* (AU), *p<0,05 vs. C). Resultados preliminares mostraron que los niveles de proteínas nitrilotirosiladas, medidas por western blot, se incrementaron en F, mientras que en el grupo FEC retornaron a valores basales. Dado que en resultados previos hemos observado una mayor producción de anión superóxido, así como también una mayor expresión de p47phox (subunidad reguladora de la NOX) en ratas F (Medicina Vol 72 Supl. II - 2012, 480), se puede concluir que, la biodisponibilidad de NO en tejido cardíaco se encontraría disminuida en ratas con SMet y que la suplementación con EC lograría prevenir dichas alteraciones mediante la modulación de la actividad y expresión de las enzimas NOS y NOX.

601. (798) LA EXPRESIÓN DE ENOS EN ENDOTELIO Y MÚSCULO LISO AÓRTICO VARÍA DE ACUERDO AL MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL UTILIZADO.

Choi, Marcelo Roberto¹; Rodríguez Fermepín, Martín^{2,4};

Cerrudo, Carolina²; Montes, Wanda²; Saucedo, Silvia²; Zotta, Elsa²; Della Penna, Silvana Lorena²; Toblli, Jorge^{3,5}; Fernández, Belisario Enrique^{2,3,4}; Rosón, María Inés^{2,3}
Cátedra de Anatomía e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires-CONICET- Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)¹ Catedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² CONICET³ Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC)⁴ Hospital Alemán⁵

La eNOS se expresa constitutivamente en el endotelio y en el músculo liso vascular. El aumento de la presión sanguínea produce fuerzas de fricción sobre el endotelio (shear stress) que activan a la eNOS, y fuerzas de estiramiento circunferencial (stretch) que la inhiben. Objetivo: investigar si en modelos de hipertensión (HTA) con predominio de diferentes tipos de sobrecargas (volumen o presión), el perfil de expresión de la eNOS en endotelio y músculo liso aórtico se modifica. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho. Tiempos de tratamiento: 2, 4, 6 y 12 semanas (s): a) renovascular (RV), b) DOCA-sal (DS), c) controles (C). Se midió la presión arterial sistólica. En aorta torácica se evaluó la expresión y localización de eNOS por inmunohistoquímica. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias como la media \pm ES (ANOVA). Resultados: Ambos grupos desarrollaron HTA de modo tiempo-dependiente. En el grupo RV la inmunexpresión de eNOS incrementó a las 12 s en endotelio (C: 44,0 \pm 3,6; RV: 72,6 \pm 2,3*; *p<0,01) y a las 4, 6 y 12 semanas en músculo liso (4s, C: 3,1 \pm 1,0; RV: 7,9 \pm 0,5*; 6s, C: 2,1 \pm 0,9; RV: 9,7 \pm 0,8*; 12s, C: 0,8 \pm 0,4; RV: 11,4 \pm 1,0*). En DS, la expresión de eNOS incrementó en endotelio a las 6 y 12 s (6s, C: 37,1 \pm 5,9; DS: 65,0 \pm 5,2*; 12s, C: 44,8 \pm 3,6; DS: 86,2 \pm 6,6*), pero disminuyó en músculo liso a las 12s (C: 0,8 \pm 0,3; DS: 0,03 \pm 0,01*). Hubo una correlación positiva entre la eNOS endotelial y la presión arterial (r^2 : 0,62 p<0,002), y entre la eNOS en músculo liso y la presión arterial en RV (r^2 : 0,75 p<0,005). Conclusiones: La sobre-expresión de eNOS en endotelio se relaciona con el grado de hipertensión, mientras que en músculo liso aórtico varía según el tipo de sobrecarga predominante. Estos resultados sugieren diferentes mecanismos de regulación de la eNOS en endotelio y músculo liso aórtico, a la vez que resaltan la importancia de considerar el perfil integral de su expresión a nivel vascular en la fisiopatología de la hipertensión arterial.

602. (817) LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA ES LA MEDIADORA DE LOS EFECTOS CARDIOVASCULARES ADVERSOS PRODUCIDOS POR UNA EXPOSICIÓN AGUDA A PARTÍCULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL
 Garces, Mariana¹; Marchini, Timoteo¹; Magnani, Natalia¹; D'Annunzio, Verónica¹; Paz, Mariela²; Tasat, Deborah³; González Maglio, Daniel²; Gelpi, Ricardo¹; Álvarez, Silvia¹; Evelson, Pablo¹
Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)¹ Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-UBA-CONICET² CESyMA, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de General San Martín³

La exposición a partículas de contaminación ambiental (MP) se encuentra asociada a un aumento de la morbilidad y mortalidad a causa de enfermedades cardiovasculares. Se ha sugerido que la inflamación sistémica juega un rol importante en los mecanismos de daño observados. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la disminución del consumo de oxígeno cardíaco y la reserva contráctil observada en modelos animales luego de la inhalación de MP, son una consecuencia de una respuesta inflamatoria sistémica y pueden ser revertidos mediante un pretratamiento con un anticuerpo quimérico anti-TNF- α (Infliximab). Se utilizaron ratones Swiss instilados con una suspensión de partículas derivadas de la combustión del petróleo (ROFA) (1 mg/kg peso), tratados 30 min antes con Infliximab (25 mg/kg peso) por vía intraperitoneal. Luego de 3 h, se realizó un perfil de citoquinas por ELISA y se evaluó el consumo de oxígeno en corazón mediante respirometría de alta resolución. La reserva contráctil cardíaca se determinó mediante la

técnica de Langendorff, como la diferencia de presión desarrollada por el ventrículo izquierdo en condiciones basales y luego de un estímulo β -adrenérgico (Δ PDVI). La exposición a ROFA indujo un aumento en los niveles de TNF- α e IL-6 en plasma, que fue revertido mediante el pretratamiento con Infliximab. Asimismo, la disminución del 32% en el consumo de oxígeno cardíaco observada en los ratones expuestos a ROFA (control: 1100 \pm 60 ng at O/min g tejido, p<0,01), fue prevenida mediante el pretratamiento con el anticuerpo. En animales control, la Δ PDVI fue de 53 \pm 11%, mientras que en los animales expuestos a ROFA disminuyó un 18 \pm 3% (p<0,05). Sin embargo, la Δ PDVI en animales instilados con ROFA y pretratados con Infliximab fue de 43 \pm 6%, indicando una mejoría en la reserva contráctil cardíaca en este grupo. Estos resultados contribuyen a entender los mecanismos involucrados en los aumentos de la morbilidad y mortalidad producto de la exposición a MP.

TOXICOLOGÍA 2

603. (315) ACCIÓN DIFERENCIAL DE UN TÓXICO TIPO DIOXINA SOBRE CÉLULAS EPITELIALES Y FIBROBLASTOS DE GLÁNDULA MAMARIA DE RATÓN
 Miret, Noelia Victoria¹; Rico-Leo, Eva²; Pontillo, Carolina¹; Fernández-Salguero, Pedro²; Randi, Andrea¹
Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz, España²

El Hexaclorobenceno (HCB) es un probable carcinógeno humano, presente en leche materna y alimentos grasos. Demostramos que el HCB induce migración e invasión en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y metástasis en modelos animales. El HCB se une al Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR), estimulando acciones de membrana y nucleares. El Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF β 1) regula procesos de proliferación, migración y apoptosis a través de sus receptores T β RI y T β RII. Estudios en tejidos de ratones WT y KO AhR, proponen al TGF β como un efector downstream del AhR. Estudiamos la acción del HCB (0,005, 0,05, 0,5 y 5 μ M) en células epiteliales y fibroblastos de mama de ratón. Trabajamos con una línea epitelial: NMuMG y dos de fibroblastos: FGM+/+AhR y -/-AhR para analizar dependencia del AhR. Evaluamos: a) sobrevida (MTT), b) ciclo celular (citometría de flujo), c) migración (cierre de herida) y d) expresión de AhR, TGF β 1 y sus receptores (qPCR). Observamos mayores efectos en las células NMuMG, donde el HCB (0,5 μ M) redujo la sobrevida celular (p<0,001), incrementó las células en fase Go/G1 a todos los tiempos (12 y 24h, p<0,01; 36h, p<0,001) y disminuyó las células en fase S a 36h (p<0,01). Además, el pesticida aumentó la migración celular (p<0,05) y la expresión del AhR (p<0,01) a 0,05 μ M, mientras que disminuyó la migración (p<0,01) y aumentó los niveles de TGF β 1, T β RI y T β RII (p<0,05) a 5 μ M. En cambio en FGM, el HCB incrementó los niveles de AhR a dosis mayores (5 μ M, p<0,05) y no alteró la sobrevida, el ciclo celular, ni la migración. El HCB (5 μ M) aumentó la expresión de TGF β 1 (p<0,01) en FGM+/+AhR, mientras que elevó los niveles de T β RI en FGM-/-AhR (0,05 y 5 μ M, p<0,05). En conclusión, el HCB tiene efecto diferencial en células epiteliales y fibroblastos de mama de ratón. El pesticida induce arresto celular y modifica la migración solo en epiteliales, mientras que estimula la expresión de AhR en ambos tipos celulares pero a diferentes dosis.

604. (360) EFECTO DEL PESTICIDA HEXACLOROBENCENO SOBRE CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES DE PACIENTES CON Y SIN ENDOMETRIOSIS
 Chiappini, Florencia^{1,4}; Bastón, Juan I.²; Singla, José J.³; Pontillo, Carolina⁴; Miret, Noelia⁴; Farina, Mariana¹; Mesman, Gabriela²; Randi, Andrea⁴
Laboratorio de Fisiopatología Placentaria, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-UBA¹ Laboratorio de Fisiopatología Endometrial, Instituto

de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET² Servicio de Ginecología, Hospital de Clínicas José de San Martín³ Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁴

La endometriosis (EDT) es un desorden ginecológico frecuente, que causa dolor pelviano severo y subfertilidad. Algunos disruptores endócrinos, como pesticidas organoclorados estarían involucrados en el desarrollo de la EDT modulando la función endocrina e inmune. Se encontraron mayores cantidades de estos compuestos en sueros de pacientes con EDT comparados con controles. El Hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante persistente con efectos tóxicos en humanos y animales de laboratorio, siendo el alimento la principal fuente de exposición. En la lesión endometriósica la prostaglandina E2 producida por Ciclooxigenasa 2 (COX-2) induce la liberación de metaloproteasas (MMPs), favoreciendo el desarrollo de la enfermedad. Demostramos que el HCB aumenta la actividad de MMP2 y 9 y la expresión de COX-2, en la línea celular estromal de endometrio humano T-HESC. Objetivos: estudiar si el HCB altera parámetros de invasión e inflamación que promueven el desarrollo de EDT. Se utilizaron cultivos primarios de células estromales de endometrio eutópico (CEE) provenientes de mujeres sin (control) y con EDT. Evaluamos la acción del HCB (0,005, 0,05, 0,5 y 5 μ M) durante 24 h sobre: a) la actividad y expresión de MMP2 y 9 (zimografía en gel e inmunoblot), y b) la expresión de COX-2 (inmunoblot). Observamos en CEE de controles, que dosis bajas de HCB (0,05 μ M) inducen aumento en la expresión (50% $p < 0,05$) y actividad (120% $p < 0,05$) de MMP2, así como en la actividad de MMP9 (96% $p < 0,05$) y en la expresión de COX-2 (350% $p < 0,05$). En CEE de pacientes con EDT, dosis altas de HCB (0,5 μ M) producen un incremento en la expresión (196% $p < 0,05$) y actividad (100% $p < 0,05$) de MMP2, y una tendencia a aumentar la expresión de MMP9 y COX-2. Nuestros resultados sugieren que la exposición de las CEE al HCB podría contribuir al establecimiento de la EDT, incrementando su capacidad invasiva, al adquirir un fenotipo adecuado para implantarse en los sitios ectópicos y formar las lesiones endometriósicas.

605. (489) LA EXPOSICIÓN A BISFENOL A DURANTE EL DESARROLLO ALTERA LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL Y LA RESPUESTA UTERINA A UN TRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS EN LA RATA ADULTA

Bosquiazzo, Verónica L.¹; Vigezzi, Lucía²; Kass, Laura²; Ramos, Jorge G¹; Muñoz De Toro, Mónica M²; Luque, Enrique H²
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, (ISAL)-CONICET-UNL, Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹ Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, (ISAL)-CONICET-UNL²

La exposición a disruptores endócrinos en períodos críticos del desarrollo se ha asociado con trastornos del aparato reproductor femenino en la vida adulta. En el presente estudio se evaluó el efecto a largo plazo de la exposición perinatal (gestación + lactancia) a bisfenol A (BPA) en el útero de ratas y su respuesta a la terapia de reemplazo con estrógenos (E2). El BPA (0,5 ó 50 μ g/kg peso corporal/día) se administró en el agua de bebida desde el día 9 de gestación hasta el destete. Se estudió el útero de la descendencia femenina en el día postnatal (DPN) 90 y 360, y la respuesta uterina a E2 en DPN460 (DPN460-E2). La histología uterina se analizó en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Por inmunohistoquímica se evaluó la proliferación celular, la expresión de α -actina, p63 y receptores de estrógeno α (RE α) y de progesterona (RP). Por RT-PCR en tiempo real se estudió la expresión del ARNm de las isoformas de p63, IGF-I y IGF-II. En DPN90, disminuyó la proliferación de las células del epitelio glandular uterino en los animales expuestos a BPA0.5 y BPA50, mientras que el porcentaje del perímetro glandular ocupado por las células β -actina positiva disminuyó en el grupo BPA50. En PND360, la exposición a BPA aumentó la incidencia de anomalías en el epitelio uterino glandular y luminal. En respuesta a E2 (DPN460-

E2), la incidencia de glándulas con anomalías celulares y la multiplicidad de glándulas con metaplasia escamosa aumentaron en BPA50, mientras que en BPA0.5 aumentó la incidencia de glándulas con glándulas hijas. En el estroma subepitelial disminuyó la expresión del RP en ambos grupos de BPA, mientras que la expresión del RE α disminuyó en BPA50. La expresión del ARNm de la isoforma TA-p63 fue menor en BPA0.5 y mayor en BPA50. El ARNm de IGF-I y IGF-II disminuyó en BPA0.5. Los efectos a largo plazo de la exposición perinatal a BPA incluyen la inducción de anomalías en el tejido uterino y una respuesta alterada a la terapia de reemplazo con E2

606. (504) PROMOCIÓN DE ANGIOGÉNESIS EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA IN VIVO, Y NEOVASCULOGÉNESIS EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS HMEC-1 POR ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO

Pontillo, Carolina Andrea¹; Español, Alejandro²; Chiappini Florencia¹; Miret Noelia¹; Cocca Claudia³; Álvarez Laura¹; De Pisarev Diana Kleiman¹; Sales Mara Elena²; Randi Andrea Silvana¹
Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Laboratorio de Inmunofarmacología Tumoral, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET² Laboratorio de Radioisótopos, Departamento de Físico-Matemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica³

La formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial en el crecimiento tumoral y la metástasis. La exposición a contaminantes ambientales puede alterar el proceso angiogénico promoviendo el crecimiento tumoral. El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado presente en la leche materna y en los alimentos grasos y un ligando débil del receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR). Hemos demostrado que el HCB induce migración e invasión en células de cáncer de mama, el crecimiento tumoral y la metástasis en modelos animales. Nuestro objetivo fue examinar la acción del HCB en un modelo *in vivo* de angiogénesis tumoral inducida por células mamarias humanas MDA-MB-231 en ratones nude, e *in vitro* en células endoteliales humanas HMEC-1. Observamos que el HCB (3 y 30 mg/kg pc) incrementa la densidad vascular (20 y 40% respectivamente, $p < 0,001$) y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (90 y 110% respectivamente, $p < 0,01$) por inmunoblot (IB) *in vivo*. En células HMEC-1 expuestas al HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μ M), observamos un aumento en la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) (45%, $p < 0,01$) y de AhR (100%, $p < 0,05$) a HCB 0,05 μ M, así como de VEGF (91%, $p < 0,01$) y del receptor 2 de VEGF (VEGF2) (39%, $p < 0,05$) a HCB 0,5 μ M (IB). Además, encontramos una activación de las vías de señalización del VEGFR2, p38 (72%, $p < 0,01$) y ERK1/2 (150%, $p < 0,05$) a HCB 0,05 μ M (IB). Asimismo, el pesticida aumenta la migración celular (HCB 0,005 μ M, 35%, $p < 0,05$) (cierre de herida) y la tubulogénesis en matrigel (longitud túbulos HCB 0,005 μ M, 82%, $p < 0,01$; ramificaciones HCB 0,005 μ M, 100%, $p < 0,01$) en función de la dosis, sin afectar la proliferación. Estos efectos se suprimen cuando las células HMEC-1 son pretratadas con inhibidores de AhR, COX-2 y VEGFR2. En conclusión, el HCB promueve angiogénesis en cáncer de mama *in vivo* e *in vitro*. Estos hallazgos podrían ayudar a comprender la asociación entre la exposición al HCB, angiogénesis y la carcinogénesis mamaria.

607. (634) SOJA PROTEGE EL PULMÓN DE LA INTOXICACIÓN CON CADMIO

Boldrini, Gabriel G^{1,2}; Álvarez, Silvina M^{1,2}; Pérez Chaca, María Verónica³; Piguillen, Silvana N³; Biaggio, Verónica S^{1,2}; Gómez, Nidia N³; Giménez, María Sofía^{1,2}
Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas de San Luis¹ Laboratorio de Nutrición y Medio Ambiente, Universidad Nacional de San Luis² Laboratorio de Morfología, Universidad Nacional de San Luis³

El Cadmio (Cd) es un elemento tóxico y un contaminante ambiental. Estudiamos el efecto de la intoxicación crónica con

Cd sobre la histoarquitectura del pulmón y marcadores de estrés oxidativo. Se utilizaron cuatro lotes de ratas hembras Wistar: dos recibieron una dieta con caseína y dos, con soja. En 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 pulmones y se determinó el nivel de lipoperoxidación (TBAR'S). Se aisló ARN total y se transcribió a ADNc. Se midió la expresión de los siguientes genes: p47, nrf-2, NOX-2, SOD, GPx, Citidilil transferasa (CT). S28 fue el control interno. Se fijó el tejido con Bouin y se coloreó con Hematoxilina-Eosina para microscopía óptica. TBAR'S aumentó en los grupos Cd ($p < 0,01$), indicando que hay lipoperoxidación. El factor nrf-2 no varió en los grupos Caseína, pero aumentó significativamente en Soja Cd ($p < 0,01$). La expresión de NOX-2 no varió entre los grupos Caseína mientras que disminuyó significativamente en Soja-Cd ($p < 0,05$) y p47 aumentó significativamente en Soja-Cd sin mostrar diferencias entre los grupos Caseína. SOD disminuyó significativamente en Soja Control y aumentó en Soja Cd, sin diferencias en los grupos Caseína. GPx mostró una tendencia al aumento en Caseína-Cd sin diferencias en los grupos Soja. La expresión de CT, involucrada en la síntesis de surfactante pulmonar, aumentó significativamente en Soja Cd, con tendencia al aumento en Caseína Cd. A nivel estructural, los pulmones Caseína-Cd mostraron edema severo, septos muy dilatados, compatibles con espacios no funcionales, áreas de marcada congestión e invasión de polimorfonucleares. Los pulmones Soja-Cd presentan desorganización, edema moderado y septos dilatados. Estos resultados demuestran que la exposición crónica a Cd tiende a desorganizar la histoarquitectura pulmonar y a generar un cuadro de estrés oxidativo, lo que se ve parcialmente atenuado por una dieta rica en soja.

608. (644) EFECTO DE DISTINTAS DIETAS SOBRE CEREBELO INTOXICADO CON CADMIO

Álvarez, Silvina Mónica¹; Quiroga Lohaiza, Claudio D.¹; Plateo Pignatari, María G¹; Gómez, Nidia N²; Valdez, Susana³; Giménez, María S²

Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO)-CONICET-UNSL¹ Laboratorio de Morfología, Universidad Nacional de San Luis² Laboratorio de Oncología, IMBECU (CCT)-CONICET-Mendoza³

El Cadmio (Cd) es un elemento tóxico y un contaminante ambiental. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la intoxicación crónica con Cd sobre la histoarquitectura del cerebelo, y marcadores de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis bajo diferentes dietas. Se utilizaron cuatro lotes de ratas hembras Wistar: dos lotes recibieron una dieta con caseína y dos, con 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, SOD, GPx, IL-10, TNF-alfa, INF-gama, Bax, Bcl-2. S28 fue el control interno. 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. SOD y GPx disminuyeron significativamente en ambos grupos Cd ($p < 0,05$ y $p < 0,005$ respectivamente). La excepción fue SOD: en el grupo Soja-Cd se incrementó significativamente. La expresión de TNF-alfa aumentó significativamente en Caseína-Cd ($p = 0,001$) mientras que disminuyó significativamente en Soja-Cd, comparado con Soja Control. La expresión de IL-10 no varió, mientras que la de Interferón gama disminuyó significativamente en ambos grupos Cd. A nivel estructural, se observó cierta desorganización en los grupos Cadmio, especialmente en la capa de las células de Purkinje. En la zona medular se vieron variaciones en el número de células de la población de la neuroglía. Estos resultados demuestran que la exposición crónica a Cd tiende a deprimir el sistema antioxidante del cerebelo, favoreciendo un cuadro de estrés oxidativo, desorganización estructural y ausencia de procesos inflamatorios; situación que puede ser parcialmente mejorada por el uso de una dieta rica en soja.

609. (677) CLORPIRIFOS: ESTUDIO DE SUS EFECTOS COMO DISRUPTOR ENDÓCRINO

Ventura, Clara¹; Ramos Nieto, María Rosa¹; Bourguignon, Nadia²; Lux-Lantos, Victoria²; Cocca, Claudia¹; Núñez, Mariel¹

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ Laboratorio de Neuroendocrinología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²

Los disruptores endócrinos (DE) son compuestos que interfieren con la regulación hormonal e influyen en la carcinogénesis mamaria. Demostramos que concentraciones ambientales de clorpirifos (CPF), un insecticida utilizado en la Argentina, inducen la proliferación de células derivadas de carcinoma mamario humano a través del receptor de estrógenos alfa (ER α). Objetivo: evaluar la acción de CPF en tejido mamario de rata y su entorno hormonal. Métodos: los animales fueron expuestos a CPF 0,01 y 1 mg/Kg/día (CPF 0,01 y CPF 1) o vehículo (C) por vía oral durante 100 días a partir de los 40 días de vida. Se realizó el análisis histopatológico del tejido mamario. El receptor de progesterona (RPG) y el ER α se determinaron por inmunohistoquímica y western blot. Por RIA se analizaron los niveles de estradiol (E $_2$), progesterona (Pg), testosterona (T) en suero y ovario, y los niveles séricos de LH y FSH. Resultados: El CPF incrementó el porcentaje de ductos ($p < 0,05$ vs C) y lobulillos ($p < 0,05$ CPF 0,01 vs C) hiperplásicos en el tejido mamario de los animales. El CPF 1 disminuyó la fosforilación del RE α ($27,3 \pm 4,6\%$ respecto a C, $p < 0,05$) e incrementó la expresión del RPG ($p < 0,05$ vs C) por ambos métodos estudiados. El CPF 1 disminuyó los niveles séricos de E $_2$ ($42,6 \pm 3,0\%$ respecto C) y Pg ($49,8 \pm 2,8\%$ respecto a C). Los niveles de T no fueron modificados. El contenido ovárico de E $_2$ y T disminuyó en los animales expuestos a CPF 1 ($74,1 \pm 15,1\%$ y $35,1 \pm 9,6\%$ respecto a C, respectivamente) mientras que el contenido de Pg mostró un ligero incremento. Los niveles séricos de LH fueron levemente reducidos por CPF 0,01 ($31,2 \pm 5,2\%$ p:ns) y CPF 1 ($25,2 \pm 6,8\%$, p:ns), la concentración de FSH no fue modificada por el tóxico. Conclusión: Nuestros resultados indican que el CPF podría actuar como DE afectando la síntesis ovárica de hormonas esteroideas y presentando una acción proliferativa en el tejido mamario, lo que podría estar relacionado con un mayor riesgo a la carcinogénesis mamaria.

610. (692) LA EXPOSICIÓN AL CADMIO A TRAVÉS DEL AGUA DE BEBIDA INDUCE EFECTOS XENOESTROGÉNICOS EN LA ADENOHIPÓFISIS, EL ÚTERO Y LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Benzo, Yanina; Ronchetti, Sonia A.; Novack, Gisela V.; Duvilanski, Beatriz H.; Cabilla, Jimena P.

Instituto de Investigaciones Biomédicas (INBIOMED)-UBA-CONICET

El cadmio (Cd) es un metal pesado que constituye un contaminante ambiental de gran importancia. La exposición al Cd ocurre principalmente a través del humo de cigarrillo, alimentos y consumo de agua. El 17 β -estradiol (E2) cumple un papel clave en la regulación adenohipofisaria y en la proliferación celular de tejidos hormona-dependientes. Estudios previos sugieren que el Cd es un xenoestrógeno que actúa a través de la activación del receptor de estrógenos (ER) imitando los efectos del E2. Si bien los efectos similar-E2 del Cd han sido previamente reportados en líneas celulares, aun no han sido estudiados *in vivo*. El objetivo de este trabajo es investigar los efectos xenoestrogénicos del Cd *in vivo* en tejidos hormona-dependientes. Ratas adultas de la cepa Wistar fueron ovariectomizadas (OVX) y expuestas o no (control, C) a CdCl $_2$ 1 ppm en agua de bebida durante un mes. El consumo de agua, el peso de los animales y el ciclo estral se monitorearon periódicamente. La expresión proteica se evaluó por WB y el análisis histológico por tinción de HE. La exposición al Cd aumentó la frecuencia relativa de proestros y estros ($[n^{\circ} P+E/n^{\circ} \text{total de muestras}] \times 100$; C: 0%; Cd: 60%) e incrementó el peso fresco del útero ($p < 0,001$). En la adenohipofisis, el Cd incrementó la expresión proteica de la isoforma TERP2 del ER α ,

de la prolactina y de los marcadores de proliferación ciclina D3 y PCNA ($p < 0,05$). Además, aumentó la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de la guanilil ciclasa soluble, la cual es estimulada por E2 y correlaciona con los efectos proliferativos de la hormona ($p < 0,05$). Histológicamente, el Cd incrementó la altura y el número de invaginaciones del epitelio uterino; mientras que en mama aumentó la vascularización y el número de lóbulos y ductos. Estos resultados sugieren que el Cd *in vivo* actúa como un disruptor endocrino imitando los efectos proliferativos del E2 en tejidos hormona-dependientes lo cual remarca su potencial participación en patologías pre-neoplásicas y neoplásicas.

611. (725) ASPECTOS OXIDATIVOS ASOCIADOS A LA INTOXICACIÓN AGUDA DE AS EN CEREBRO.

Bonetto, Julian Gerardo¹; Villaamil-Lepori, Edda¹; Puntarulo, Susana²

*Cátedra de Toxicología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*¹ *Cátedra de Físico-química, Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET-UBA*²

Humanos y animales expuestos al As experimentan un incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno y se ha visto una modificación en el metabolismo de la glucosa y del glutatión reducido (GSH) en estudios llevados a cabo en cultivos celulares y distintos órganos (hígado, riñón y sangre). La hipótesis de este trabajo es que una intoxicación aguda con As modifica los parámetros redox-dependientes en cerebro. Ratas Wistar macho jóvenes (200 g) fueron inyectadas intraperitonealmente (i.p.) con arsenito de sodio en dosis de 1; 3 y 5,8 mg As/kg peso. El contenido de As se determinó en cerebro entero mediante la generación de hidruros-espectrofotometría de absorción atómica (GH-EAA). Se determinó la velocidad de generación del radical hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$) y de radicales lipídicos (RL^{\bullet}) mediante Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) y el contenido de GSH mediante HPLC-EQ. Se observó un incremento lineal en la concentración de As en cerebro entero con respecto a la dosis administrada de $0,070 \pm 0,008$; $0,127 \pm 0,015$ y $0,27 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ de cerebro para 1; 3 y 5,8 mg As/kg peso, respectivamente. Frente a la administración de As se determinó un aumento en la velocidad de generación de RL^{\bullet} en cerebro de 2 y 2,5 veces para las dosis de 3 y 5,8 mg As/kg peso, respectivamente. Sin embargo, no se midió una diferencia significativa en la velocidad de generación de $^{\bullet}\text{OH}$, ni en el contenido de GSH entre ratas control ($1,9 \pm 0,1$ mM) y tratadas ($2,0 \pm 0,1$ mM) a las 24 h post-tratamiento con 5,8 mg As/kg. Los resultados indican que el 0,05; 0,032 y 0,035% de la dosis administrada i.p. llega al cerebro para 1; 3 y 5,8 mg As/kg peso, respectivamente, y que el potencial redox asociado al metabolismo oxidativo de GSH no se vio afectado, al menos en estas primeras instancias del tratamiento agudo. Sin embargo, el daño oxidativo a lípidos es un claro indicio que las especies activas juegan un papel en el efecto verificado frente al tratamiento agudo con As.

612. (726) EL PESTICIDA ENDOSULFÁN INDUCE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN REGIONES REGULATORIAS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL ÚTERO RECEPTIVO

Milesi, María Mercedes; Alarcón, Ramiro; Ramos, Jorge Guillermo; Rossetti, María Florencia; Muñoz-De-Toro, Mónica; Luque, Enrique Hugo; Varayoud, Jorgelina
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL)-CONICET-UNL

Previamente demostramos que la exposición postnatal a endosulfán produce subfertilidad caracterizada por disminución en el número de embriones implantados. Esta alteración está asociada con cambios en la vía de señalización endócrina mediada por receptores esteroides (receptor de estrógenos α , RE α y receptor de progesterona, RP) en el endometrio receptivo. En el presente trabajo nos propusimos determinar si la alteración en la expresión de ambos receptores está mediada por modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias de los mismos. Crías hembra de ratas fueron tratadas vía sc los días postnatales (DPN) 1, 3, 5

y 7 con aceite de maíz (control) o endosulfán (6 $\mu\text{g/kg/d}$ ó 600 $\mu\text{g/kg/d}$). En DPN90 las hembras fueron preñadas y en día 5 de gestación se obtuvieron muestras de útero (endometrio receptivo) para determinar mediante RT-PCR en tiempo real la expresión relativa del ARNm de RP, RE α y sus regiones promotoras. Además se evaluó el patrón de metilación del ADN genómico de los promotores activos mediante análisis de restricción con enzimas sensibles a metilación. La exposición a ambas dosis de endosulfán no modificó la expresión del ARNm de RP en el endometrio receptivo, pero indujo un incremento en la expresión del ARNm de RE α . En todos los grupos, los promotores activos para RE α fueron OS, O, OT y E1. Endosulfán aumentó la expresión del ARNm total de RE α a expensas del incremento en la actividad de los promotores OS, O, OT y E1. Adicionalmente detectamos modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias de los promotores O, OT y E1, evidenciadas por una disminución de los niveles de metilación de sitios de restricción estudiados. Mediante estudios bioinformáticos detectamos que estos sitios están regulados por factores de transcripción vinculados al control del proceso de implantación. La subfertilidad por exposición postnatal a endosulfán está mediada por modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias del RE α en el endometrio receptivo.

613. (737) EL PLAGUICIDA ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFOS INHIBE LA PROLIFERACIÓN POR DISTINTOS CAMINOS DE SEÑALIZACIÓN EN CELULAS DE MELANOMA CON DIFERENTE GRADO DE DIFERENCIACIÓN

Ventura, Clara¹; Venturino, Andrés³; Randi, Andrea²; Núñez, Mariel¹; Cocca, Claudia¹

*Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*¹ *Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*² *LIBIQUIM-UnCo*³

En presentaciones previas demostramos que el insecticida clorpirifos (CPF) disminuye la proliferación celular mediante un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ERO) en líneas celulares derivadas de melanoma con diferente grado de diferenciación. OBJETIVO: Estudiar la participación de las MAPKs y del H_2O_2 en esa inhibición. METODOLOGÍA: En las líneas WM35 y M1/15 derivadas de melanoma expuestas a CPF (0,05 - 50 μM), evaluamos: la proliferación por recuento clonogénico e incorporación de Bromo-deoxiuridina (BrdU), las ERO por citometría de flujo con la sonda DCF-2DA y la fosforilación de ERK1/2 y p38 por Western blot en presencia y ausencia de sus inhibidores específicos. El CPF 50 μM inhibió la clonogenicidad en un $45,9 \pm 17,2\%$ en WM35 ($p < 0,05$) y $44,9 \pm 8,7\%$ en M1/15 ($p < 0,01$). Después de 24 h, el CPF disminuyó la incorporación de BrdU en un $25,2 \pm 5,7\%$ respecto al control ($p < 0,05$) en la línea M1/15 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 ($p < 0,05$). La inhibición de la clonogenicidad fue revertida por el agregado de catalasa. En ambas líneas celulares, el CPF 50 incrementó la fosforilación de p38 a tiempos cortos. Esta fosforilación se mantuvo hasta las 6 hs en las células M1/15 ($p < 0,001$) y la inhibición de la clonogenicidad fue revertida por agregado de un inhibidor de p38. En WM35, la inhibición de la clonogenicidad resultó independiente de p38 y observamos una disminución en la fosforilación de ERK1/2 luego de 24 hs de exposición a CPF 50 ($49,7 \pm 10,2\%$). CONCLUSION: El CPF inhibe la proliferación en las células de melanoma. Esta acción es mediada por H_2O_2 a través de caminos de señalización diferentes en las líneas con diferente grado de diferenciación. En la línea M1/15 es dependiente de p38 y en la línea WM35, más diferenciada, podría asociarse a una disminución de la actividad de ERK1/2.

FARMACOLOGÍA 1

614. (24) NOVEDOSO EFECTO ANTIDEPRESIVO DEL ÁCIDO DOCOSAPENTAENOICO (DPA-OMEGA-3) Y SU PARTICIPACIÓN EN LA POTENCIACIÓN DEL EFECTO ANTIDEPRESIVO DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 POR FLUOXETINA.

Laino, Carlos¹; García, Pilar²; Podestá, María Fernanda^{3,5,6}; Höcht, Christian³; Slobodianik, Nora⁵; Reinés, Analía^{3,5,6}
*Universidad Nacional de La Rioja*¹ *Instituto de Tecnología de Alimentos, INTA Castelar*² *Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*³ *Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA)-CONICET-UBA*⁴ *Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*⁵ *Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. De Robertis" (IBC)-UBA-CONICET*⁶

Previamente demostramos que el tratamiento combinado de fluoxetina (FLX) a dosis antidepressivas produce un efecto antidepressivo aditivo, mientras que a dosis no-antidepressivas produce una potenciación del efecto antidepressivo de los ácidos grasos omega-3 (O3) en el modelo experimental de depresión "Forced Swimming Test" (FST) en ratas. El objetivo de este trabajo fue evaluar posibles mecanismos farmacocinéticos y bioquímicos (relacionados con los niveles cerebrales de O3) involucrados en la potenciación por fluoxetina del efecto antidepressivo de los O3. La co-administración de O3 con dosis no-antidepressivas de FLX no modificó las concentraciones cerebrales de la droga ni los niveles plasmáticos del metabolito norfluoxetina. En combinación con O3, tanto las dosis antidepressivas como las no-antidepressivas de FLX aumentaron los niveles hipocámpales de DPA. Este efecto no se observó con los tratamientos individuales. El tratamiento crónico con DPA ejerció efectos antidepressivos en el FST a la vez que incrementó los niveles hipocámpales de DPA. Nuestros resultados sugieren la ausencia de una interacción farmacocinética entre fluoxetina y O3 y revelan cambios específicos en los niveles hipocámpales de DPA con los tratamientos combinados. También sugieren un novedoso efecto antidepressivo del DPA, que podría contribuir al mecanismo de potenciación del efecto antidepressivo de los O3 por FLX.

615. (30) PROLONGACIÓN DEL INTERVALO QTC POR DEXTROPROPOXIFENO: CORRELACIÓN ENTRE MEDICIONES ELECTROCARDIOGRÁFICAS Y CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS

Keller, Guillermo Alberto^{1,2}; Schimpl, Andrea¹; Villa, María Cecilia¹; Tcherkansky, Ariel Nicolás³; Belloso, Waldo³; Fernández, Nicolás⁴; Olivera, Nancy Mónica⁴; Quiroga, Patricia Noemí⁴; Diez, Roberto Alejandro¹; Di Girolamo, Guillermo¹
*Unidad de Farmacovigilancia, Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*¹ *Departamento de Urgencias, Hospital General de Agudos Donación Francisco J. Santojann*² *Sección Farmacología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires*³ *CENATOXA - Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*⁴

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. En ese contexto se desea conocer la relación entre el dextropropoxifeno, su metabolito y el intervalo QTc. Métodos: Se realizó ECG y laboratorio, basal y durante el tratamiento (diseño prospectivo observacional) a pacientes que recibieran DP en goteo continuo. Se midió el fármaco (DP) y su metabolito nordextropropoxifeno (NDP) en plasma por Cromatografía Gaseosa - Espectrometría de Masas (GC - MS). Resultados: Se incluyeron 92 pacientes, siendo 46 (50%) hombres. La edad [promedio±DS (Rango)] fue 67±13 (41-89) años, el peso 71±14 (51-99) Kg, la altura 168±8 (151-182) cm, y el índice de masa corporal 25,10 ± 4,00 (17,71-33,56) Kg/m². Se analizó la presencia de antecedentes clínicos que pudieran implicar un riesgo superior de prolongación del QTc. Hubo 57 (62,0%) pacientes que presentaron por lo menos un factor de riesgo. A nivel basal, los pacientes tenían: R-R' 841±173 (520-1120) ms, FC 74±17 (53-115) lpm, QT 392±43 (300-460) ms, QTc 429±6 (416-440) ms. Intratratamiento, luego de un goteo continuo de DP a una dosis de 125±25 (100-150) mg, durante un 8±4 (3-25) días, presentaron R-R' (ms) 807±165 (520-1100), FC 77±17 (54-115),

QT 384±42 (300-460), QTc 429±7 (416-441). El ΔQTc promedio fue 0±10 (-24 a +22) ms. No hubo casos de prolongación del QTc. Las concentraciones de DP y NDP intratratamiento fueron: 112±38 (45-199) y 65±33 (13-129). El QTc y ΔQTc mostraron mayor correlación con el NDP (R=0,85). Conclusion: Se corroboró un efecto concentración-dependiente del metabolito NDP sobre el QTc. Podría esperarse que a concentraciones superiores genere prolongación del QTc. Sin embargo, a las dosis utilizadas en la práctica clínica, el DP y NDP no parece alcanzar concentraciones que prolonguen el QTc.

616. (91) ALENDRONATO Y REMODELACIÓN VASCULAR

Cutini, Pablo; Rauschemberger, María Belén; Massheimer, Virginia
Instituto de Investigaciones Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR)-UNS-CONICET, Bahía Blanca

La lesión vascular se inicia con la interacción monocitos y plaquetas al endotelio y con la disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). En su etapa final la lesión se calcifica, lo que implica la transdiferenciación de células musculares lisas vasculares (CMLV) a linaje osteoblástico. La angiogénesis constituye una alternativa de supervivencia de las células involucradas en la lesión. Siendo los bisfosfonatos (BF) fármacos de uso frecuente para el tratamiento de osteoporosis postmenopáusica, nuestro objetivo fue estudiar el efecto del BF alendronato (ALN) sobre procesos involucrados en el remodelado vascular. Empleamos cultivos primarios de células endoteliales (CE) y CMLV aisladas de aorta murina. En CE, el estímulo inducido por ALN 5μM sobre la producción de NO (método de Griess) se mantiene aún en condiciones de altas concentraciones de Ca²⁺ extracelular (221±19, 345±21, 319±30 nmol NO/mg prot; C, ALN, ALN+Ca²⁺ 3mM; p<0,05). Evaluamos la adhesión de plaquetas y monocitos a CE: ALN inhibe la adhesión plaquetaria basal (39%, p<0,05); sin embargo, no altera la adhesión basal de monocitos. Observamos que 24 h de tratamiento con el BF estimuló la síntesis de VEGF (25±1; 39±2 pg VEGF/mg prot; C; p<0,05; técnica de ELISA). La angiogénesis involucra la proliferación y migración de CE. Demostramos que el BF regula estos eventos. Estos resultados sugieren una acción favorable de ALN a nivel vascular. En un modelo de calcificación (CMLV inducidas a transdiferenciación ósea por incubación en un medio pro-calcificante: Ca²⁺ 4mM, β-glicerol fosfato 10mM), 24 h de tratamiento con ALN 5μM no modificó la producción basal de fosfatasa alcalina (FAL, marcador de diferenciación osteoblástica). En cambio, en una línea celular osteoblástica (MC3T3), ALN sí estimula la síntesis del marcador (37% sobre el control, p<0,05). En conclusión, ALN sería un fármaco activo a nivel vascular con una acción específica sobre eventos involucrados en remodelación vascular.

617. (95) ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATONES CBI-GE INFECTADOS CON TRICHINELLA SPIRALIS Y TRATADOS CON EL COMPLEJO ALBENDAZOL:CITRATO DE β-CICLODEXTRINA (ABZ:C-β-CD)

Codina, Ana Victoria^{1,5}; García, Agustina^{3,4}; Roggero, Eduardo¹; Vasconi, María Delia^{1,2}; Leonardi, Darío^{3,4}; Di Masso, Ricardo^{1,5}; Lamas, María Celina^{3,4}; Hinrichsen, Lucila^{1,5}
*Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario*¹ *Área Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario*² *Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario*³ *Instituto de Química Rosario (IQUIR)-CONICET*⁴ *CIC-UNR*⁵

El albendazol (ABZ), agente terapéutico preferencial para el tratamiento de la trichinellosis, es un fármaco poco soluble en agua (1μg/ml), lo que limita su absorción gastrointestinal. Presenta severos efectos adversos, entre ellos la irritación gastrointestinal. La formulación ABZ:C-β-CD incrementó la velocidad de disolución del ABZ mejorando su capacidad de absorción, biodisponibilidad oral y eficacia antiparasitaria. Con el fin de evaluar si esta for-

mulación disminuye los efectos adversos del principio activo se analizó la histología del tracto gastrointestinal (esófago, estómago e intestino) en un modelo murino de trichinellosis luego de la administración oral de ABZ o ABZ:C-β-CD. Ratones machos CBI-IGE infectados con 2 larvas musculares de *Trichinella spiralis* por g de peso corporal se dividieron en 3 grupos (control, tratado con ABZ y tratado con ABZ:C-β-CD; n=6 por grupo) y recibieron una dosis diaria de 50 mg/kg de peso de ABZ los días 28, 29 y 30 post-infección. Los animales se sacrificaron 3 horas después de la última dosis y se les extirpó esófago, estómago y duodeno. Se tomaron muestras representativas de cada órgano, se fijaron en Bouin e incluyeron en parafina. Para el análisis histopatológico, los cortes de tejido se tiñeron con hematoxilina-eosina. El estudio del esófago y estómago no mostró diferencias significativas entre los grupos. En el duodeno, el 60% de los animales tratados con ABZ presentó alteración de la estructura de la mucosa con pérdida total de la capa muscular; presencia de necrosis, elevada cantidad de infiltrado inflamatorio mononuclear y vasodilatación. Por el contrario, los animales tratados con ABZ:C-β-CD mostraron una estructura conservada de la mucosa y de la capa muscular duodenal con algunas lesiones leves (50%). Estos resultados sugieren que el tratamiento con ABZ provoca una reacción inflamatoria generalizada en el duodeno murino y señalan que la formulación ABZ:C-β-CD minimiza los efectos adversos propios de la droga.

618. (142) EFECTOS DEL TRAMADOL SOBRE EL INTERVALO QTc: EVALUACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA COTIDIANA Y CORRELACIÓN CON CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS

Keller, Guillermo Alberto^{1,2}; Schimpl, Andrea¹; Villa, María Cecilia¹; Tchercansky, Ariel Nicolás³; Bellosso, Waldo³; Fernández, Nicolás⁴; Olivera, Nancy Mónica⁴; Quiroga, Patricia Noemí⁴; Diez, Roberto Alejandro¹; Di Girolamo, Guillermo¹ *Unidad de Farmacovigilancia, Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Departamento de Urgencias, Hospital General de Agudos Donación Francisco J. Santojanni² Sección Farmacología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires³ CENATOXA, Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴*

Introducción: El síndrome de QT largo es un efecto adverso serio potencialmente mortal si se asocia a Torsión de Punta. Varios productos opiáceos han sido vinculados al mismo, y el propoxifeno ha sido retirado del mercado por ello y reemplazado en muchas formulaciones por tramadol. Se desconoce si este principio activo se asocia o no a prolongación del QTc. Métodos: La cuantificación del fármaco en plasma se efectuó por GC-MS. Se realizó ECG basal y durante el tratamiento. Se realizaron controles de ionograma y análisis de antecedentes que pudieran influir sobre el intervalo QTc. Resultados: Se incluyeron 31 pacientes, siendo 23 (74%) hombres. La Edad [promedio ± DS (Rango)] fue 62±13 (36-88) años, peso 91±28 (68-150) Kg, altura 175±14 (159-195) cm, y el IMC 28,20 ± 4,54 (23,93-33,66) Kg/m². Presentaron antecedentes de: arritmia: 1 (3,2%), cardiomiopatía isquémica: 1 (3,2%), insuficiencia renal: 3 (9,7%), diabetes: 2 (6,5%) y obesidad: 3 (9,7%). A nivel basal presentaron intervalo R-R' (ms) 805±164 (500-1111), frecuencia cardíaca (lpm) 78±16 (54-120), QT (ms) 378±29 (310-420), QTc (ms) 427±45 (332-537). Luego de recibir tramadol a una dosis de 53 ± 13 (50-100) mg, el ΔQTc promedio fue 12 ± 53 (-87 a +190) ms, con R-R' (ms) 759±149 (361-1071), frecuencia cardíaca (lpm) 83±21 (56-166), QT (ms) 378±44 (300-550), QTc (ms) 438±52 (357-583). Respecto a casos de prolongación del intervalo QTc intratratamiento, se encontraron 9 (29,03%) QTc > 450(♂) / 470(♀), 2 (6,45%) QTc > 500, 6 (19,35%) ΔQTc > 30 y 2 (6,45%) ΔQTc > 60. Las concentraciones de tramadol intratratamiento fueron: 108±67 (25-255). Hubo escasa correlación entre las concentraciones de tramadol y el ΔQTc (R=0,12). Conclusión: Se encontraron casos de prolongación del intervalo QTc por este fármaco. Si bien no existió correlación significativa con concentraciones plasmáticas, debería mantenerse una vigilancia preventiva sobre su efecto en el QTc.

619. (170) ALTERACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE ANIONES ORGÁNICOS LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE FUROSEMIDA (F) EN RATAS

Severin, María Julia; Bulacio, Romina P.; Hazelhoff, María H.; Mamprin, María E.; Brandoni, Anabel; Torres, Adriana M. *Área Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas- UNR- CONICET*

Se ha descrito que la administración crónica de F induce la expresión renal del transportador basolateral de aniones orgánicos 1 (Oat1). Esta proteína interviene en la eliminación renal de aniones orgánicos de importancia farmacológica (diuréticos, antineoplásicos, antiinflamatorios, antivirales, antibióticos, etc). El p-aminohipurato (PAH) es un anión orgánico modelo para el estudio de la excreción renal de estos compuestos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento crónico de F sobre los parámetros farmacocinéticos de PAH. Se usaron ratas Wistar macho controles (C, n=8) y tratadas 4 días con F (6 mg/kg p.c., s.c./día; n=7). El día 5, se administró una dosis de PAH (30 mg/kg p.c., i.v.) y se recolectaron muestras de sangre arterial entre 0-25 min, orina y tejido renal para dosar PAH por espectrofotometría. La expresión renal de Oat1 se evaluó por inmunoblotting. Los datos de PAH en plasma se ajustaron a un modelo bicompartimental con eliminación desde el compartimento tisular. Se determinaron: constantes de velocidad de las fases de distribución (α) y de eliminación (β), microconstantes de velocidad de transferencia (k12, k21) y de eliminación desde el compartimento tisular (k20), clearance sistémico (Cl), acumulación de PAH en tejido renal (PAHr) y en orina (PAHo). (*) p<0,05. α, k12 y k21 no presentaron diferencias entre grupos. β (min⁻¹): C= 0,054±0,007, F= 0,030±0,006*; k20 (min⁻¹): C= 0,064±0,009, F= 0,036±0,006*; Cl (mL/min/100g): C= 2,34±0,27, F= 1,02±0,26*; PAHr (% de dosis): C= 26±3, F= 35±2*; PAHo (% de dosis): C= 21±4, F= 4±3*; Oat1 (%): C= 100±10, F= 161±12*. La modificación de Cl, k20, β y PAHo demostraría que F disminuye la eliminación renal de PAH, a pesar del aumento de Oat1. Alteraciones en el transporte apical de PAH podrían explicar la disminución de su excreción renal. El tratamiento crónico con F en forma simultánea con otros aniones orgánicos ocasionaría interacciones farmacocinéticas con potencial relevancia clínica.

620. (220) EVALUACIÓN EN UN MODELO DE CORAZÓN PERFUNDIDO DE COBAYO MEDIANTE LA TÉCNICA DE LANGENDORFF DE LAS MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL DEXTROPROPOXIFENO EN LA REPOLARIZACIÓN VENTRICULAR

Di Girolamo, Guillermo¹; Villa, María Cecilia¹; Schimpl, Andrea¹; Keller, Guillermo Alberto¹; Diez, Roberto Alejandro¹; Fernández, Nicolás²; Olivera, Nancy M.²; Quiroga, Patricia N.²; Said, Matilde³ *Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ CENATOXA, Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata³*

Introducción: La prolongación del intervalo QT inducida por fármacos puede generar arritmias ventriculares graves. Prácticamente todos los medicamentos que prolongan el QT bloquean canales IKr. La guía ICHS7B describe la evaluación no clínica para establecer el potencial arritmogénico a partir de la prolongación de la repolarización ventricular y la duración del potencial de acción (DPA). Objetivos: determinar las modificaciones por dextropropoxifeno (DPF) de la DPA30, DPA90 y la DPA 30-90, considerada esta última de mayor sensibilidad para detectar el bloqueo de IKr y el riesgo arritmogénico. Materiales y métodos: corazones de cobayo aislados y perfundidos (solución Ringer bicarbonato) a 37°, 22 ml/min, frecuencia de estimulación 3.5 Hz (técnica de Langendorff) fueron tratados con concentraciones crecientes de DPF, representando concentraciones de la forma libre de dosis terapéuticas. Se registraron potenciales monofásicos epicárdicos para medir DPA y contractilidad a través de un balón colocado en

ventrículo izquierdo (VI) expresándose la presión desarrollada por el VI como % de cambio respecto del basal. Los datos se expresan como media (ES) y las diferencias significativas ($p < 0,05$ con test de Student) con un *. Resultados: 3 cobayos fueron tratados con vehículo, 20, 40, 60, 80 y 100 ng/ml. No se demostraron cambios significativos en DPA30 (fase 2): 3,6(0,3); 2,6(0,5); 2,6(0,5); 4,1(0,5); 4,9(1) y 5,4(0,9). Para DPA90: 123,6(4,4); 124,9(3,8); *137,5(2,5); 136,2(6,5); 137(4,2); 124,4(5,9) y ADP30-90: 123,4(3,7); 122,9(5,6); 134,5(2,3); 132,4(6,8); 133(4,4); 118,9(6,8). La contractilidad fue 100; 102(4,5); 98,5(3,6); 93,2(4,3); *87,3(1,7) y *82,8(1,3)% respectivamente. Conclusiones: *In vitro*, el DPF no produjo cambios en la conductancia de IKr y fase 2 a las concentraciones de la forma libre que correlacionan con las dosis terapéuticas (hasta 200 mg EV día). La contractilidad se redujo a concentraciones de 80 y 100 ng/ml, muy superiores a las terapéuticas.

621. (250) DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN DE MIDAZOLAM PARA SER ADMINISTRADA POR VÍA INTRANASAL: EVALUACIÓN DE NIVELES PLASMÁTICOS Y EFECTO EN UN MODELO DE EPILEPSIA EN RATAS.

Kravetz, María Cecilia¹; Kriebaum, Martín²; Pacha, María Sol²; Lagger, Ignacio⁴; Escalier Patzi, Juan²; Otamendi, Esteban¹; Lazarowski, Alberto⁵; Buontempo, Fabián^{6,7}; Garnabeu, Ezequiel⁷; Moretton, Marcela A.^{7,8}; Chiappetta, Diego A.^{7,8}; Martínez, Oscar A.^{2,3}; Bramuglia, Guillermo^{1,9}
 Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Departamento de Neurología, Hospital de Clínicas José de San Martín² Servicio de Neurología, Hospital Británico³ Servicio de Neurología, Hospital Español⁴ Departamento de Hematología, Hospital de Clínicas José de San Martín⁵ Servicio de Farmacia, Hospital de Pediatría Garrahan⁶ Cátedra de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁷ Tecnología Farmacéutica, CONICET⁸ Fundación Investigar⁹

Introducción: La administración de Midazolam (MDZ) intranasal (IN) sería una alternativa rápida y eficaz para el tratamiento de pacientes en crisis convulsivas pero esta formulación no está disponible en Argentina. El desarrollo de una formulación líquida para la administración por vía IN que presente una alta biodisponibilidad permitiría alcanzar niveles potencialmente terapéuticos. Objetivo: Evaluar los niveles plasmáticos y la respuesta electroencefalográfica (EEG) de MDZ luego de la administración intranasal de una formulación líquida en ratas. Métodos: Se utilizaron ratas Sprague Dowley machos que recibieron una dosis de 2,5 mg/Kg de una formulación MDZ 5% p/v por vía IN mediante una sonda abocath 24G. La farmacocinética de MDZ se estudió en muestras de sangre a los 5 minutos, 15, 30 y 90 minutos después de la administración. En otro grupo se indujo un modelo de epilepsia de lóbulo frontal con pilocarpina (400mg/kg intraperitoneal). Se registraron las variaciones de patrones de ondas por medio de electroencefalograma (EEG). Se obtuvieron muestras de sangre inmediatamente después de observar variaciones en el EEG posterior a la administración de MDZ. Los niveles plasmáticos de MDZ se cuantificaron utilizando una técnica de HPLC. Resultados: La concentración media de MDZ 5 minutos después de la administración IN fue de 16,4 µg/ml (SD: 7,1 µg/ml). Niveles cuantificables de MDZ se encontraron a los 90 min (0,30±0,024 µg/mL). MDZ IN produjo una disminución en la actividad epileptiforme en el EEG que se asoció con una concentración de 24,9±1,6 µg/mL. Conclusión: Los niveles de MDZ cuantificados son comparables con los observados en trabajos previos luego de la administración intravenosa en ratas. La dosis utilizada (2,5mg/Kg) demostró ser efectiva en disminuir la actividad eléctrica tipo Status Epiléptico en el modelo experimental. Los resultados sugieren que la administración IN de MDZ permitiría una rápida absorción del mismo y de fácil acceso en crisis convulsivas.

622. (490) EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NUEVOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD ATPASA DE HSP90 SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA.

Mazaira, Gisela L.¹; De Leo, Sonia A.¹; Camisay, María F.¹; Federicci, Fernando¹; Galigniana, Mario D.^{1,2}
 Departamento de Química Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQIBICEN)-CONICET-UBA¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET²

Hsp90 es una chaperona molecular que estabiliza de manera ATP-dependiente la conformación activa a un gran número de proteínas con estructura terciaria estable. Varias de las proteínas "cliente" de la chaperona se relacionan con el desarrollo y la progresión tumoral, por lo que Hsp90 se ha convertido en un blanco atractivo para la terapia antitumoral. Numerosos inhibidores de su actividad ATPasa ya han sido analizados en ensayos preclínicos con diversos resultados, y otros tantos están siendo estudiados a fin de optimizar sus propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas. Como consecuencia de los análisis previos por modelado molecular que nos sugirieron a las bases de Schiff derivadas del 2,4-dihidroxibenzaldehído o del 5-cloro-2,4-dihidroxibenzaldehído como posibles inhibidores de Hsp90, se sintetizaron 47 compuestos nuevos. El objetivo de este trabajo es estudiar a los mismos como potenciales inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90, y evaluar su efecto sobre la viabilidad de células tumorales de cáncer de próstata (PC3 y C4-2B). En todos los ensayos utilizamos como control positivo a la ansamicina geldanamicina (GA), un conocido inhibidor de Hsp90. Encontramos una serie de 7 compuestos capaces de inhibir hasta el 50% de la viabilidad en células PC3 (S3, S7, S8, S17, S31, S42, S45), de los cuales solamente cuatro poseen un efecto inhibitorio sobre la actividad ATPasa de Hsp90 (S3, S17, S31, S42). Al ensayarlos en células C4-2B (a diferencia de las PC3, éstas expresan AR) encontramos que sólo S45 muestra un efecto citotóxico relevante, mientras que S3, S8, S31 y S42 son capaces de inhibir la capacidad migratoria. Nuestros resultados demuestran que, en contraste a lo aceptado en la literatura, no hay una correlación directa entre la capacidad de una droga dada para inhibir la actividad ATPasa de Hsp90 y su efecto citotóxico o de migración. A su vez, proveen elementos para la modificación de las moléculas a fin de transformarlas en más activas.

623. (507) OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE GRK2

Echeverría, Emiliana¹; Juritz, Ezequiel²; Monczor, Federico¹; Shayo, Carina³; Davio, Carlos¹; Lorenzano-Menna, Pablo²; Fernández, Natalia¹
 Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes² Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET³

Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) representan la familia más grande de receptores de membrana, involucrados en la transducción de señales celulares. Dada su importancia como agentes etiológicos de diversas enfermedades, las proteínas accesorias pertenecientes a las vías de señalización de los mismos son consideradas potenciales blancos terapéuticos. En este sentido, las quinasas de GPCRs (GRKs), responsables de la desensibilización de tipo homóloga de GPCRs ejercen su efecto mediante la fosforilación de los GPCRs así como también a través del dominio homólogo a RGS que puede unirse directamente a la proteína G causando su inactivación. El objetivo del presente trabajo es la identificación y evaluación de potenciales compuestos inhibidores de la actividad RGS de GRK2. Para ello realizamos un screening virtual de 300.000 moléculas pequeñas pertenecientes a la librería Advance Collection (ENAMINE) utilizando el AutoDock Vina y el PDB ID 2BCJ de GRK2 como blanco molecular. En base a la energía de docking calculada por el programa seleccionamos 13 compuestos. Como modelo para evaluar la inhibición de la actividad RGS utilizamos clones estables de células HEK co-transfectadas con GRK2 y el receptor H2 a histamina (rH2), cuya

respuesta de AMPc se encuentra regulada por el dominio RGS de GRK2. En este sistema observamos que 3 de los compuestos potenciaron significativamente la respuesta de AMPc del rH2 frente al tratamiento con su agonista amantadina, indicando una menor desensibilización de los rH2. Como control, los mismos ensayos se realizaron en clones que expresan la construcción GRK2D110A, carente de actividad RGS, donde los compuestos fueron inactivos. Dichos inhibidores constituyen compuestos promisorios para el tratamiento de patologías como hipertensión y falla cardíaca congestiva donde GRK2 juega un papel primordial.

624. (554) FARMACOGENÉTICA DE LA ANTICOAGULACIÓN ORAL POR ACENOCUMAROL. EXPLORACIÓN PRELIMINAR DE RESULTADOS

Vázquez, Carolina¹; Scibona, Paula²; Otero, Victoria²; Simonovich, Ventura A.¹; Viñuales, Estela S.²; Penschasky, Diana L.²; Arbelbide, Jorge A.²; Belloso, Waldo H.¹

Sección Farmacología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires¹ Sección Hematología, Hospital Italiano de Buenos Aires² Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME)³

Introducción: los anticoagulantes orales (ACO) son un grupo farmacológico de estrecho rango terapéutico y amplio uso. El riesgo de ineficacia/toxicidad determina el control estricto de la dosis a través de la Razón Internacional Normalizada (RIN) con un protocolo de ajuste posterior a la administración. Existe evidencia para la utilización de análisis farmacogenético (FG) en la adecuación terapéutica de la dosis inicial de warfarina. El acenocumarol, el ACO más utilizado en nuestro medio, comparte la vía metabólica (CYP2C9) y el blanco de acción (VKORC) con la warfarina, aunque la experiencia de su uso guiado por genotipo es escasa. Objetivo: determinar la asociación entre la alocaación de genotipos para CYP2C9/VKORC en pacientes anticoagulados con acenocumarol y RIN estable en 3 rangos de dosis. Métodos: estudio de corte transversal (N:100). Se incluyen pacientes anticoagulados con acenocumarol con dosis estable (últimos 3 RIN en rango). Se registran variables demográficas, comorbilidades, medicación concomitante, complicaciones/interrupciones del tratamiento. Según dosis de ACO se estratifica en dosis alta (Ad): >27 mg/sem, intermedia (Id): 27-7,1 mg/sem, baja (Bd): ≤ 7 mg/sem. Se procede a genotipificación para CYP2C9 (1/1 normal, 1/2 y 1/3 expresión intermedia, 2/3 y 2/2 y 3/3 baja expresión) y VKORC (haplotipo A > susceptibilidad a ACO, haplotipo No A normal) a través de técnicas de PCR/RFLP. Resultados: 45 pacientes enrolados y genotipificados, edad: 73,4±11,9, 51,1% ♂. Motivo de ACO: Fibrilación Auricular: 66,7%, Trombosis Venosa Profunda: 8,9%, Embolismo de Pulmón:13,3%, otro:11,1%. Grupos: Bd:11,1%, Id: 82,2%, Ad:6,7%. Genotipos: CYP2C9: expresión normal en Ad:10,7%, Id:57,1%, Bd:32,1%. Expresión intermedia en: Ad:0%, Id:46,2%, Bd:53,8%. Baja expresión en: Ad:0%, Id:0%, Bd:100% (p:0,34), VKORC:11% de prevalencia de Haplotipo A: Ad:0%, Id:20%,Bd:80%. (p:0,2). Conclusión: se observa tendencia a encontrar una alocaación preferencial de genotipos de baja expresión/alta susceptibilidad en el rango de baja dosis.

625. (571) ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE COMPLEJOS POLIMÉRICOS DE DERMATÁN SULFATO Y QUITOSANO CON EL ENDOTELIO VASCULAR

Rasente, Rita Yanina¹; Imperiale, Julieta²; Lázaro-Martínez, Juan Manuel³; Sosnik, Alejandro²; Calabrese, Graciela¹ 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 Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³

Estudios previos han reportado el empleo de nanopartículas (NPs) de dermatán sulfato (DS) como estrategia para el tratamiento de la patología vascular. El remodelado de la matriz extracelular vascular durante la injuria vascular podría beneficiar la interacción

de este tipo de NPs con el endotelio. Nuestro objetivo fue estudiar la respuesta del endotelio microvascular frente a NPs de DS/Quitosano (QT). Las NPs fueron obtenidas a partir de DS (5 kDa, Syntex, Arg.) y QT de bajo peso molecular, con o sin FITC (Sigma). La caracterización de las NPs se abordó a través de diferentes metodologías: (i) difracción dinámica de la luz (DLS, Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments,UK) para la medida del diámetro hidrodinámico promedio, la distribución de tamaños y el potencial Z; (ii) el método del indol/HCl para evaluar la concentración de DS; y (iii) estudios por Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido (ss-RMN). Células microvasculares murinas (H5V) fueron utilizadas para evaluar: 1) la arquitectura celular luego de 24 h de incubación con las NPs; 2) la activación de las metaloproteinasas (MMPs), y 3) la interacción de NPs-FITC con el endotelio, luego de 1, 3 y 24 h de incubación. Los estudios de resonancia obtenidos para las NPs muestran que no son el resultado de una mezcla física de sus componentes. Las NPs-FITC mostraron un diámetro de 701,4 ± 51 nm y distribución de tamaños comparables a los de las NPs sin marcar. Todo el DS utilizado para la obtención forma parte de las NPs. La interacción con las células aumenta entre los tiempos de 1h y 3h, pero no se detecta luego de 24 h, observándose a este tiempo un cambio en el citoesqueleto de actina. La actividad de las MMPs no muestra cambios significativos para las células tratadas con respecto al control. Nuestros resultados sugieren que estos complejos de polielectrolitos forman un nuevo sistema nanoestructurado que posee la capacidad de interactuar con el endotelio microvascular en cultivo.

626. (618) DESARROLLO DE UN ENSAYO UTILIZANDO CITOMETRÍA DE FLUJO PARA TESTEAR EN SIMULTÁNEO LA ACTIVIDAD Y SELECTIVIDAD DE COMPUESTOS CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI*.

Miranda, Cristian G¹; Solana, María E¹; Pino Martínez, Agustina M¹; Curto, María A²; Lammel, Estela¹; Schijman, Alejandro G²; Alba Soto, Catalina D¹

Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPAM)¹ Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)-CONICET²

El tratamiento actual de la enfermedad de Chagas se basa en la administración de dos compuestos: benznidazol y nifurtimox. Estas drogas presentan una eficacia del 80% sólo cuando son utilizadas en la etapa aguda de la infección. Además, presentan efectos secundarios que a veces requieren de la interrupción del tratamiento. Para el desarrollo de terapias más efectivas y seguras es necesario implementar métodos para evaluar potenciales drogas en los estadios parasitarios relevantes en la infección humana. Desarrollamos una cepa transgénica de *T. cruzi* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) transfectando con el vector integrativo pTREXgfp la cepa de *T. cruzi* K98 perteneciente al linaje TcI. Verificamos que el parásito transgénico K98GFP es fluorescente en los estadios epimastigote, tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo y amastigote intracelular. La expresión de GFP es estable (alrededor del 80%) en todos los estadios *in vitro* y en el modelo murino, en ausencia de drogas de selección. Además, comprobamos que conserva las características biológicas de la cepa nativa. Con ella desarrollamos un ensayo *in vitro* basado en citometría de flujo para evaluar simultáneamente la actividad amastigotocida y el índice de selectividad de compuestos. En el ensayo infectamos la línea celular J774 con tripomastigotes sanguíneos de K98-GFP en una MOI 5:1 en placas de 96 pocillos por triplicado. Luego de 4 h de cultivo a 37°C en CO₂, se eliminaron los parásitos que no ingresaron a las células y se inició la administración diaria de los fármacos. Al cabo de 72 hs de cultivo a las células cosechadas se las tiñó con ioduro de propidio y se las adquirió en citómetro de flujo analizando la presencia de eventos en los canales FL1 y FL2. Estos ensayos permitirán el tamizaje *in vitro* de un mayor número de fármacos y proporcionarán una herramienta rápida y precisa que agilizará su evaluación en modelos *in vivo* y posteriormente en ensayos clínicos.

627. (767) COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN PAPAS ANDINAS E INDUSTRIALES: SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* ATCC 29522

Damiano, Rocio Belén³; Lavayén, Silvina²; Zotta, Claudio Marcelo²; Uez, Osvaldo²; Andreu, Adriana Balbina¹; Lanteri, María Luciana¹

Instituto de Investigaciones Biológicas¹ Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan H. Jara² Carrera de Bioquímica, Universidad Nacional de Mar del Plata³

La papa (*Solanum tuberosum*), posee sustancias beneficiosas para la salud como los polifenoles (ácido clorogénico, flavan-3-oles y antocianinas). Cepas patógenas de *Escherichia coli* pueden producir enteropatías y Síndrome Urémico Hemolítico. Se determinó la actividad antimicrobiana de extractos polifenólicos de dos variedades de papas andinas (CL658 y CCS1307) y una industrial (Summerside) frente a la cepa *E. coli* ATCC 29522. Los polifenoles de los extractos se cuantificaron espectrofotométricamente (reacción de Folin-Ciocalteu). Se cuantificaron por DAD-HPLC los ácidos clorogénico, cafeico, cumárico y ferúlico. La actividad antimicrobiana se estudió por el método de dilución en caldo, seguida de observación de la turbidez o recuento de colonias en agar. Los extractos de piel de CL658 poseen la mayor concentración de ácidos fenólicos, seguidos por los extractos de piel de Summerside y de pulpa de CCS1307 (390, 138 y 101 µg ácido clorogénico equivalentes/g PF respectivamente). El ácido clorogénico es el ácido fenólico mayoritario en todos los extractos (78,8% a 92,5%), y son minoritarios los ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico (0,4% a 11,6%). La piel de CL658 es la de mayor contenido de ácido clorogénico relativo, mientras que el ácido cumárico y el ácido cafeico representan más del 10% en piel de Summerside y en pulpa de CCS1307. Extractos de piel de CL658 (alto contenido de antocianinas) mostraron actividad bacteriostática frente a *E. coli* ATCC 29522 (Concentración Inhibitoria Mínima de 256 µg/ml ácido clorogénico equivalentes). Los extractos de piel de Summerside (bajo contenido de antocianinas) y de pulpa de CCS1307 (ausencia de antocianinas), resultaron bactericidas. La actividad bactericida se halló en extractos de menor contenido relativo de ácido clorogénico y mayor contenido relativo de ácido cumárico o cafeico. Podría relacionarse la ausencia de actividad bactericida de la variedad CL658 con su alto contenido de antocianinas.

628. (771) GLICANOS MULTIVALENTES E HIDROLÍTICAMENTE ESTABLES COMO INHIBIDORES DE GALECTINA-1 Y GALECTINA-3

Cutine, Anabela María¹; Cagnoni, Alejandro Javier¹; Cano, María Emilia²; Croci, Diego¹; Kovensky, José³; Uhrig, María Laura²; Rabinovich, Gabriel Adrián¹; Mariño, Karina Valeria¹ Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME)-CONICET¹ Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR)-CONICET-FCEN-UBA² Université de Picardie Jules Verne, Amiens, Francia.³

Las galectinas son una familia de proteínas solubles con un dominio de reconocimiento de hidratos de carbono evolutivamente conservado. Las mismas presentan afinidad por residuos de *N*-acetilglucosamina presentes en distintos tipos de glicocojugados, y ejercen roles esenciales en procesos de inmunoregulación. Mientras Galectina-1 (Gal-1) promueve la apoptosis de linfocitos T y la progresión tumoral mediante mecanismos que generan escape tumoral, angiogénesis y metástasis, Galectina-3 (Gal-3) está implicada en una variedad de procesos biológicos que incluyen inflamación, migración de células tumorales e interacciones huésped-patógeno. Por lo tanto, el diseño de inhibidores específicos para estas galectinas podría ser útil en el desarrollo de estrategias terapéuticas para diversos desórdenes inmunológicos. La baja afinidad natural de las lectinas por su ligando específico, con constantes de afinidad del orden milimolar, limita el desarrollo de glicósidos sintéticos para su inhibición. Sin embargo, el "efecto cluster glicosídico", observado en los glicanos de la superficie celular, demuestra que el aumento en el número de las interacciones lectina-glicano compensa esa baja afinidad. En consecuencia, nuevos glicocojugados sintéticos multivalentes que interfieran en

el reconocimiento lectina-azúcar podrían ser potenciales agentes quimioterapéuticos. En este trabajo, y a partir de un ensayo en fase sólida específico, se estudió la actividad inhibitoria de ligandos multivalentes con residuos de *N*- y *S*-β-galactosa sobre Gal-1 y Gal-3 humanas. Se demostró que un aumento en la valencia de estos glicocojugados aumenta la afinidad por las correspondientes Galectinas, llevando la concentración inhibitoria media (IC₅₀) al orden micromolar. Estos inhibidores multivalentes, resistentes además a la hidrólisis enzimática, son prometedores agentes terapéuticos en procesos biológicos mediados por galectinas.

629. (778) ACTIVIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PASSIFLORA CAERULEA SOBRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL

Anzoise, María L¹; Marrasini, Carla²; Bach, Hernán³; Gorzalczy, Susana¹

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³

La enfermedad inflamatoria intestinal, comprendida principalmente por la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa, consiste en una inflamación gastrointestinal crónica e idiopática caracterizada por la ulceración de la mucosa. Actualmente, no existe un tratamiento que permita obtener una respuesta totalmente satisfactoria para los pacientes. Extractos de plantas medicinales o compuestos aislados de las mismas pueden ofrecer alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad del extracto etanólico de *Passiflora caerulea* L. (Pc) sobre el tracto gastrointestinal en un modelo de colitis inducida por Ácido acético en ratas. También, se evaluó la actividad antidiarreica en un modelo de diarrea inducida por aceite de ricino en ratones, y le efecto espasmolítico en yeyuno aislado de rata. El extracto (250 mg/kg vía oral, vo y 4% vía intracolónica, ic) redujo significativamente el peso del colon (colitis+: 545,2±3,6 mg; Pc 250 mg/kg: 391,2±28,9 mg; Pc ic: 406,6±66,7 mg) , el score del daño (colitis+: 3,2±0,2; Pc 250 mg/kg: 2,0±0,6; Pc ic: 1,6±0,24), el nivel de TBARs (colitis+: 5,27±0,94; Pc 250 mg/kg: 2,41±0,49; Pc ic: 2,94±0,82) y la mieloperoxidasa en colon (colitis+: 1,39±0,40 DO/mg; Pc 250 mg/kg: 0,53±0,16 DO/mg; Pc ic: 0,62±0,09 DO/mg) . Además, se observó una reversión parcial de los daños histológicos inducidos por el acético. El extracto (125, 250 mg/kg,vo) redujo significativamente el número de heces diarreicas y disminuyó de manera concentración-dependiente, el efecto máximo de las curvas acumulativas inducidas por acetilcolina (Emáx 3 mg/ml: 79,1%; Emáx 1 mg/ml: 65,8%; Emáx 0,3 mg/ml: 42,6%) y CaCl₂ (Emáx 3 mg/ml: 75,9%; Emáx 1 mg/ml: 53,48%; Emáx 0,3 mg/ml: 53,2%), en yeyuno aislado de rata. En conclusión, *P. caerulea*, mostró un efecto antiinflamatorio, antidiarreico y antiespasmódico en los modelos experimentales empleados.

630. (803) HALLAZGOS DE INSPECCIONES DE BUENAS PRÁCTICAS CLÍNICAS EN LA ARGENTINA DESDE LA APLICACIÓN DE LA DISPOSICIÓN A.N.M.A.T. 6677/10

Rey Funes, Manuel¹; Uran, Soledad²; Benítez, Alexis²; Amato, Florencia²; Kataife, Fanny²; Fernández, Juan Carlos² Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹ Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica²

Introducción: La investigación clínica farmacológica en la Argentina se encuentra regulada por el "Régimen de Buena Práctica Clínica para Estudios de Farmacología Clínica", Disposición A.N.M.A.T. 6677/10. Esta Disposición fue puesta en función en noviembre de 2010, siendo las inspecciones en Buenas Prácticas Clínicas (BPC) una herramienta de fiscalización y control de su cumplimiento. Objetivo: Describir los hallazgos detectados en las inspecciones de BPC desde enero de 2011 a julio de 2014. Material y método: Se revisaron todas las inspecciones entre enero de 2011 y julio de 2014, discriminando por territorio, fase de la

investigación y hallazgos. Los hallazgos se dividieron en documentación del estudio y regulatoria (DER), consentimientos informados (CI), registros clínicos (RC) y circuito de la molécula en estudio y su comparador (CD). Las inspecciones se calificaron acorde a la normativa y se cuantificaron las indicaciones de acción voluntaria (IAV) y de acción oficial (IAO). Resultados: Se realizaron en total 109 inspecciones. En CABA 87, en la Provincia de Buenos Aires 14, y en el resto del país 8. Se contabilizaron 97 estudios de fase III y 12 de fase II. La frecuencia de hallazgos fue de 30% en RC, 24% en CI y DER, y 22% en el CD. Las IAV fueron del 58% y las IAO de 42%. No hubo inspecciones con calificación de ninguna acción indicada (NAI). Los ensayos clínicos inspeccionados presentaron hallazgos en los cuatro tópicos de las inspecciones de BPC. Conclusión: Los equipos de investigación deben entrenarse en la normativa local y en las buenas prácticas, como herramienta para mejorar la calidad de los ensayos clínicos farmacológicos y afrontar las inspecciones de BPC.

631. (805) TÉCNICA DE SEDACIÓN CONSCIENTE CON MIDAZOLAM POR VÍA ORAL PARA EL TRATAMIENTO ODONTOLÓGICO EN PACIENTES ADULTOS CON SÍNDROME DE DOWN

Ferrari, Teresita¹; Armada, Mariana¹; Calvano, Cristina¹; Echaide, Maite¹; Acuña, Julián¹; Chapartegui, Rosaura¹; Scagnet, Gabriela¹; Binicki, Román¹; Orman, Betina²
Cátedra de Patología y Clínica Buco-dental. Universidad de Buenos Aires¹ Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²

El síndrome de Down (SD) es una condición genética causante de la mayoría de los casos de retraso mental en Occidente. Presenta alteraciones sistémicas como así trastornos en la conducta (TC) cuya prevalencia es del 8-12%, mayor que el 3-4% de la población general. Situación que complejiza el abordaje odontológico. La técnica de sedación consciente (SC) con midazolam (M) intravenoso ha sido utilizada con éxito en pacientes (P) niños y adultos con SD. El objetivo de este estudio fue evaluar la técnica de SC con midazolam por vía oral en P adultos con SD asociado con TC. Materiales y Métodos: se seleccionaron 24 P adultos con SD de 20 a 36 años de edad, ASA II y conducta negativa (Escala de Frankl). Se dividieron en tres grupos de acuerdo a la dosis de M administrada, A: 7,5 mg, (7 P); B: 15 mg (8 P) y C: 30mg (9 P). Se observó el nivel de sedación con la escala de Houpt (EH), y se monitorizaron los signos vitales durante todo el tratamiento odontológico (TO). Resultados: de acuerdo a la evaluación total del procedimiento (EH) el 100% de los P del grupo A presentaron un valor de 1, los del grupo B, el 25% mostró un valor de 3, el 50% 4 y el 25% restante 5, mientras que el 100% del grupo C tuvieron un tratamiento exitoso con un valor de 6. Los valores de los signos vitales no presentaron diferencias entre los grupos y se encontraron dentro de los parámetros clínicos normales. No se evidenciaron efectos adversos. Conclusión: Los P con SD presentan una mayor prevalencia de patología buco-dental que suele acompañarse con TC. De acuerdo a la EH, no se logró el efecto de sedación con la dosis de 7,5mg; con 15 mg su resultado fue dispar, permitiendo en algunos casos el abordaje del TO mientras que en otros no. El efecto sedativo con 30 mg permitió en la totalidad de los pacientes la realización del TO con adecuados efectos ansiolíticos, pudiendo ser utilizada como una alternativa efectiva para el control de conductas negativas durante el TO en pacientes adultos con SD.

ONCOLOGÍA 4

632. (602) EL EXTRACTO PRO4X DEL HONGO JAPONÉS MAITAKE INHIBE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PTEN, SPARC Y ABCG2, CARACTERÍSTICOS DEL FENOTIPO TUMORAL MAMARIO EN RATONES BALB/C.

Brie, Belén; Roldán Deamicis, Agustina; Aguilera Braico, Diego; Santa Coloma, Tomás; Balogh, Gabriela A.
Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-CONICET-UCA, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina.

Dadas las limitaciones de las terapias convencionales para reducir la tasa de mortalidad por cáncer, muchos esfuerzos se focalizan en la prevención de la carcinogénesis mediante el uso de distintos compuestos naturales. En este sentido, los β -glucanos de Maitake (Fracción D) poseen la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral. En este trabajo estudiamos los efectos preventivos del Maitake Pro4X (Fracción D) sobre la tumorigénesis mamaria empleando ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de vida. Dividimos los ratones en 3 grupos de 5 ratones cada uno, grupo Control sin tratar con Maitake, Grupo Maitake Pro4X administrado oral y Maitake Pro4X intraperitoneal ambos a una dosis de 10mg/ml. Luego de 3 semanas consecutivas de tratamiento, se indujo la tumorigénesis mamaria por inyección intraperitoneal de 4×10^5 células LM3 tumorales murinas. Posteriormente determinamos el desarrollo tumoral mamario, la sobrevida y la mortalidad semanalmente hasta los 30 días posteriores a la inducción tumoral. Se sacrificaron los animales y se extrajo el tejido mamario, se aisló el ARN total y se realizaron estudios de expresión génica. Hallamos que Maitake Pro4X reduce significativamente la expresión de los genes SPARC, PTEN y ABCG2 en los tejidos mamaros resistentes a la tumorigénesis y no modifica la expresión de los genes CUL3 e IGFBR5. Además demostramos que SPARC, PTEN y ABCG2 no están expresadas o su expresión es muy tenue en los tejidos mamaros normales. En este experimento hallamos que Maitake Pro4X previene la carcinogénesis mamaria en un 40%, administrado oral e intraperitonealmente y además observamos que reduce la mortalidad hasta un 60% con respecto al grupo control. En conclusión, estos datos sugieren que posiblemente el mecanismo molecular por el cual Maitake PRO4X previene la tumorigénesis mamaria es dependiente de la regulación de la expresión de los genes SPARC, PTEN y ABCG2. Agradecimientos: Subsidio CONICET (PIP 2011-2013) a GAB y subsidio Institucional UCA a TASC.

633. (608) EL SISTEMA NOTCH EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL DE UNA LÍNEA TUMORAL OVÁRICA HUMANA

Pazos Maidana, María Camila; Abramovich, Dalhia; Tesone, Marta; *Irusta, Griselda*
Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Durante el proceso de Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) las células epiteliales sufren cambios morfológicos característicos hacia un fenotipo fibroblástico llevando a un aumento en la movilidad e invasión de las células tumorales. El sistema Notch determina la proliferación, diferenciación y apoptosis en mamíferos. El objetivo de este trabajo es estudiar el rol del camino de señalización Notch durante la EMT en una línea celular de carcinoma ovárico epitelial (SKOV3). Metodología: células SKOV3 fueron incubadas en presencia de TGF- β 1 para inducir la EMT. Además, las células se incubaron en presencia de un inhibidor de la vía de Notch (DAPT 20 μ M) o en presencia de ambos estímulos (TGF- β 1+DAPT). Se estudió: a. morfología celular; b. polimerización de actina; c. expresión de marcador epitelial y mesenquimal y d. migración celular. Se observó que las células adquirieron una morfología típicamente fibroblástica en presencia de TGF- β 1 (10 ng/ml, 72 hs) comparadas al control (ausencia de estímulo). En cuanto a los cambios en el citoesqueleto, TGF- β 1 produjo cambios mostrando una activa polimerización de la actina. Se observó un aumento en la expresión de la N-caderina (mesenquimal) y aumento en la migración celular; y una disminución en la proteína E-caderina (epitelial) en presencia de TGF- β 1. La inhibición del sistema Notch no produjo cambios sobre estos parámetros, pero la incubación con DAPT impidió los cambios observados con TGF- β 1. Concluimos que la inhibición del sistema Notch podría ser una potencial estrategia para impedir la diseminación tumoral en cáncer de ovario tumoral.

634. (610) UTILIZACIÓN DE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO ASOCIADOS A CADE/CDH1

Besso, María José¹; Abascal, María Florencia¹; Aparicio, Evangelina¹; Rosso, Marina¹; Mencucci, María Victoria¹; Furlong, Laura Inés²; Vázquez-Levin, Mónica Hebe¹
*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET*¹; *Research Programme on Biomedical Informatics (GRIB), Hospital del Mar Medical Research Institute, España*²

INTRODUCCIÓN: Cadherina Epitealial (CadE/CDH1) es una proteína clave en las uniones adherentes y la señalización intracelular. Una disminución/ausencia de su expresión se asocia a cambios en la expresión génica y a la progresión tumoral y metástasis. En el cáncer de endometrio (CE) la expresión de CadE/CDH1 está alterada, pero los genes/proteínas asociados no han sido identificados. En años recientes ha cobrado importancia el uso de herramientas bioinformáticas basadas en evidencias experimentales de interacciones intermoleculares para identificar conjuntos de biomarcadores de las enfermedades. Usando herramientas de minería de textos/datos nuestro grupo identificó un "set" de genes para CE entre los que se encontró a CadE/CDH1 (Besso et al, SAIC 2013). **Objetivo:** Hacer un análisis bioinformático de interacción física/funcional entre proteínas e identificar las asociadas a CadE/CDH1 en CE. **Metodología:** Se usaron las herramientas HIPPIE (integra datos experimentales de interacción proteína-proteína de bases de datos públicas) y Cytoscape (aplicación Clust&See) para construir una red de interacción física y funcional de los genes asociados a CE. Se usó el sistema PANTHER para identificar procesos biológicos característicos de las proteínas de interés. **Resultados:** Se obtuvo una red de interacción proteína-proteína asociada al CE de 1371 nodos, incluyendo a CadE/CDH1. La red se organizó en 18 "clusters" funcionales, siendo CadE/CDH1 un nodo central del "cluster" enriquecido en comunicación celular, proliferación celular y procesos metabólicos. CadE/CDH1 interactuó con 125 nodos, 45 de los cuales la vincularon a genes asociados al CE y se encuentran en estudio en modelos in vitro. **Conclusiones:** El análisis in silico de interacciones físicas/funcionales permitió identificar potenciales biomarcadores del CE asociados a CadE/CDH1. Los estudios permitirán identificar una firma molecular del CE, que contribuirá a las estrategias actuales de diagnóstico.

635. (613) SÍNDROME DEL CARCINOMA BASOCELULAR NEVOIDE (SCBCN): PERFIL DE MUTACIONES EN PTCH1 Y EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA VÍA HEDGEHOG

Martínez, María Florencia¹; Mazzuocolo, Luis Daniel²; Panelo, Laura³; González, Abel⁴; Rubio, María Fernanda⁵; Muchnik, Carolina¹; Stengel, Fernando²; Azurmendi, Pablo Javier¹
*Riñón Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM), Universidad de Buenos Aires*¹; *CE-MIC*²; *Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM)-CONICET*³; *Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires*⁴

El SCBCN es un desorden autosómico dominante debido principalmente a mutaciones en patched1 (PTCH1). En estudios previos demostramos que el 50% de nuestra población presenta mutaciones germinales en dicho gen y la mitad de ellos muestra una mutación somática - modelo del two-hit- en carcinomas basocelulares (CBCs). Sin embargo, poco se conoce del efecto que las mutaciones en PTCH1 ejercen sobre la expresión de los genes involucrados en la vía Hedgehog. Nuestro objetivo fue estudiar por PCR en tiempo real los niveles de ARNm de los genes PTCH1, smoothened (SMO), glioma-associated oncogene 3 (GLI3) y ciclina D1 (CYD1) - con GAPDH como gen de referencia - en tejido epitelial de 3 controles sanos (TS), y CBCs y tejido normal circundante (TNC) de 20 pacientes considerando el perfil de mutaciones en PTCH1. Los niveles de PTCH1, SMO y GLI3 fueron mayores en CBCs (186±39, 1305±436 y 20±5) que en TNC y TS (p<0,01 en todos los casos), siendo los niveles en TNC (12±2, 278±72 y 2±1) también mayores que en TS (1±1, 3±2 y no detectable, p<0,05; respectivamente). A su vez, CYD1 mostró

mayores niveles en TNC respecto de TS (4±1 vs 2±1, p<0,05). La presencia de la mutación germinal en PTCH1 aumentó los niveles de SMO y disminuyó los de PTCH1 y GLI3 en TNC (p<0,01). La conjunción de una mutación germinal y una somática en los CBCs aumentó los niveles de PTCH1, SMO, GLI3 (p<0,01) y disminuyó los de CYD1 (p<0,05). El aumento en la expresión de los genes involucrados en la vía, tanto en CBC como en TNC, evidencia una activación global de la misma en este síndrome. Además, se encontró un efecto aditivo del número de mutaciones en PTCH1, sugiriendo que el two-hit regularía la expresión génica. Finalmente, la búsqueda de mutaciones junto con el análisis del perfil de expresión génica amplía el conocimiento de la tumorigénesis y podría proveer nuevos blancos terapéuticos.

636. (622) EFECTOS OPUESTOS ENTRE MIEMBROS DE LA FAMILIA MAGE-I Y MAGE-II EN LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Laiseca, Julieta E; Ladelfa, M Fátima; Monte, Martín
Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

MAGE (Melanoma Antigen Genes) es una de las familias multi-génicas más grandes con expresión específica tumoral. Está dividida en dos grandes sub-familias: MAGE-I que agrupa a los MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C, que poseen un dominio común conservado: el Mage Homology Domain, caracterizadas por su expresión específica tumoral y alta conservación de secuencia y MAGE-II que agrupa al resto de los genes MAGE que poseen un MHD menos conservado y su expresión es ubicua (Sang et al, 2011). Debido a la alta homología entre estas proteínas, se infiere que sus funciones son redundantes, sin embargo han sido reportadas funciones específicas. Nosotros hemos reportado que MageA6 es capaz de colaborar con MageA11 en el aumento de la actividad transcripcional del Receptor de Andrógenos (AR), mediador del crecimiento del cáncer de próstata estimulado por hormonas, y que esto viene dado en parte, por la estabilización que genera la unión de MageA6 con MageA11 (SAIC 2013). En este trabajo analizamos los efectos de los MAGE-II en el sistema y observamos una acción antagonista entre estas dos subfamilias ya que MageD1, MageF1 y MageG1 disminuyen la actividad transcripcional de AR e inhiben el aumento de esta actividad dado por la coexpresión de MageA11 y MageA6 un 75%, 50% y 60% respectivamente. Además MageD1 no modifica la dinámica de traslocación al núcleo de AR pero sí es capaz coimmunoprecipitar con MageA6 y regular negativamente su estabilidad proteica en forma dosis dependiente. Hemos observado que, si bien los efectos de los MageA estudiados son específicos, los de los MAGE-II son más globales, observándose una regulación negativa de la expresión proteica en forma dosis dependiente. Concluimos que, estas dos subfamilias tendrían funciones opuestas en la vía estudiada, siendo MageD1, MageF1 y MageG1 inhibidores, cumpliendo roles más fisiológicos en células normales, mientras que MageA11 y MageA6 son colaboradores en la actividad transcripcional de AR y por ende en la progresión tumoral.

637. (623) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EZH2 MEDIADA POR PROGESTÁGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Cenciarini, Mauro E; Izzo, Franco; Schillaci, Roxana; Elizalde, Patricia; Proietti, Cecilia J
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

La progesterona y el receptor de progesterona (RP) poseen un rol crítico en la tumorigénesis de la glándula mamaria. EZH2 cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), promoviendo la represión transcripcional por compactación de la cromatina. Se ha descrito en un modelo murino que cuando aumentan los niveles de progesterona durante la preñez, aumentan también los niveles de expresión de EZH2, de su forma fosforilada

en Thr487 (pT487-EZH2) y de H3K27me3 globales en la glándula mamaria normal. En cáncer de mama, la sobreexpresión EZH2 está asociada al proceso de transformación, y a una mayor proliferación celular y agresividad tumoral. La hipótesis de este trabajo es que la activación del RP por progestágenos regula la actividad de EZH2, modulando la expresión de genes clave que están relacionados con el crecimiento tumoral. Los experimentos se realizaron en células de cáncer de mama humano T47D. Se analizaron los niveles de EZH2 y pT487EZH2 por western blot tras el tratamiento con el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA). Los resultados obtenidos muestran que el MPA induce un aumento transitorio de pT487-EZH2, modificación relacionada con un aumento de la actividad enzimática. Los niveles de EZH2 total permanecieron inalterados hasta las 48h de tratamiento, donde se observa una disminución de los mismos. Los efectos del MPA fueron bloqueados por el antagonista de progestágenos RU486. Exploramos el efecto de la actividad de EZH2 en la proliferación celular. Observamos que la transfección de una forma constitutivamente activa de EZH2 indujo un aumento significativo de la proliferación celular, mientras que la sobreexpresión de la forma salvaje no lo hizo. En conclusión, demostramos que la activación del RP por MPA promueve la inducción de pT487-EZH2, y que no es la sobreexpresión per se de EZH2, sino el aumento de su actividad, lo que promueve el aumento de la proliferación en células de cáncer de mama.

638. (624) ASOCIACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO VNTR DEL GEN RELOJ PER3 Y LAS ENFERMEDADES ONCOHEMATOLÓGICAS. IMPACTO EN EL DESCANSO DE LOS PACIENTES.

Cerliani, María Belén¹; Gili, Juan A.²; Klein, Graciela³; Orlando, Sergio³; Taus, Rosana³; Dalmaroni, Julieta³; Pérez, Mariel³; Saba, Silvia³; Chiesa, Juan José⁴; Richard, Silvina¹ Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)-CONICET, La Plata¹; Laboratorio de Epidemiología Genética, ECLAMC-CEMIC-CONICET²; Servicio de Hematología y Hemoterapia, UTMO Hospital Prof. Dr. Rodolfo Rossi, La Plata³ Laboratorio de Cronobiología, Universidad Nacional de Quilmes⁴.

Las variantes en genes del reloj circadiano o su desregulación pueden impactar en los procesos celulares relevantes en la carcinogénesis. Estudios poblacionales asociaron variantes en genes reloj con distintos tipos de cáncer. Se propuso que los genes PERIOD podrían funcionar como supresores de tumores. El gen PERIOD3 (PER3) posee un polimorfismo de longitud (VNTR, *Variable Number Tandem Repeats*), de 4 ó 5 repeticiones de 54 pb, donde la variante 5-rep agrega potenciales sitios de fosforilación. Por ello, el genotipo 5/5 sería más susceptible a cambios en el ritmo; pero los efectos funcionales del VNTR requieren más estudios. El objetivo del trabajo fue estudiar la asociación entre el VNTR de PER3 y las enfermedades onco-hematológicas, y analizar si esta variante tiene algún impacto en la funcionalidad del paciente. Para esto, se analizaron 270 controles y 106 casos, entre 16 y 89 años, concurrentes al Servicio de Hematología y Hemoterapia del Htal. Dr. Rossi. Se les tomaron muestras de sangre y se les realizó una encuesta, previo CI. Los genotipos de PER3 se determinaron por PCR y visualización en gel de agarosa, y los análisis estadísticos se realizaron con STATA 11.1. Los genotipos 4/5+5/5 mostraron asociación con la enfermedad (OR=1,63, IC 95% 1,00-2,67, p=0,05 ajustado por edad, sexo y nivel educativo); al igual que cambios en el humor durante los últimos 2 meses (OR=1,65, p=0,032, IC 95% 1,02-2,69). Sólo en los casos, los pacientes con los genotipos 4/5+5/5 mostraron cansancio físico al despertar en los últimos 2 meses (OR=2,82, p=0,02, IC 95% 1,13-7,02, ajustado por edad, sexo, nivel educativo y tiempo desde el diagnóstico), con respecto a los que poseen genotipo 4/4. No se encontraron asociaciones significativas entre el polimorfismo y las demás variables analizadas: problemas para conciliar el sueño, despertar muy temprano, cambios en el apetito, cansancio físico o mental durante el día, buena calidad de sueño, despertar por la noche y roncar.

639. (630) SPARC INDUCE LA EXPRESIÓN DE COX-2 Y LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS EN CÁNCER DE MAMA

Güttlein, Leandro¹; Spallanzani, Raúl Germán²; Benedetti, Lorena¹; Salvatierra, Edgardo¹; Rotondaro, Cecilia¹; Llera, Andrea¹; Zwirner, Norberto²; Podhajcer, Osvaldo¹ Fundación Instituto Leloir¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) -CONICET².

SPARC es una glicoproteína extracelular que se expresa en tejidos con alta tasa de remodelación, injuria y cáncer, regulando múltiples funciones celulares. En trabajos anteriores demostramos que su silenciamiento en la línea celular 4T1 de adenocarcinoma mamario murino, reduce el crecimiento tumoral e inhibe las metástasis pulmonares en ratones BALB/c además de disminuir la expresión de genes inflamatorios como IL-6 y COX-2 en el tumor primario. Se ha demostrado que estos genes median la expansión de células mieloides supresoras (MDSCs, Gr1⁺CD11b⁺) y que las mismas promueven la metástasis a través de la inmunosupresión y la formación de nichos pre-metastásicos. Nuestro objetivo es evaluar la contribución de SPARC expresado por el epitelio tumoral de cáncer de mama a la expansión de MDSCs así como identificar los mediadores moleculares de esta función. En primer lugar, comparamos el porcentaje de células Gr1⁺CD11b⁺ en ratones BALB/c portadores de tumores 4T1 parentales y con silenciamiento de SPARC mediante citometría de flujo. En segundo lugar, cuantificamos la expresión del ARNm de COX-2 en esferoides de líneas celulares 4T1 y MCF7 con diferentes niveles de SPARC mediante RT-qPCR. Comprobamos que los animales portadores de tumores 4T1 con silenciamiento de SPARC presentan menores porcentajes de MDSCs en bazo (6,9±3,2 vs. 25,3±2,0 p<0,001), en pulmón (0,7±0,2 vs. 6,2±0,9 p<0,001) y en médula ósea (48,0±6,4% vs. 62,1±5,3 ns). Por otra parte, determinamos que el silenciamiento de SPARC en 4T1 correlaciona con la disminución de la expresión de COX-2, mientras que la sobreexpresión y el agregado exógeno de SPARC en MCF7 y 4T1 aumentan la expresión de la enzima. En conjunto, nuestros resultados sugieren que SPARC expresado por las células malignas de cáncer de mama regula en forma autócrina los niveles de COX-2 y contribuye al aumento sistémico de MDSCs, generando así un ambiente favorable para el escape inmunológico del tumor.

640. (642) DESARROLLO DE UN MODELO DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO HORMONO-INDEPENDIENTE Y RESISTENTE A TAMOXIFENO, POR SOBREATIVACIÓN DE LA GTPASA RAC1

González, Nazareno; Cardama, Georgina A.; Alonso, Daniel F.; Gómez, Daniel E.; Lorenzano Menna, Pablo Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes

A pesar del éxito de los tratamientos hormonales disponibles para cáncer de mama, un porcentaje importante de los pacientes desarrollan mecanismos de resistencia, provocando la recurrencia de la enfermedad. Existen amplias evidencias que involucran a la GTPasa Rac1 en los fenómenos de transición de hormono-dependencia a hormono-independencia, repercutiendo en la pérdida de sensibilidad a los tratamientos hormonales. El objetivo central de este trabajo fue desarrollar un modelo de cáncer de mama humano hormono-independiente basado en la sobreactivación de la vía de Rac1. Este modelo permite evaluar el rol de Rac1 en los mecanismos moleculares involucrados en el fenómeno de resistencia adquirida a tratamientos anti-hormonales como Tamoxifeno. El modelo MCF7:C1199 se estableció sobreexpresando establemente una versión activa del activador tipo GEF, Tiam1, en la línea celular hormono-dependiente MCF7. MCF7:C1199 presentó un incremento en los niveles basales de Rac1 activo, mostró un aumento significativo en la migración celular (p<0,01) y una disminución del tiempo de duplicación lo cual demuestra un aumento de su capacidad proliferativa. El tratamiento de células MCF7: pCDNA con 17β-Estradiol provocó un incremento significativo de la proliferación mientras que las células MCF7:C1199 no fueron capaces de responder a dicho estímulo, mostrando un

crecimiento hormono-independiente. El tratamiento de la línea MCF7:C1199 con Tamoxifeno no provocó cambios significativos en la proliferación celular, a diferencia de las células MCF7: pCDNA que mostraron una inhibición concentración-dependiente. En este sentido, el establecimiento de un modelo de cáncer de mama hormono-independiente, por sobreactivación de la vía de Rac1, nos permitirá evaluar el impacto del tratamiento con inhibidores farmacológicos de Rac1 en combinación con tratamientos anti-hormonales, con el objetivo de revertir el fenotipo resistente y devolver la sensibilidad a dichos tratamientos.

641. (686) REGULACIÓN NEGATIVA DE C-MYC Y CYC-D1 MEDIADA POR LA INHIBICIÓN DE LA TELOMERASA POR AZT: IMPLICANCIA A NIVEL CELULAR EN EL MODELO DE CARCINOMA MAMARIO MURINO F3II.

Armando, Romina Gabriela; Mengual Gómez, Diego Luis; Alonso, Daniel Fernando; Gómez, Daniel Eduardo
Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes

La inmortalidad celular es una de las principales características del cáncer. Las células tumorales tienen un potencial replicativo ilimitado debido, en la mayoría de los casos, a la actividad de la telomerasa. Esta holoenzima mantiene la longitud de los telómeros a partir del agregado de repeticiones TTAGGG al extremo cromosómico. Además de esta actividad, la telomerasa presenta actividades extrateloméricas que promueven el desarrollo tumoral. En esta área se ha determinado que TERT, principal componente de la telomerasa, actúa como modulador transcripcional en diversas vías de señalización. En función de lo antes mencionado, y dado que nuestro grupo posee vasta experiencia en el estudio de la azidotimidina (AZT) como inhibidor de la actividad telomerasa, el presente trabajo pretende analizar el efecto del AZT sobre ciertas actividades extrateloméricas. Para esto se evaluaron genes modulados por la vía Wnt- β catenina, y procesos tales como migración, adhesión y ciclo celular en células de carcinoma mamario murino F3II. Los resultados obtenidos luego de 15 pasajes con AZT (600 μ M) corroboran el efecto sobre la actividad telomerasa. En torno a las actividades extrateloméricas, se determinó un descenso del 64% ($p < 0,05$) en la transcripción de c-Myc, un efecto similar sobre la transcripción de Cyc-D1 (38% $p < 0,05$), y en menor medida sobre la expresión de Tert (25% $p < 0,05$). Respecto al estudio de adhesión se pudo observar un descenso, pasaje dependiente, del 72% ($p < 0,05$) respecto al control. Paralelamente se evaluó el efecto sobre la migración, alcanzando una inhibición del 48% ($p < 0,05$). Por último, se estudió el efecto sobre ciclo celular, donde se pudo observar un aumento del 8% de fase S con una baja en G0/G1 en las células tratadas con AZT. Estos resultados nos permiten postular a dicha molécula no solo como un inhibidor de la actividad telomerasa, sino también, como un modulador de los procesos extrateloméricos estudiados.

642. (723) EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA IL δ EN EL CÁNCER DE TIROIDES

Rodríguez, Diego¹; Oglío, Romina¹; Salvarredi, Leonardo^{1,2}; Pisarev, Mario^{1,2}; Thomasz, Lisa^{1,2}; Juvenal, Guillermo¹
Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)¹ Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

Introducción: El yodo es utilizado por la glándula tiroidea para sintetizar hormonas tiroideas pero además cumple un rol regulador a través de la síntesis de lípidos iodados. De ellos se han identificado y caracterizado dos: la 6-iodo-11,14-eicosatrienoico- δ -lactona (IL- δ) y el 2-iodo-hexadecanal (2-IHDA). Estos iodo-lípidos reproducen algunos de los efectos inhibitorios del yodo e inhiben el crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo*. Objetivo: Estudiar el efecto antiproliferativo de la IL- δ sobre el cáncer de tiroides y la influencia del estado redox en este proceso. Metodología y Resultados: Células de cáncer de tiroides folicular (WRO) y papilar (TPC) fueron incubadas durante 72 hs con concentraciones crecientes de IL- δ . La IL- δ inhibió la proliferación celular en forma dosis dependiente, con una inhibición del 30% ($p < 0,01$) y 19% ($p < 0,01$) respectivamente a una concentración 10 μ M.

A continuación se estudiaron los niveles de las especies reactivas del oxígeno (EROs) por fluorescencia utilizando la sonda DCFH-DA. Observamos un incremento de 1,3 veces luego de 1 h de incubación con IL- δ ($p < 0,05$). A su vez se encontraron alteraciones en los niveles de ARNm de enzimas prooxidantes (DUOX1/2, NOX-4) y antioxidantes (SOD1-2, GPx-1, Catalasa). Para analizar la muerte celular programada se cuantificó la actividad de caspasa-3 y la expresión de AIF por western blot en la línea WRO. Observamos un incremento de 1,5 veces en la actividad de caspasa-3 ($p < 0,01$) y la expresión de AIF aumento 5 veces luego de 3 h de tratamiento con IL- δ . El tratamiento con TROLOX revirtió parcialmente el efecto proapoptótico de la IL- δ . Conclusiones: La IL- δ inhibe la proliferación celular e induce la muerte por apoptosis. Estos eventos serían parcialmente mediados por el aumento de las EROs.

643. (727) EXPRESIÓN DE CICLINA A Y SU RELACIÓN CON EL NIVEL DE PLOIDÍA EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS INDUCIDOS POR ACETATO DE MEDROXI-PROGESTERONA (MPA).

Bilinski, Melina Elena; Lanari, Claudia; Fabris, Victoria Teresa
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

La mayoría de los cánceres de mama son aneuploides, debido a errores durante la mitosis. El aumento en la expresión de ciertas ciclinas está relacionado con la amplificación de los centrosomas que determinarán los polos del huso mitótico. El estudio citogenético de los tumores mamarios del modelo murino de cáncer de mama inducidos por MPA reveló alteraciones en el cariotipo. El tumor hormono dependiente C4-HD y una variante hormono independiente (CC4-3-HI) mostraron cariotipos diploides ($2n=40$). Las otras variantes HI surgidas del mismo tumor HD presentaron números cromosómicos en el rango triploide a tetraploide. El objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles mecanismos involucrados en la aneuploidía en el modelo murino. Para ello se analizó el número de centrosomas y la expresión de ciclina A en el tumor C4-HD y en 4 variantes HI. Se estudiaron los centrosomas por inmunofluorescencia mediante la marcación con gamma-tubulina. No se observaron diferencias significativas en el número total de centrosomas por célula entre los tumores diploides y aneuploides (media entre 1,3-1,4 centrosomas/célula). Estos resultados no fueron los esperados, por lo cual se está estudiando actualmente si las células aneuploides podrían tener centrosomas de mayor tamaño. Asimismo se estudió la expresión de ciclina A por Western blot en extractos totales de los tumores. Sólo el tumor C4-2-HI presentó una sobreexpresión de la banda de 52 kDa de ciclina A (incremento de 14 veces la expresión en el tumor C4-2-HI vs. C4-HD, $p < 0,05$). Dado que el tumor C4-2-HI es a su vez el único que expresa resistencia constitutiva a anti-progestágenos, resulta interesante estudiar el rol de la ciclina A en este fenómeno. Los resultados sugieren que la sobreexpresión de ciclina A podría explicar el aumento de la ploidía sólo en uno de los tumores HI. Se están estudiando actualmente otras ciclinas que podrían estar involucradas en la aneuploidía en este modelo.

644. (729) EL PRETRATAMIENTO CON LIPOPOLISACÁRIDO EVITA LOS EFECTOS PROTUMORALES DE MACRÓFAGOS EN COCULTIVOS CON CÉLULAS TUMORALES PROSTÁTICAS

Quintar, Amado; Leimgruber, Carolina; Peinetti, Nahuel; Maldonado, Cristina
Centro de Microscopía Electrónica, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.

Los macrófagos (M Φ) representan una importante célula blanco en el estudio de microambiente tumoral y de la relación inflamación-cáncer. En modelos *in vivo*, observamos que los tumores prostáticos desarrollados en estromas con inflamación se acompañaban de M Φ con mayor actividad fagocítica, sugiriendo

un cambio en el perfil de estas células. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar *in vitro* el efecto de M Φ expuestos a un microambiente inflamatorio inducido por LPS sobre la tasa de proliferación y/o apoptosis de la línea tumoral prostática MatLu. Se utilizaron medios condicionados provenientes de M Φ de rata co-cultivados con células tumorales prostáticas en presencia o ausencia de LPS 1 μ g/ml por 24h, para estimular células MatLu durante 24h adicionales y se analizó el índice de proliferación por incorporación de BrdU y apoptosis por TUNEL y citometría de flujo de AnexinaV/7AAD. Si bien los sobrenadantes provenientes de M Φ tanto estimulados como sin estimular incrementaron la tasa de proliferación tumoral con respecto al basal, no exhibieron diferencias significativas entre ellos. Por el contrario, al tratar las células tumorales con medios condicionados de co-cultivos de M Φ /MatLu se observó la mayor tasa proliferativa ($p < 0,01$ vs. basal), indicando que las células tumorales "instruyen" a los M Φ para secretar factores protumorales. Para investigar si el pretratamiento de M Φ con LPS evita dicha instrucción, se estimularon con LPS 1 μ g/ml por 24h previa al cocultivo. Interesantemente, este protocolo disminuyó la proliferación celular de MatLu en ~40% ($p < 0,05$ vs M Φ sin LPS) e incrementó la apoptosis. Estos resultados indican que estímulos inflamatorios previos al implante tumoral inducirían un perfil de macrófagos antitumoral, evitando la "transformación" o cambio de fenotipo que experimentan estas células al estar en contacto con las células tumorales.

645. (759) CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GLICOCONJUGADOS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE VEJIGA EN DISTINTAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO IN VITRO E IN VIVO.

Marina, Alberto¹; Belgorosky, Denise²; Segatori, Valeria Inés¹; Gómez, Daniel Eduardo¹; Alonso, Daniel Fernando¹; Eiján, Ana María²; Gabri, Mariano Rolando¹
*Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes*¹; *Instituto de Oncología Hospital H. Roffo, Universidad de Buenos Aires*².

La glicosilación aberrante es un fenómeno que acompaña y modula el proceso de transformación maligna. La expresión de Sialil Lewis^x (SLe^x), Lewis^x (Le^x) y Sialil Tn (STn) ha sido reportada en tumores de vejiga invasivos humanos. Sin embargo, es poca la información que se tiene acerca de su expresión en modelos de cáncer vesical murino. En este trabajo se analiza, mediante técnicas de citometría de flujo e inmunohistoquímica, el perfil de expresión de glicoconjugados en las líneas tumorales de vejiga murinas MB49 y MB49-I, en distintas condiciones de crecimiento que van desde el cultivo en monocapa, el desarrollo de esferoides *in vitro* y el crecimiento *in vivo*, tanto en condiciones hetero como ortotópicas. De esta manera nuestros resultados permiten valorar la posible variación en la expresión según las condiciones de crecimiento de las células. Los resultados obtenidos demuestran que SLe^x se expresa en mayor medida en la línea no invasiva (MB49) cuando se la cultiva *in vitro*, tanto en monocapa como en esferoide. Cuando esta línea forma tumores ortotópicos la expresión disminuye, mientras que se hace mayor en MB49-I. En relación a Le^x y STn, los modelos MB49 y MB49-I no muestran un nivel de expresión similar al reportado en cáncer vesical humano ya que no se observó una correlación entre la presencia de estos glicanos y la malignidad de las líneas celulares en ninguna de las condiciones de crecimiento estudiadas. Por su parte, la expresión del gangliósido NGcGM3 en la línea celular invasiva (MB49-I) aumenta cuando las células se crecen *in vivo*. Es de destacar que NGcGM3 ha sido reportado como un marcador tumoral de relevancia en otras variantes tumorales. Nuestros resultados resaltan la importancia de poner en consideración distintas condiciones de crecimiento para la correcta valoración del perfil de expresión antigénico en las líneas celulares utilizadas como parte de modelos preclínicos de evaluación terapias oncológicas.

646. (764) IMPORTANCIA DE LA MODULACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL EN LA EFECTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA INMUNOTERAPIA COMBINADA CON CICLOFOSFAMIDA E IL-12 EN CÁNCER DE COLON MURINO

Malvicini, Mariana¹; Ghiaccio, Valentina²; Piccioni, Flavia¹; Rizzo, Manglio Miguel¹; Alaniz, Laura⁴; Bayo, Juan Miguel¹; Fiore, Esteban¹; García, Mariana¹; Aquino, Jorge¹; Peixoto, Estanislao¹; Atorrasagasti, Catalina¹; Matar, Pablo³; Maz-zolini, Guillermo¹

*Laboratorio de Terapia Génica-FCB-Universidad Austral*¹; *Università degli Studi di Cagliari, Cerdeña, Italia*²; *Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario*³; *Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires*⁴

La administración de ciclofosfamida (Cy) y terapia génica con IL-12 (AdIL-12) produce un efecto antitumoral sinérgico mediado por la inducción de una potente respuesta inmunitaria en ratones con cáncer de colon. Previamente demostramos que la combinación de esta modalidad con 4-metilumbeliferona (4Mu), un inhibidor de la síntesis de ácido hialurónico incrementa la efectividad terapéutica de Cy+AdIL-12, tanto en un modelo subcutáneo como en un modelo de metástasis hepáticas de cáncer de colon (CT26). Para evaluar los mecanismos involucrados potenciación de la respuesta terapéutica se analizaron los niveles de ácido hialurónico y los niveles de moléculas asociadas al proceso de neovascularización y de hipoxia en el tejido tumoral. Se inocularon ratones Balb/c con células CT26 (5×10^5) s.c. (día 0); cuando los tumores alcanzaron un volumen de 85mm³ (día 7) se distribuyeron en grupos que recibieron: I) solución salina; II) 4Mu (200mg/kg/día, vía oral, durante 21 días); III) Cy (50 mg/Kg, i.p.) +AdIL-12(10^9 PFU, intratumoral); IV) 4Mu+Cy+AdIL-1. Se tomaron muestras a día 14 y se procesaron para su análisis. Los niveles de expresión de ácido hialurónico en el entorno tumoral disminuyen significativamente por la administración de 4Mu, observando una disminución más significativa en el grupo tratado con la triple combinación 4Mu+Cy+AdIL-12. Por otra parte, en los animales tratados con 4Mu+Cy+AdIL-12 observamos una disminución significativa de los niveles de expresión génica de factores proangiogénicos como VEGF e IL6, y un aumento de la expresión de factores antiangiogénicos como TSP-1 e IP-10 ($p < 0,05$). El análisis de la expresión del marcador de hipoxia Hif1-alfa mostró niveles significativamente más bajos en los animales tratados con 4Mu+Cy+AdIL-12($p < 0,01$). Sugerimos que el tratamiento con 4Mu potencia el efecto antitumoral de Cy+AdIL-12 a través de la modulación de la matriz extracelular y la inducción de efectos antiangiogénicos favoreciendo el desarrollo de un microambiente tumoral favorable para su erradicación.

647. (766) ESTUDIOS MOLECULARES SOBRE EL CÁNCER DE VEJIGA. USO DE ESTRATEGIAS BIOINFORMÁTICAS PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES DE RECURRENCIA.

Mencucci, María Victoria¹; Abascal, MF¹; Besso, MF¹; Aparicio, E¹; Rosso, M¹; Furlong, Li²; Vázquez-Levin, MH¹
*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET*¹; *Research Programme on Biomedical Informatics (GRIB), Hospital del Mar Medical Research Institute, España*².

Introducción: El cáncer de vejiga (CV) es el 7mo cáncer más común en hombres. Los carcinomas uroteliales son >90% y tienen alto riesgo de recurrencia (70%), pero los genes/proteínas responsables aún no han sido identificados. La progresión tumoral ha sido asociada a la caída de la expresión/funciones de Cadherina epitelial (cadE), molécula de adhesión ligada al citoesqueleto de actina por proteínas adaptadoras (cateninas). Alteraciones en CadE se relacionan a mutaciones y a expresión de represores, entre otros. Nuestro grupo ha mostrado evidencias de estas alteraciones en CV (Lapyckyj/Mencucci et al, SAIC 2012). Objetivo: Utilizar bioinformática para identificar genes/proteínas relacionados a CV, CadE y recurrencia tumoral. Metodología: Se utilizó 1) DisGeNET: base de datos para evaluar asociaciones gen-enfermedad, 2) HIPPIE: evalúa interacciones proteína-proteína; 3) VENNY: compara listas de genes/proteínas 4) COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en cáncer. Resultados: El análisis de DisGeNET arrojó 69 genes asociados a CV y el análisis expan-

dido (bases no curadas) identificó 359, siendo *CDH1* el de mayor "score", seguido de TP53, FGFR3, NAT2 y GSTM1. Los estudios expandidos identificaron α , β y γ -catenina así como el represor transcripcional Twist1. El análisis de mutaciones somáticas de *CDH1* en CV relevó 4 cambios (aa 204, 638, 731 y 785) en un estudio de 164 muestras. El análisis de relación proteína-proteína del listado de DisGeNET identificó 50 genes/proteínas asociados a *CDH1/CadE*, de las que solo 3 se encontraron en la lista de DisGeNET. Las restantes fueron contrastadas con genes asociados a Recurrencia (DisGeNET), resultando en la identificación de dos genes/proteínas, miembros de la familia de "Heat shock proteins" y de Tirosina Quinasas que interactúan con el citoesqueleto de actina, de las que no hay antecedentes de recurrencia en CV. Conclusión: Los estudios confirmaron la relevancia de *CDH1/CadE* e identificaron genes asociados a recurrencia en CV.

648. (772) UN NUEVO ADENOVIRUS ONCOLÍTICO BASADO EN EL PROMOTOR DE CDC25B ES CAPAZ DE INHIBIR EL CRECIMIENTO DE TUMORES HUMANOS DE PÁNCREAS EN DIFERENTES MODELOS PRECLÍNICOS

Rotondaro, Cecilia¹; Weber, Helga²; Russo Maenza, Agustina¹; Gidekel, Manuel²; Werbach, Santiago¹; Salvatierra, Edgardo¹; Sganga, Leonardo¹; Acosta Haab, Gabriela⁴; Curiel, David³; Cafferata, Eduardo¹; Podhajcer, Osvaldo¹ Laboratorio de Terapia Molecular y Celular, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina¹; Oficina del Vicedirector de Investigación y Estudios de Posgrado, Universidad de La Frontera, Chile²; The Division of Cancer Biology, Washington University School of Medicine, USA³; Laboratorio de Anatomía Patológica, Hospital de Oncología Marie Curie, Buenos Aires, Argentina⁴.

El Cáncer de páncreas es la cuarta causa de muerte en hombres y mujeres y se caracteriza por un pronóstico desalentador sin tratamiento terapéutico. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue la construcción de un adenovirus oncolítico cuya replicación es dirigida por el promotor de CDC25B, para su uso en modelos preclínicos para cáncer de páncreas. Para ello, la transcripción del gen esencial E1A fue colocado bajo el control del promotor de CDC25B. En base a datos preliminares se realizó la pseudotipificación del adenovirus con una fibra quimérica de los serotipos 5/3. Investigamos el efecto lítico *in vitro* y la eficacia terapéutica *in vivo*, en combinación o no con gemcitabina, en xenotransplantes de tumores pancreáticos humanos ortotópicos, crecidos en ratones nude y en hámsteres Sirios. También determinamos marcadores bioquímicos de toxicidad hepática y niveles del marcador tumoral CA19.9. Resultados: AV25CDC presentó un fuerte efecto lítico *in vitro* en células tumorales de páncreas. Ratones nude portadores de tumores ortotópicos de 15 días, tratados intratumoralmente o por vía sistémica con AV25CDC combinado con gemcitabina, exhibieron una reducción del 70%-80% en la masa tumoral en comparación a los ratones control. El tratamiento con quimio-viroterapia indujo la regresión a niveles normales de los parámetros bioquímicos de toxicidad hepática, estos ratones exhibieron más del 90% de reducción en los niveles de suero de CA 19.9 comparado con los controles. La eficacia de la quimio-viroterapia fue confirmada en ratones portadores de tumores Mia PaCa-2 y en modelos de hamsters Sirios portadores de tumores HaP-T1. El tratamiento viral modificó la arquitectura del tumor e indujo un incremento en la actividad de MMP-9, lo que podría facilitar la penetrabilidad de la gemcitabina. Conclusión: Estos resultados demuestran que AV25CDC es un agente oncolítico efectivo para la combinación de quimio-viroterapia en tratamiento de cáncer de páncreas.

649. (782) EFECTO ANTICARCINOGÉNICO DE LAS ESTATINAS EN MODELOS DE HEPATOCARCINÓGENESIS

Ridruejo, Ezequiel¹; Romero Caimi, Giselle²; Sánchez, Marcela²; Chiappini, Florencia²; Pontillo, Carolina²; Randi, Andrea²; Kleiman De Pisarev, Diana²; Álvarez, Laura² Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas¹; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires².

El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida persistente en el medioambiente. Es un disruptor endocrino que altera la homeostasis de las HT y promueve la formación de focos pre-neoplásicos en hígado de rata. Las estatinas son hipolipemiantes, que presentan actividad antitumoral debido a su acción apoptótica y a su capacidad de inhibir la invasión tumoral y generación de metástasis, desconociéndose su mecanismo molecular de acción. Estudiaremos: en un modelo de iniciación/promoción (I/P) en hígado de rata, [dietilnitrosamina (DEN)(50mg/kg) y HCB(100mg/kg de p.c.)]: el efecto del HCB sobre: a) los niveles proteicos de PCNA en zonas focales y no focales; b) los niveles de RNAm de la enzima hidroximetilglutarilCoA reductasa (HMGCoAR); c) los niveles tisulares de las HT d) los niveles séricos de colesterol total; 2-En células Hep-G2 investigaremos el efecto de la atorvastatina (AT) (5, 10, 20 y 30 μ M), un inhibidor de la HMG-CoAR, sobre la proliferación celular inducida por HCB (5 μ M). Se observó en zonas focales del grupo (DEN+HCB) vs. DEN, un incremento del 60%($p \leq 0,001$) de los niveles proteicos de PCNA (WB). En hígado total, aumentaron el RNAm de HMGCoAR (RT-PCR) 31%, $p \leq 0,01$; los niveles de T₄ hepático, (RIA) (38%, $p \leq 0,01$) y disminuyeron los de T₃ (37%, $p \leq 0,01$). El mRNA de deidosa tipo III (DIII) aumentó 30%($p \leq 0,01$) y de DI disminuyó 41%($p \leq 0,01$) (RT-PCR). Los niveles séricos de colesterol total aumentaron 28%($p \leq 0,05$) (Kit enzimático). En células Hep-G2 tratadas con HCB y con dosis crecientes de AT se observó que el efecto estimulador de HCB sobre la expresión de PCNA, p-ERK 1/2, D1 y TGF- β 1 disminuyó de manera dosis dependiente. Los niveles de RNAm de la HMGCoAR disminuyeron significativamente con AT (20 y 30 μ M), 29% y 38%, respectivamente. Conclusión: La AT reduce la proliferación celular inducida por el HCB en células Hep-G2. El RNAm de la HMGCoAR, así como la señalización del TGF- β 1 y DI podrían estar involucrados en el aumento de la proliferación inducida por el toxico.

650. (787) LA AUTOFAGIA PROTEGE DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL TRASTUZUMAB EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS HER2+ CULTIVADAS EN 3D

Rodríguez, Cristina¹; Reidel, Sara²; Bal De Kier Joffé, Elisa¹; Jasnis, María Adela¹; Fiszman, Gabriel^{1,2} Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires¹; Centro de Biotecnología Industrial-INTI².

Los esferoideos tumorales (ET) son un modelo de crecimiento celular en 3D que mimetiza un tumor avascular. El receptor HER2, sobreexpresado en el 25% de tumores de mama, se asocia a mal pronóstico; se utiliza el anticuerpo monoclonal Trastuzumab (Tz) como inmunoterapia pero 60% de las pacientes desarrolla resistencia. La autofagia actuaría como mecanismo de escape a la inmunoterapia. Demostramos que los ET son más resistentes al Tz que las monocapas. Nuestro objetivo fue analizar la relevancia de la autofagia en el crecimiento de los esferoideos y en la resistencia al tratamiento con Tz. Para ello se cultivaron ET a partir de la línea BT474 de cáncer de mama humano HER2+. Mediante WB se observó mayor expresión del marcador de autofagia LC3 en ET que en monocapas. El tratamiento con Bafilomicina A1 confirmó la activación de la vía autofágica. Con IF se observó que las células LC3+ aumentan hacia el centro hipóxico del esferoide. En ET tratados por 15 días con Tz (50 μ g/ml) se encontró una mayor expresión de LC3 en todas las células, que al ser cultivadas en 2D resultaron 100% resistentes al Tz. En monocapa Tz (1 μ g/ml) también indujo una mayor expresión de LC3 y un aumento de autofagosomas. Asimismo, la combinación de Tz con el inhibidor de la autofagia 3-MA duplicó la citotoxicidad respecto de Tz ($p < 0,05$). Se investigó la relación entre autofagia y apoptosis analizando con Anexina/IP el tratamiento con Tz y 3-MA. En 3D, Tz disminuyó la apoptosis basal en un 30% y al inhibir la autofagia, se revirtió dicho efecto. En 2D Tz no tuvo efecto sobre la apoptosis mientras que la combinación 3-MA+Tz indujo un incremento del 35% en la apoptosis ($p < 0,05$). Concluimos que Tz ejerce un efecto diferencial en células BT474 cultivadas en 3D con respecto a 2D inhibiendo la apoptosis basal y generando esferoideos compuestos sólo por células resistentes al Tz dependientes de autofagia. Proponemos este modelo para estudiar los mecanismos de resistencia al Tz asociados a la autofagia.

651. (788) EFECTO ANTITUMORAL DE DESMOPRESINA (DDAVP) Y SU ANÁLOGO [V⁴Q⁵] DDAVP MEDIADO POR EL RECEPTOR V2 (V2R) EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS CON CARACTERÍSTICAS NEUROENDÓCRINAS (NE)

Pifano, Marina¹; Garona, Juan¹; Pastrian, Belén²; Iannucci, Nancy²; Gómez, Daniel E.¹; Alonso, Daniel F.¹; Ripoll, Giselle V.¹

*Laboratorio Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes*¹; *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*²

El crecimiento de tumores neuroendócrinos es mediado principalmente por neuropéptidos específicos que modulan diversas vías de señalización. La vasopresina (AVP) es un neuropéptido secretado por la hipófisis con actividad antidiurética y vasopresora, cuya secreción inapropiada ha sido reportada en pacientes con cáncer de pulmón y próstata. La AVP media sus efectos a través de los receptores específicos de membrana V1a, V1b y V2. En células tumorales, el receptor V1a estimula la proliferación, mientras que V2r está vinculado a mecanismos antiproliferativos. DDAVP y [V⁴Q⁵] dDAVP (4-valina-5-glutamina-desmopresina) son análogos sintéticos de AVP, agonistas selectivos de V2r, con actividad antitumoral reportada en cáncer mamario y colorrectal. En este trabajo se evaluó la acción antitumoral de los análogos dDAVP y [V⁴Q⁵] dDAVP sobre líneas celulares humanas de cáncer pulmonar de células pequeñas (H82) y carcinoma de próstata (PC-3). Se confirmó la expresión de V2r mediante inmunofluorescencia y la presencia de marcadores específicos de estirpe NE por *western blot*. La incubación de células en crecimiento exponencial en presencia de los péptidos (100 nM a 1,5 µM) resultó en una inhibición de la proliferación (p<0,05) en ambas líneas. El efecto inhibitorio de la proliferación fue revertido al silenciar V2r mediante siRNA. En la línea H82 el análogo [V⁴Q⁵] dDAVP desplegó un mayor efecto citostático (p<0,05) con respecto al análogo parental. Además, la incubación con análogos durante 7 días inhibió significativamente el crecimiento clonogénico de células PC-3 (p<0,01). La incubación con los análogos de AVP (1 µM) logró inhibir la migración de células H82 un 60-75% mientras que en PC-3 se evidenció una inhibición del 20-30%. Estos resultados muestran las primeras evidencias de la actividad antitumoral de los agonistas de V2r, dDAVP y [V⁴Q⁵] dDAVP, en dos tipos tumorales agresivos con características NE asociados a un mal pronóstico con pocas alternativas terapéuticas.

652. (790) ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL ANÁLOGO SINTÉTICO DE DESMOPRESINA [V⁴Q⁵]DDAVP (1-DEAMINO-4-VALINA-5-GLUTAMINA-8-D-ARGININA VASOPRESINA) EN COMBINACIÓN CON PACLITAXEL SOBRE XENOTRASPLANTES DE CÁNCER MAMARIO HORMONO-INDEPENDIENTE EN RATONES ATÍMICOS

Garona, Juan¹; Pifano, Marina¹; Pastrian, Belén²; Iannucci, Nancy²; Gómez, Daniel E.¹; Alonso, Daniel F.¹; Ripoll, Giselle V.¹

*Laboratorio Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes*¹; *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*².

El péptido [V⁴Q⁵] dDAVP es un análogo de la desmopresina con actividad antitumoral en modelos murinos singénicos y xenogénicos de carcinoma mamario. [V⁴Q⁵] dDAVP inhibe la progresión de tumores mamaros, modulando su vasculatura, agresividad y diseminación a distancia. En este trabajo se estudió la acción antitumoral *in vitro* e *in vivo* del análogo [V⁴Q⁵] dDAVP en combinación a paclitaxel, utilizando el modelo de carcinoma mamario humano triple-negativo MDA-MB-231. En primera instancia se evaluó la proliferación de células en crecimiento exponencial incubadas por 72 h con [V⁴Q⁵] dDAVP (1000 nM), combinado o no a concentraciones sub-IC₅₀ de paclitaxel (≤2,5 nM). Mientras que los tratamientos individuales con [V⁴Q⁵] dDAVP o paclitaxel inhibieron significativamente el crecimiento celular, se evidenció un claro efecto inhibitorio cooperativo en el grupo incubado con la combinación de drogas (p<0,001). Los resultados fueron confir-

mados en cultivos clonogénicos y cultivos tridimensionales de esferoides tumorales, donde se observó una inhibición aditiva sobre la formación de colonias (67, 44 o 24% de inhibición para [V⁴Q⁵] dDAVP+paclitaxel, [V⁴Q⁵] dDAVP o paclitaxel, respectivamente, p<0,01). Finalmente, se generaron xenotrasplantes de células MDA-MB-231 en ratones atímicos y los animales se trataron con 3 dosis semanales de [V⁴Q⁵] dDAVP (0,3 µg/kg, i.v.), sumado o no a ciclos semanales de paclitaxel (10 mg/kg, i.p.). El tratamiento sostenido con [V⁴Q⁵] dDAVP, combinado o no a quimioterapia, produjo una disminución del 60% de la carga tumoral (p<0,05) y un aumento en la sobrevida media (p<0,01). La asociación con paclitaxel mostró una disminución de la tasa de crecimiento tumoral (p<0,001) y la ulceración. Los efectos cooperativos asociados a la quimioterapia ofrecen un panorama alentador para profundizar los estudios y así evaluar el potencial uso de [V⁴Q⁵] dDAVP como agente adyuvante a la quimioterapia tradicional en el tratamiento de cáncer mamario hormono-independiente.

653. (800) EFECTO DEL BGJ398 SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN CARCINOMA MURINO RESISTENTE A LA TERAPIA CON ANTIPROGESTÁGENOS.

Sahores, Ana; Fuentes, Cynthia; Lanari, Claudia; Lamb, Caroline

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFRs) están desregulados en numerosas neoplasias. En muestras de tumores mamaros humanos demostramos una correlación positiva entre la expresión de FGFR1 y un alto grado histológico. La mayoría de los tumores que expresan receptores hormonales responden a la terapia endocrina, sin embargo, algunos desarrollan resistencia. Previamente, demostramos que en tumores respondedores a antiprogéstágenos, el FGFR2 activado por el FGF2 estromal, participa del crecimiento tumoral a través del receptor de progesterona (PR). Recientemente observamos una mayor expresión de FGF2 y FGFR1 en las variantes resistentes a la endócrina terapia (C4-2-HI y C4-HIR) en relación a las sensibles (C4-HI). En este trabajo utilizamos el carcinoma mamario murino resistente C7-HI, que expresa receptores hormonales y hace metástasis en pulmón. El objetivo fue caracterizar la expresión de la vía FGF2/FGFR1 y evaluar el efecto del BGJ sobre el crecimiento tumoral. Por inmunohistoquímica y western blot detectamos expresión citosólica de FGFR1 y FGF2 en el parénquima tumoral. En cultivos primarios, el FGF2 (100 ng/ml) y 2 inhibidores de FGFR (PD 173074 y BGJ) aumentaron e inhibieron, respectivamente la proliferación celular medida por incorporación de 3H-timidina (p<0,001). *In vivo*, el BGJ (15 mg/kg/día; ev) redujo el crecimiento tumoral en comparación al control (p<0,01), inhibió la expresión del receptor de estrógeno α (REα; p<0,01) y aumentó la expresión de caspasa 3 activa (p<0,05). Actualmente estamos investigando si el tratamiento con BGJ podría afectar la diseminación metastásica en ratones con tumores C7-HI. Estos resultados sugieren que el FGF2 estaría promoviendo el crecimiento de tumores resistentes a través de un loop autocrino y promueven el uso de inhibidores de la vía de FGFR en tumores que no se beneficiarían de una terapia endocrina.

654. (802) REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA TUMORAL MAGEA2: NUEVAS FUNCIONES DE P14ARF Y RPL11 EN LA ACTIVACIÓN DE P53

Toledo, María Fernanda; Monte, Martín

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

La proteína tumoral MageA2 inhibe la actividad transcripcional del oncosupresor p53. Su mecanismo de acción es mediante la formación de un complejo p53/MageA2/HDAC3, donde HDAC3 desacetila tanto a p53 como a las histonas de los promotores blanco de p53 disminuyendo su actividad transcripcional (Monte et al.2006). Nuestro objetivo fue estudiar si el oncosupresor p14ARF, conocido activador de p53, revertía esta acción inhibitoria. p14ARF

depende de su interacción con Mdm2, la ubiquitina E3 ligasa de p53, de esta manera aumenta los niveles y la actividad de p53. Comenzamos determinando la actividad transcripcional de p53 usando genes reporteros en células U2OS (p53wt). Y observamos indicando que la expresión de p14ARF revertía el efecto de MageA2 sobre la actividad de p53 endógena. Los resultados se mantuvieron similares en otro sistema de células que no expresan p53 ni Mdm2 (MEF doble knock out p53^{-/-};mdm2^{-/-}), sugiriendo una nueva función de p14ARF sobre p53, independiente de Mdm2. p14ARF es una proteína nucleolar capaz de relocalizar otras proteínas a esa estructura. Para evaluar esta posibilidad realizamos estudios de inmunofluorescencia, en los que la expresión de p14ARF causa la relocalización de MageA2 a los nucléolos. Se confirmó este dato mediante el western blot del fraccionamiento subcelular corroborando a MageA2 en la fracción nucleolar al sobreexpresar p14ARF y observamos por inmunoprecipitación que p14ARF y MageA2 forman un complejo proteico. Los estudios de estabilidad proteica en presencia de cicloheximida no evidenciaron efectos de p14ARF sobre los niveles de MageA2. De manera similar a p14ARF evaluamos a RPL11 por ser una proteína nucleolar y activadora de p53 que interactúa e inhibe a mdm2. Encontramos que L11 es capaz de revertir la inhibición de MageA2 sobre la actividad de p53 y que también es capaz de interactuar con MageA2 sin desestabilizarla. Concluimos que MageA2 al igual que mdm2 es blanco de proteínas nucleolares que estabilizan y activan a p53.

655. (813) RAC3 MODULA LA ACTIVIDAD DE B-CATENINA EN RESPUESTA A TNF

Panelo, Laura; Rubio, María Fernanda; Fernández Larrosa, Pablo Nicolás; Costas, Mónica Alejandra
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires.

Las citoquinas (CI) en el microambiente tumoral juegan un importante rol en la progresión y metástasis. Demostramos que la sobreexpresión de RAC3 es necesaria para la transición epitelio mesenquimética (TEM) inducida por TNF a través de la activación de NF-κB. Por otro lado CI pueden activar B-catenina para expresar distintos genes involucrados con TEM. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la sobreexpresión de RAC3 sobre los niveles y actividad de b-catenina (b-cat) bajo el estímulo de TNF. Células Hek con expresión estable de alto o bajo RAC3 y T47D ± siRNA- RAC3 fueron estimuladas: Basal, TNF, Sulfazalacina SZ o TNF+SZ por 24 hs y se analizaron los niveles de b-cat por WB, localización y cinética de translocación a núcleo por inmunofluorescencia. Por WB se observó un aumento del 80% en células alto RAC3 Basal (p<0,05) que no se modificó por los tratamientos. Por IF observamos una localización en membrana de b-cat, sin embargo células con alto RAC3 mostraron una disminución de b-cat a nivel de membrana y translocación a núcleo luego del estímulo con TNF, siendo revertido por SZ. La cinética de translocación reveló que b-cat transloca al núcleo a 2 hs de estímulo con TNF sólo en células con alto RAC3. Resultados preliminares de la actividad de b-cat por ensayos reporteros (TOP/FOP) revelaron un aumento del 150 +/- 10% en condiciones basales y de 500 +/- 12% bajo el estímulo con TNF cuando RAC3 está sobreexpresado. En contraparte células T47D siRNA-RAC3 mostraron una disminución de 40% en los niveles de b-cat por WB y en la IF revela una disminución de b-cat en membrana y aparición de acúmulos citoplasmáticos, que es revertido por LiCl (inhibidor de GSK3) no observándose translocación a núcleo luego del estímulo con TNF en ningún tiempo evaluado. Estos resultados demuestran que el aumento en los niveles de expresión y actividad de b-cat es un mecanismo adicional a la vía de NF-κB por la cual la sobreexpresión de RAC3 podría contribuir a la TEM.

656. 827) ROL DEL ONCOGÉN RAC3 EN LA REGULACIÓN DE LA SENESCENCIA CELULAR

Fernández Larrosa, Pablo Nicolás; Panelo, Laura; Ruiz Grecco, Marina; Rubio, Fernanda; Costas, Mónica A
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM)-CONICET, Universidad de Buenos Aires

RAC3 es un coactivador que se encuentra aumentado en tumores. Su sobreexpresión *in vitro* en células no tumorales HEK293 induce transformación tumoral: crecimiento independiente de anclaje, aumento de la proliferación celular, inhibición de apoptosis y de la autofagia. Por otra parte, la senescencia es un proceso disparado por acortamiento telomérico o por stress oxidativo, que acompaña al envejecimiento del individuo. Se caracteriza por arresto irreversible, metabolismo activo, aumento del tamaño celular y nuclear y cambios heterocromáticos en el ADN. Dado que RAC3 tiene la capacidad de remodelar la cromatina y se encuentra elevado en células madre embrionarias, resulta importante estudiar su posible participación en senescencia. Con este fin, clones estables de HEK293 con altos niveles de RAC3 (Hek-RAC3) o con niveles normales (Hek-wt) fueron tratados con 150mM de H₂O₂ ó 50nM de Rapamicina durante 24hr (previamente estandarizado para inducir senescencia) o con Medio Completo como control. A las 24hr se cambió el medio, y a los 6 días se evaluó los niveles de senescencia por detección de SA-b-Gal ácida y núcleos grandes (por tinción con Hoescht). Se observó una significativa (*p<0,01) reducción en el porcentaje de células senescentes en las Hek-RAC3 en comparación con las Hek-wt, mientras que en el control los niveles permanecieron por debajo de 15% en ambos casos:

	SA-β - gal	Acida (%)	Núcleos	Grandes (%)
	150μM H ₂ O ₂	50nM Rapa	150μM H ₂ O ₂	50nM Rapa
Hek-wt	58 ± 6	60 ± 10	55 ± 7	40 ± 5
Hek-RAC3*	21 ± 10	30 ± 5	20 ± 10	15 ± 4

Estos resultados sugieren que RAC3 podría estar inhibiendo la entrada en senescencia inducida por H₂O₂ o Rapa, involucrando posiblemente a p53 y FOXO1a como factores clave en dicha modulación. Además se evaluó la localización por IFI de p53, AKT y de FOXO1a. Se observó mayor localización citoplasmática de p53 y localización nuclear de pAKT y pFOXO1a en las Hek-RAC3 tratadas (a los 6 días) en comparación con las Hek-wt.

657. (829) HIF-1 CONFIERE RESISTENCIA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA A TRAVÉS DE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DEPENDIENTE DE VMP1

Rodríguez, Matías Exequiel¹; Colombo, María I.²; Vaccaro, María I.³; Rivarola, Viviana A.¹
Universidad Nacional de Río Cuarto¹, Universidad Nacional de Cuyo², Universidad de Buenos Aires³.

La terapia fotodinámica (TFD) contra el cáncer involucra la administración de un fotosensibilizador (PS) el cual se activa con luz visible y genera especies tóxicas del oxígeno, responsables de la muerte de la célula tumoral. Uno de los problemas de la TFD es la aparición de poblaciones resistentes. En este contexto, se ha reportado que la TFD induce estabilización y actividad de Hif-1 como mecanismo de resistencia. Además, se ha demostrado que la autofagia puede ser inducida por Hif-1, aunque el mecanismo molecular no ha sido clarificado. Objetivo: Determinar si la TFD con el PS Me-ALA induce la expresión de Hif-1a y autofagia como vías de supervivencia en células de cáncer de colon CaCo2 y evaluar el mecanismo molecular de regulación de la autofagia a través de Hif-1. Resultados: Mediante western blot y microscopía de fluorescencia determinamos que el tratamiento fotodinámico induce la expresión de Hif-1a y aumento del flujo autofágico. Mediante MTT observamos que la activación de Hif-1 con CoCl₂ indujo aumento de la viabilidad celular a la TFD, mientras que su inhibición expresando el DN-Hif-1a sensibiliza las células al tratamiento. La inducción de autofagia con Rapamicina protegió las células del efecto fotodinámico, mientras que su inhibición con Wortmanina las sensibilizó. Por otro lado, demostramos que Hif-1 es capaz de inducir autofagia. La inducción de Hif-1 en combinación con inhibidores de autofagia, no induce resistencia a TFD, demostrando que la autofagia es el principal mecanismo de resistencia inducido por Hif-1. Finalmente, demostramos que Hif-1 inducido con CoCl₂ induce la expresión de VMP1, una proteína capaz de inducir autofagia en células de mamíferos, por el contrario, la expresión del DN-Hif-1a, en presencia de CoCl₂, inhibe la expresión de la proteína autofágica. Estos

resultados demuestran un nuevo mecanismo de regulación de la autofagia mediada por Hif-1, a través de la expresión de VMP1. Conclusión: La inducción de Hif-1 induce resistencia a la TFD a través de la autofagia. Por lo tanto, la inhibición de la vía Hif-1/VMP1 podría aumentar la eficiencia de la terapia.

658. (831) EFECTO DE LOS ESTRÓGENOS Y LA FIBRONECTINA SOBRE LA DINÁMICA DE RECICLADO Y DEGRADACIÓN DEL ER Y LA INTEGRINA B1

Sampayo, Rocío¹; Toscani, Andrés Martín²; Recouvreux, María Sol¹; Coluccio Leskow, Federico²; Simian, Marina¹ Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires²

Cuatro mil mujeres son diagnosticadas de cáncer de mama todos los días. El 70% de los tumores son positivos para receptores de estrógeno (ERa y ERb). En estos casos, la terapia de elección es la terapia endócrina con tamoxifeno (TAM). Sin embargo, dentro de los 15 años de comenzada la terapia 1/3 de las pacientes desarrolla resistencia y el cáncer reaparece. Demostramos previamente que un componente de matriz extracelular, la fibronectina (FN), confiere resistencia al TAM por medio de su molécula receptora de membrana, la integrina b1, la cual estaría asociada al ERa membrana plasmática. En este trabajo describimos, utilizando células de adenocarcinoma mamario humano, que 15 a 120 minutos de tratamiento con 17- β estradiol (E2) estimulan la endocitosis de vesículas de membrana conteniendo integrina b1 y la posterior degradación de la misma (exclusivamente en células ERa positivas). Esta degradación se daría en el compartimento lisosomal perinuclear positivo para RAB7, donde típicamente son degradadas aquellas vesículas que no están marcadas para reciclado a membrana. Tras el tratamiento con E2, el ERa se localiza en este compartimento, donde también sería degradado. La inhibición de la actividad lisosomal revierte parcialmente dicha degradación del ERa. Probamos, además, que en presencia de FN el E2 es incapaz de inducir la degradación del ERa o de la integrina b1. Junto con esto, 15 minutos de tratamiento con E2 son suficientes para inducir la remodelación del citoesqueleto de actina y la reorganización de la integrina b1 de membrana plasmática. Este efecto no se produce cuando las células se encuentran adheridas a FN. Nuestros resultados profundizan en el entendimiento de la dinámica de la asociación entre la integrina b1 y el ERa, la que sería clave en la comunicación de las células tumorales con el entorno. Esta comunicación es esencial para la regulación de la proliferación y supervivencia celular y, por lo tanto, central en la biología tumoral.

659. (836) EFECTO MODULADOR DE LA HISTAMINA Y LA CLOZAPINA SOBRE LA CARDIO Y HEPATOTOXICIDAD Y LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA DOXORRUBICINA

Martinel Lamas, Diego^{1,2}; Nicoud, Melisa¹; Carabajal, Eliana¹; Tesán, Fiorella¹; Salgueiro, María J¹; Perazzo, Juan C³; Rivera, Elena S¹; Medina, Vanina A^{1,2} Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET² Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³.

Previamente demostramos que la histamina (HA) produce un efecto protector frente al daño producido por la radiación ionizante. La HA y agonistas del receptor H4 (RH4) inhiben la proliferación de células tumorales mamarias MDA-MB-231 (MDA) y MCF-7 y el tratamiento *in vivo* con HA disminuye el crecimiento de tumores mamaros y aumenta la supervivencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles efectos moduladores de la HA y la clozapina (agonista del RH4) sobre la cardio y la hepatotoxicidad de la doxorubicina (DOX) en ratas macho y sobre la actividad antitumoral en tumores de mama triple negativo inducido con células MDA en ratones *nude*. Los animales se separaron en 6

grupos: control (vehículo), histamina (5 mg/kg, sc), clozapina (1 mg/kg, sc), doxorubicina (2 mg/kg, ip, 3 veces por semana) y los tratamientos combinados. La DOX produjo desorganización sinusoidal, pérdida de los espacios sinusoidales y áreas de necrosis focal en hígado, y miocitosis focal con hemorragia en corazón y aumentó significativamente la peroxidación lipídica asociada a la reducción de actividad de enzimas superóxido dismutasa y catalasa en estos tejidos. Los tratamientos con HA y clozapina evitaron las alteraciones histológicas y el daño oxidativo que se acompañó de la preservación de la funcionalidad de estos órganos evaluada mediante técnicas de imágenes con ^{99m}Tc-sestamibi (perfusión cardíaca) y ^{99m}Tc-Disida (funcionalidad hepática). Asimismo, los tratamientos *in vivo* de tumores mamaros con HA y clozapina potenciaron el efecto antitumoral de la DOX, aumentando el tiempo de duplicación (7,7 \pm 0,7 en control; 20,7 \pm 1,0 en DOX, p<0,001; 30,9 \pm 1,2 en DOX+HA, p<0,001; 25,9 \pm 1,0 días en DOX+clozapina, p<0,001) y disminuyendo el índice mitótico y la celularidad tumoral. Podemos concluir que la histamina y la clozapina podrían mejorar el índice terapéutico de la DOX ejerciendo un efecto citoprotector en hígado y corazón y potenciando su acción antitumoral en cáncer de mama.

INMUNOLOGÍA SAI 4

660. (822) MOLECULAR ALTERATIONS IN AUTOREACTIVE T-CELL LINEAGES IN TYPE 1 DIABETES

Polychronakos, Constantin; Al-Riyami Maha.; Marchand, Luc; Du, Xiaoyu Research Institute of the MC Gill University, Child Health and Human Development Program, Canada

Introduction: Type 1 diabetes (T1D) is due to the autoimmune destruction of the insulin-producing pancreatic beta-cells. Although T1D is known to depend on both inherited susceptibility and environmental factors, these alone may not explain the disease. Concordance in monozygotic twins is much less than 100% despite shared childhood environment and male NOD (non-obese diabetic) mice have an incidence of less 50% despite genetic identity and standardized environment. These observations point to stochastic determinants. Hypothesis: One such determinant could be somatic mutations in the expanding antigen-specific autoreactive T-cell lineages. Objective: To test this hypothesis in human patients and NOD mice by first concentrating on copy-number alterations (CNA) because they are known to happen in blood cells, are easier to detect than point mutations and their functional consequences easier to infer. Methodology: We tested memory CD4⁺ cells from pancreatic lymph nodes of NOD mice and T-cells from blood of newly diagnosed T1D patients, sorted for *in vitro* proliferation to proinsulin (by CFSE dilution). CNAs were detected by high-resolution comparative genomic hybridization (aCGH) using germline DNA as reference and confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Results: In both the mouse and human samples we found a number of CNAs with highly non-random independent involvement of the same gene(s) across samples, including *SIRPB*, at a known germline T1D locus, and two genes (*MAP3K3* and *SLC12A7*) expressed exclusively in immune cells. By the same methodology, we found no CNAs in lymphocytes expanded as part of normal host defense, (regional nodes of mice with *Leishmania major* infection). Conclusion: Our data suggest a causal role for post-zygotic copy-number mutations in autoreactive T-cells in T1D. These findings challenge classical notions of autoimmune disease and open conceptual avenues towards prevention and individualized therapeutics.

661. (825) SEARCHING FOR GENETIC MARKERS OF TUBERCULOSIS SUSCEPTIBILITY

Álvarez, Guadalupe¹; Hernández Del Pino, Rodrigo^{1,3}; Palacio, Victorio¹; Musella, Rosa María²; Palmero, Domingo²; García, Verónica Edith³; Pasquini, Virginia¹ Centro de Investigaciones y Transferencias del Noroeste de Buenos Aires (CIT-NOBA)-CONICET¹ División Tisiopneumología, Hospital F.J. Muñiz, Buenos Aires, Argen-

tina.² Instituto de Química Biológica de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales (IQUIBICEN)- CONICET-UBA, Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³

Tuberculosis (TB) a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) has a large impact on public health causing 5 new million cases per year. Genetic variations of the host could determine disease susceptibility. We have studied several Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in candidate genes, searching for new biomarkers of disease severity or susceptibility. DNA was extracted from whole blood of TB patients (PTB) and Healthy Donors (HD). +874 A/T SNP at the IFN- γ gene, a key cytokine in the immune response against *Mtb* was studied by ARMS-PCR. We also studied the -262 A/T; -188 A/G (PCR-RFLP) and +1343 G/T (PCR and sequencing) SNPs at SLAM (signaling lymphocytic activation molecule, an inducer of IFN- γ production against *Mtb*). For the +874 A/T SNP of IFN- γ , we found an elevated frequency of the AA genotype in PTB. This SNP has been associated to TB susceptibility in other populations of the world. Our results showed a frequency of 68% for PTB vs 31% for HD for the AA genotype*** ($\chi^2 = 41.91$; $p < 0.0001$). The AA/GG haplotype (-262 A/T and -188 A/G SLAM SNPs) was elevated in both groups of individuals (PTB=83% and HD=91%^{NS} ($\chi^2 = 4.92$; $p=0.0854$)). On the other hand, the GG genotype of the +1343 G/T SLAM SNP, that has been associated previously with resistance against the measles virus, was the most frequent in both groups in our study (PTB=70% and HD=81%)^{NS} ($\chi^2 = 2.93$; $p=0.0872$)). However, by analyzing the combination of the SLAM and IFN- γ genotypes associated to disease resistance AT/GG or TT/GG (+874 A/T IFN- γ and +1343 G/T SLAM SNPs) we found that this genotypes were over-represented in the HD group. OR determination for all the SNPs genotypes studied showed a clear association of the AA genotype (+874 A/T SNP) of the IFN- γ gene with TB (OR=6.04 IC 95% 2.631 to 13.84). The results showed that this genotype is associated with the genetic risk of developing *Mtb* infection.

662. (672) MODULATION OF SYSTEMIC IMMUNITY BY ALL-TRANS RETINOIC ACID ADMINISTRATION (ATRA) IN A MURINE MODEL OF LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION

Martire Greco, Daiana¹; Rodríguez-Rodríguez, Nahuel¹; Landoni, Verónica Inés¹; Meiss, Roberto²; Chiarella, Paula¹; Rearte, Bárbara¹; Schierloh, Pablo¹; Isturiz, Martín Amadeo¹; Fernández, Gabriela Fernández¹
Academia Nacional de Medicina¹ División Patología Experimental, ANM²

Efforts to recover the immune functions of patients with post-sepsis immunosuppression will be a breakthrough in the management of this condition. All-trans retinoic acid (ATRA) is a derivative of vitamin A with immunomodulatory properties that have effects on different immune cell populations. Our aim was to study different effects of ATRA on the systemic immune response in immunosuppressed mice (IS) by chronic inoculation of LPS and concomitant ATRA administration. For this purpose we apply daily increasing doses of LPS i.p. (5-100 $\mu\text{g/day/mouse}$) for 20 days and administered ATRA orally or i.p. (500 $\mu\text{g/day/mouse}$) (IS+ATRA group) or vaseline (vehicle) (IS group). Oral administration of ATRA to IS mice was able to increase the removal of bacteria in the peritoneal cavity after 3 h of bacterial inoculation (remaining colony formation units in peritoneal lavages: IS = 82 ± 13 , IS+ATRA = 38 ± 9 , $p < 0.05$), but did not alter the number of splenic leucocytes (Total leukocyte number ($\times 10^7$): IS = 3.9 ± 0.3 , IS+ATRA = 3.7 ± 0.6) or T cell proliferation in vitro using Concanavalin A and revealed by the MTT technique (O.D. 570 nm: IS = 0.51 ± 0.07 , IS+ATRA = 0.62 ± 0.05). However, when ATRA was administered to IS mice i.p., proliferation of T cells in the spleen was restored, and this was associated with a decreased number of Myeloid derived Suppressor cells (MDSC) and a partial recovery in the histological organization of the spleen (O.D. 570 nm: IS = 0.22 ± 0.04 , IS+ATRA = 0.75 ± 0.05 ; Number of MDSC ($\times 10^7$): IS = 2.8 ± 0.4 , IS+ATRA = 1.2 ± 0.1 , $p < 0.05$). Our results indicate that ATRA is able to restore

the innate immune response and that the selective effects of ATRA in the spleen depend on the route of administration.

663. (721) DIAZEPAM INHIBITS ACUTE INNATE AND ONGOING ADAPTIVE INFLAMMATORY RESPONSES

Falcón, Cristian Roberto¹; Monferrán Clara G.¹; Cervi Laura²; Roth Germán A.¹.

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba¹- Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC²

In addition to the central GABAergic receptors described for benzodiazepines, peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) was also identified for these molecules in immune cells, such as macrophages and lymphocytes. PBR activation was reported to decrease inflammatory immune responses. In this regard, we previously demonstrated that Diazepam (Dz) decreases LPS-induced dendritic cell activation and their ability to induce allogeneic responses, thus preventing the initiation of immune responses. In this work we demonstrate that Dz is able to diminish acute innate and adaptive ongoing inflammatory responses *in vivo*. For this, we treated C57BL/6 mice with Dz (2mg/Kg) at days 0, 2 and 4, and 12 h after the last treatment the mice were injected (i.p.) with 800 μg de LPS. Dz was able to prevent LPS-induced death and inhibit the IL-6 secretion ($p < 0.001$) by peritoneal cells favoring IL-10 production ($p < 0.002$). On the other hand, mice with MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) were treated (i.p.) with Dz (2mg/Kg) on alternate days starting when the clinical score 1 was reached. The treatment dramatically decreased EAE progression evidenced by visible clinical signs which did not increase from the beginning of the injections. Moreover, Dz treatment impaired MOG-specific IL-17 ($p < 0.03$) and IFN- γ ($p < 0.001$) production by cells of draining lymphatic nodes. Together these data suggest that Dz is able to suppress both, innate and adaptive dependent inflammatory responses, which could be an interesting tool to modulate undesirable immune responses as those occurring in septic shock or multiple sclerosis.

664. (743) MICRORNAS AS POTENTIAL NEW BIOMARKERS FOR PLEURAL TUBERCULOSIS

Spinelli, Silvana Virginia¹; Fernández, Rocío Del Valle¹; D'Attilio, Luciano¹; Pavón, Nanci²; Pocettino, Aristides¹; Bay, María Luisa¹; Bottasso, Oscar¹

Instituto de Inmunología clínica y experimental de Rosario (IDICER)-CONICET¹ Laboratorio Central, Hospital Provincial del Centenario, Rosario (2000), Argentina²

Tuberculosis (TB) may be regarded as a disease in which the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*, its etiologic agent, is engaged both in protection and pathology. Cell specific microRNAs (miRNAs) are promising biomarkers for several diseases, but their correlation with the progress of TB has not been extensively studied. Earlier work performed in our lab demonstrated distinct miRNA signatures in cells obtained from the site of infection compared with those obtained from the peripheral compartments, with a strong down-regulation of miR-223, miR-421 and miR-146a in mononuclear cells from pleural fluids of TB patients. In this work we tested whether the expression of these microRNAs was specifically associated to TB by employing samples obtained from patients with both tuberculous and nontuberculous pleurisy. Using the stem loop RT-PCR technique we were able to quantify the expression of the three microRNAs in both samples. Interestingly, we found that miR-421 expression levels were significantly lower in samples obtained from TB patients, raising its potential usefulness as a new biomarker for pleural TB. Little is known about miR-421 function but Gene Ontology Terms analysis performed on miR-421 putative targets reveals an enrichment of processes associated with fatty acid metabolism. Present results contribute to a better knowledge of the role of miRNAs in the modulation of host responses in TB pathogenesis.

665. (785) REGULATED GLYCOSYLATION CONTROLS THE FATE OF CD4 T CELLS

Méndez Huergo, Santiago Patricio¹; Dalotto Moreno, Tomás¹; Farez, Mauricio²; Mariño, Karina¹; Correale, Jorge²; Toscano, Marta¹; Rabinovich, Gabriel A.¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Hospital FLENI²

Upon differentiation into a specific subset, CD4⁺ T cells undergo major changes in their glycosylation profile. We have previously demonstrated that Th1, Th17, Th2 and recently regulatory T cells (Tregs) present differential glycosylation patterns on their cell surface, leading to differential susceptibilities to galectin1 (Gal1) induced apoptosis. Here we investigated the impact of glycosylation in the physiology of T cells, focusing on regulatory T cells (Tregs). First we analyzed by mass spectrometry the N-glycosylation patterns of *in vitro* induced Tregs (iTregs) and non-polarized activated T cells (Tact). iTregs present lower levels of high complex N-glycans but higher levels of a2,6-linked sialic acid (a2,6SA). As expected, Tact cells, but not iTregs or natural Tregs (nTregs), were susceptible to Gal1-induced apoptosis (p<0.05). Notably, Tregs lacking the enzyme that generates glycans with a2,6SA terminals (*St6gal1*KO) became susceptible to Gal1 (p<0.05). Although we found no difference in the capacity of naïve T cells from *St6gal1*KO vs *WT* mice to differentiate into iTregs, upon activation only *St6gal1*KO Tregs underwent apoptosis. In addition, *St6gal1*KO Tregs showed decreased suppressive capacity *in vitro*. While Tregs and Th2 cells present high levels of a2,6SA, Th1 and Th17 do not. To assess whether this can serve as a glycosylation signature to discriminate pro- from anti-inflammatory CD4⁺ T cells, we studied the glycosylation of CD4⁺ PBMCs from patients bearing Relapse-Remitting Multiple Sclerosis, an autoimmune disease mediated by Th1/Th17 cells. Interestingly, we found that patients coursing a relapse present a subpopulation of CD4⁺ cells with low levels of a2,6SA (9±2%) that is completely absent in patients coursing the remitting phase and control donors. Concordantly, only these patients present a subpopulation susceptible to Gal1 induced apoptosis. Finally, RR-MS patients present lower serum levels of Gal1 than PP-MS and healthy donors (p<0.01).

666. (307) BRUCELLA ABORTUS PROMOTES A FIBROTIC PHENOTYPE IN HEPATIC STELLATE CELLS THROUGH AUTOPHAGY PATHWAY ACTIVATION.

Arriola Benitez, Paula Constanza¹; Comerc, Diego J.²; Giambartolomei, Guillermo H.¹; Delpino, M. Victoria¹
Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)-CONICET-UBA¹ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB)-CONICET-UNSAM²

The liver is frequently affected in patients with active brucellosis. Previously, we demonstrated that *B. abortus* (Ba) inhibits the basal levels of MMP-9 secretion and induces collagen deposition by hepatic stellate cells (LX-2). These phenomena were dependent on a functional type IV secretion system (virB) and the secreted protein BPE005. It has been recently demonstrated that upregulation of autophagy drives the fibrogenic response in stellate cells. Our aim is determine if Ba infection induces autophagy pathway activation in LX-2 cells. To this end, Ba-infected LX-2 cells were lysed to determine LC3II and Beclin-1 expression by Western blot. Apoptosis was determined by TUNEL and caspase-3 expressions by immunofluorescence. MMPs production was determined by gelatin zymography and collagen deposition by Sirius red staining. Ba infection of LX-2 cells did not induce apoptosis but increased the levels of LC3II (p<0.01) and Beclin-1 (p<0.01) expression at 24 h post infection (pi), by a mechanism that depends on virB and BPE005 as we demonstrated using isogenic mutants. In addition, when Ba infection experiments were performed in the presence of baflomycin A we did not observe inhibition of MMP-9 secretion and induction of collagen deposition. This indicated a correlate between autophagy induction and fibrotic phenotype induced by Ba infection. At 48 h pi, our results indicated that Ba infection but not virB and BPE005 mutant induced Beclin-1 cleavage. In concordance with this finding we found an increase in caspase-3 expression. In addition, Ba infection induced apoptosis as was determined by TUNEL. This result indicated that caspase-mediated

cleavage of beclin-1 inactivates beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis. Taking together our results indicated that Ba induced the activation of autophagy pathway in LX-2 cells and this activation is involved in the fibrotic phenotype previously observed and conducted ultimately to apoptosis cell dead.

667. (556) DEVELOPMENT OF A DUAL VACCINE FOR CONTROLLING ENTEROHEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI (EHEC) AND BRUCELLA ABORTUS COLONIZATION IN CATTLE

Iannino, Florencia; Roset, Mara Sabrina; Briones, Gabriel
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB)-CONICET-UNSAM

Here, we focused on a single tool development for controlling the spreading of two bacterial pathogen such as *Brucella abortus* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) which are responsible for two important zoonosis worldwide. EHEC is a food-borne pathogen, which causes from hemorrhagic colitis to life-threatening hemolytic uremic syndrome (HUS). Since no vaccines are available, control of EHEC in cows is crucial in order to control this zoonosis. *B. abortus* is an intracellular bacterium, which is the causative agent of brucellosis, a serious debilitating disease in humans. Since in Argentina, the *Brucella* vaccination for all cattle is mandatory, we proposed here to use a vaccine strain of *B. abortus* as vaccine carrier for EHEC antigens in order to develop a dual vaccine against both zoonotic diseases. A chimeric protein containing the antigenic domain of the EHEC proteins EspA, Intimin, Tir and the flagellin H7 (EITH7) was constructed and expressed in *Dpgm* deletion mutant of *B. abortus pgm* (EITH7)) and tested as bivalent vaccine in mice. We evaluated vaccine protection for EHEC-*Brucella* infection using an oral immunization with live EITH7 *Brucella* followed by sequential oral challenge with EHEC and *B. abortus* 2308. Mice were orally vaccinated at 0, 2 and 4 weeks with *pgm*(EITH7) or *pgm*, and challenged with EHEC by oral infection. Vaccinated mice showed a reduction in the time of the fecal shedding compared to the *pgm* vaccinated group (5 days versus 18 days, respectively). Consequently specific antibodies α-EITH7 were detected by ELISA in feces of *pgm* (EITH7) vaccinated mice. One week after challenge with *B. abortus* 2308, bacteria was recovered from the spleen of all the mice from the control PBS group (100%) whereas bacteria was detected in 20% of the mice vaccinated with *pgm* or 33% of the mice vaccinated with *pgm*(EITH7). In summary, mice vaccinated with *pgm* (EITH7) elicited mucosal immune responses that protect mice against an oral challenge infection with EHEC.

668. (649) SHOTGUN PROTEOMICS TO STUDY BORDETELLA PERTUSSIS ADAPTATION TO STRESSFUL CONDITIONS

Lamberti, Yanina Andrea¹; Schmidt, Frank²; Surmann, Kristin²; Cafiero, Hilario¹; Rodríguez, María Eugenia¹
Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)-UNLP-CONICET¹ Ernst-Moritz-Arndt-University of Greifswald, Germany²

Previous studies indicated that *B. pertussis* (Bp), the etiologic agent of whooping cough, is able to survive inside human macrophages. The events involved in the establishment of intracellular infection are not fully understood, but nutrient limitation and reduced oxygen tension are believed to be factors that Bp has to face to survive inside macrophages. The present study was undertaken to provide insight into Bp protein expression during these stressful conditions. We used LC-MS/MS to compare the proteomes of Bp growing under oxygen-sufficient and oxygen-limited conditions, and under nutrient starvation. A total of 1290 proteins of Bp were identified. More than 140 proteins changed significantly their expression under low-oxygen conditions, whereas 200 proteins show an altered expression during nutrient starvation (p<0.05). A significant decrease of proteins involved in cell division, amino acid and protein biosynthesis was found in both stress conditions. Also, the level of several ribosomal proteins subunits were decreased indicating a general metabolic downshift. 44 proteins were upregulated during oxygen limitation. Among them, we

found 4 proteins that have consecutive protein numbers (BP2863, BP2864, BP2867 and BP2869) and may form part of an operon. The function of these proteins has not been elucidated, however BP2864, a putative alcohol dehydrogenase, might be needed to decrease NADH levels. During nutrient starvation, more than 88 proteins were upregulated. Several proteins involved in fatty acid oxidation were increased suggesting this source of carbon under nutrient deprivation. We also observed an increased expression of two universal stress proteins, BP1315 and BP0410. These proteins may contribute to survival during growth arrest. Taken together, our results suggest that Bp, consider a fastidious microorganism, is able to adapt its metabolism to resist and survive to stressing conditions which might explain its remarkable persistence within the host.

669. (711) DEVELOPMENT OF A MOUSE MODEL OF GRA-DUAL SHIGA TOXIN 2 (STX2) INTOXICATION FOR TESTING A NEWLY DEVELOPED POLYCLONAL ANTIBODY AGAINST HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME (HUS)

Mejías, María Pilar¹; Fernández-Brando, Romina Jimena¹; Ramos, María Victoria¹; Abrey-Recalde, María Jimena¹; Meiss, Roberto²; Palermo, Marina Sandra¹
Instituto de Medicina Experimental(IMEX)-CONICET¹
Centro de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina²

Post-diarrhea HUS is a life-threatening complication of Shiga toxin (Stx)-producing *E. coli* infections (STEC), characterized by acute renal failure, thrombocytopenia and hemolytic anemia. The Stx is the main pathogenic factor and is responsible for HUS development. As such, mice are often used to explore the effects of Stx intoxication, by the intravenous administration of a high single dose. We developed an alternative mouse model of Stx2 intoxication through a protocol of incremental doses. 1LD100 of Stx2 was divided in four doses that were administered i.v. once a day for 4 consecutive days. The first two doses were lower (0.009 pmoles/mouse each dose) and the last two doses were higher (0.016 pmoles/mouse each dose), in order to imitate the release of toxin by the bacteria colonizing the intestines. We observed a dose-dependent mortality (n,% of mortality): 2 doses (18, 5.6%), 3 doses (11, 91%) and 4 doses (12, 100%) within 6 days from the first inoculation. In addition, animals developed signs of HUS (n, mean±SEM): neutrophilia (%PMN cells)(day 0: 8,18±2.4; day 4: 8, 38±2.8*; day 5: 4, 49±8.3*), leukocytopenia (leukocytes x10⁶/ml)(day 0: 8, 10.5±1.2; day 4: 8, 7.8±0.7; day 5: 4, 5.7±1.15*) and increased levels of plasmatic urea (mg%)(day 0: 8, 49.5±2.1; day 4: 8, 136.4±7.9*; day 5: 4, 374.6±24.2*). Finally, we tested the efficacy of a recently developed polyclonal anti-Stx2 antibody (Ab) to block the pathogenicity of Stx2 (in this model). Stx2 was administered daily and a single dose of Ab was administered i.v. on day 0, or 1 or 2. Ab was able to fully protect mice even when administered on day 2 (n=3). This model would provide an advantage for therapeutic experimentation. Results suggest that the administration of a highly neutralizing anti-Stx2 Ab may be therapeutically effective in humans at risk of developing HUS, if Ab is administered at an early time after STEC infection and before the accumulated effects of Stx result in irreversible structural damage.

670. (714) SCREENING OF PHOSPHORYLATED IMMUNORECEPTORS IN PATIENTS WITH ACTIVE TUBERCULOSIS: REGULATORY ROLE OF NTB-A

Pellegrini, Joaquín¹; Rovetta, Ana^{1,2}; Hernández Del Pino, Rodrigo¹; Somoza, Martín¹; Amiano, Nicolás^{1,2}; Rolandelli, Agustín^{1,2}; Gutiérrez, Marisa³; Palmero, Domingo⁴; García, Verónica^{1,2}
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹ *Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (QUIBICEN)-UBA-CONICET²* *Sección Bacteriología de la Tuberculosis, Hospital General de Agudos "Dr. E. Tornu"³* *Division Tisioneumonología Hospital F.J. Muñoz⁴*

Tuberculosis (TB), a disease produced by *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, causes nearly 2 million deaths annually. A Th1

response is required to achieve a protective immune response against *Mtb*, since the production of IFN- γ by T cells is critical for disease control. In fact, the levels of *Mtb*-induced IFN- γ secreted by cells from TB patients are markedly lower than those produced by lymphocytes from healthy donors (HD). Cytokine production by T cells can be influenced through the activation/blockage of costimulatory molecules, cytokines themselves or immunomodulatory molecules. Previously, we reported that the expression of the receptors SLAM and ICOS was increased in Th1 cells after *Mtb* lysate (*Mtb*-Ag) stimulation. Furthermore, signaling through SLAM or ICOS augmented IFN- γ secretion during active TB. Moreover, the SLAM-associated protein (SAP), CD31 and PD-1 interfered with Th1 responses in TB. In view of these results, in this study we used a screening array of phosphorylated immunoreceptors to identify molecules with differential phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from TB patients and HD upon stimulation with *Mtb*-Ag. Our results showed marked differences in several receptors (ILT2/CD85j, ILT4/CD85d, CD31). Particularly, we found a marked decrease in the phosphorylation of NTB-A (a SLAM family receptor member). Next, we analyzed the levels of NTB-A by flow cytometry. Surprisingly, 90% of T cells from TB patients and HD expressed the receptor, which was not modulated by *Mtb*-Ag. Nevertheless, the blockage of NTB-A in *Mtb*-Ag-stimulated cells, significantly diminished the production of IFN- γ and IL-17 in both groups of individuals (p < 0.05). Together, our data suggest that the reduced NTB-A phosphorylation detected in TB patients might be related to its low production of IFN- γ against *Mtb*-Ag. The study of other receptors identified here might provide new insights into the signaling pathways involved in the immune response to TB.

671. (722) GENE RELATED TO ANERGY IN LYMPHOCYTES (GRAIL) CONTRIBUTES TO T CELL HYPORESPONSIVENESS DURING THE ACUTE PHASE OF TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION

Stempin, Cinthia C.; Rojas Márquez, Jorge D.; Cerban, Fabio M
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBIC)-CONICET-UNC

Protein ubiquitination mediated by E3 ubiquitin Ligases (E3-Ubi-Lig) has emerged as a crucial mechanism involved in T cell differentiation and induction of immune tolerance. GRAIL, an E3-Ubi-Lig, has been implicated in T cell hyporesponsiveness during infections. Previously we have shown that increased GRAIL mRNA and protein levels in spleen mononuclear cells from *T. cruzi* infected mice correlated with reduced proliferative response during the acute phase of infection. The aim of this study was to investigate the mechanism involved in GRAIL regulation in T cells during *T. cruzi* infection. For this purpose, BALB/c mice were infected i.p. with 500 trypanomastigotes. Suspensions of spleen CD4 cells were prepared at 15, 21, 28, 36 and 43 dpi and compared to uninfected CD4 cells. GRAIL expression was confirmed by Western blot analysis in CD4 cells with a peak at 21 dpi while is down regulated at 43 dpi. It is known that GRAIL is regulated by otubain 1 (Otub1). CD28 costimulation, IL-2 signaling, and mTOR pathway may regulate Otub1 and GRAIL expression, controlling proliferation in naive CD4 cells. We found that down regulation of GRAIL in CD4 cells from *T. cruzi* infected mice was related to Otub1 expression and mTOR activation measured by phosphorylation of 4EBP1. In addition, we evaluated IL2 and INF γ levels in response to unspecific stimulation in CD4 cells from 15 and 43 dpi infected mice. We found that IL2 and INF γ levels were reduced at the earlier time point compared to stimulated control cells (IL2 P<0.05, INF γ P<0,001) while cytokine production was restored at 43 dpi. Besides, it has been demonstrated that GRAIL mediates CD3 degradation. We observed reduced CD3 MFI in CD4 *T. cruzi* infected cells being intensely affected at 21 dpi however it reached comparable levels to control cells at 43 dpi. Therefore, expression of GRAIL during *T. cruzi* infection may contribute with other mechanisms, to promote the immunosuppression seen during the acute stage of Chagas disease.

672. (736) TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION INDUCES THE EXPRESSION OF WNT/FRIZZLED SIGNALING PATHWAY PROTEINS INVOLVED IN MODULATE THE INFLAMMATORY RESPONSE

Volpini, Ximena; Ambrosio, Laura; Elizalde, Carina; Motran, Cristina

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

It has been postulated that Chagas disease, caused by *T. cruzi*, results from several factors such as parasite chronic persistence and progressive inflammatory destruction of target tissues. Tissue damage may be mediated by a direct effect of the parasite or/and by a harmful immune response generated by the host. Therefore, it is clear that during infection with *T. cruzi* is essential to establish, with accurately kinetics at early stages an inflammatory response (essential to the effective elimination of the parasites) followed by the activation of regulatory circuits capable to control the inflammation. Wnt/Frizzled signaling, essential for embryonic development, is induced in macrophages (Mo) by inflammatory stimulus and signal through canonical (β -catenin-dependent) and non-canonical (β -catenin-independent) pathways to amplify or control the inflammation. Our aim was to determine whether *T. cruzi* infection is able to modulate the expression of Wnt pathway's members. For that, C57BL/6 mice (n=5) were infected with 3000 trypomastigotes (tp) of *T. cruzi* and the expression of Wnt 3a, Wnt5a and β -catenin was determined by Western blot at different times post-infection (pi) in spleen mononuclear cells. *T. cruzi* infection induced an up-regulation of Wnt5a and β -catenin at the peak of parasitemia (d 17 pi) compared with non-infected mice (n=5) ($p < 0.05$). Next, Wnt proteins induction in Mo, the known host cells of *T. cruzi*, was studied in bone marrow derived Mo from wt or TLR-4 KO mice infected *in vitro* with *T. cruzi* tp (cells:tp= 1:3) for 12 h. Wnt 3a, Wnt5a and β -catenin were significantly up-regulated in Mo by the infection. Interestingly, compared to wt cells, Wnt3a expression in TLR-4 deficient Mo was reduced while Wnt5a expression was increased in response to *T. cruzi* infection. The modulation of Wnt /Frizzled signaling during *T. cruzi* infection may allow the design of more effective strategies with the purpose of enhancing the protective response and the control of pathogen inflammation.

673. (739) THE IMMUNE-ENDOCRINE RELATIONSHIP IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS AND DIABETES

Díaz, Ariana¹; Dattilio, Luciano¹; Bongiovanni, Bettina¹; Santucci, Natalia¹; Ddoli, Griselda¹; Pochettino, Arstides¹; Spinelli, Silvana¹; Nannini, Luis²; Brandan, Nadia²; Bay, Mara Luisa¹; Bottasso, Oscar¹

Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER)-CONICET¹ Servicio de Neumonología. Hospital Escuela Eva Perón. Granadero Baigorria. Santa Fe²

Diabetes is a risk factor for the development of pulmonary tuberculosis (TB) and both diseases present an alteration in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, which may mirror some immuno-endocrine-metabolic disorders. Within this context, 12 patients with TB; 11 with TB and diabetes (TB+DBT) and 14 healthy volunteers (HCo) were assessed for their plasma levels of cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), growth hormone (HGH), prolactin, thyroid hormones, insulin-like growth factor (IGF), cytokines (IL-6, IL-10, IFN γ and TNF α) and the body mass index (BMI). TB patients had a lower BMI regardless of whether they were diabetic or not ($p < 0.002$). All patients showed higher levels of circulating cortisol ($p < 0.05$) with a reduction in DHEA ($p < 0.002$), even more in those without DBT; resulting in an increased relative Cortisol/DHEA ($p < 0.03$). A remarkable increase of HGH in both groups of TB patients was found ($p < 0.001$). Oppositely, this was not accompanied by higher amounts of IGF, which instead appeared significantly reduced in TB patients, even lower in those with DBT ($p < 0.05$). As expected, TB+DBT had lower insulin levels than the other 2 groups. No between-group differences in thyroid hormones, prolactin and TNF α were seen. IFN γ ($p < 0.05$) and IL-6

($p < 0.01$) concentrations were significantly increased in all TB, even further in TB+DBT; while IL-10 was only increased in the TB group ($p < 0.05$). Measurements on the *in vitro* specific stimulation of peripheral mononuclear cells revealed a less proliferative capacity from both groups of patients. The adverse immune-endocrine profile of TB seems to be a bit more pronounced in TB+DBT patients.

674. (744) B. PARAPERTUSSIS HIDE AND PERSIST ALIVE INSIDE IMMUNE CELLS

Gorgojo, Juan Pablo; Oviedo, Juan Marcos; Rodríguez, María Eugenia

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI)-CONICET-UNL

Polymixin B protection assays have previously shown that in the absence of opsonic antibodies *B. parapertussis* survives the innate interaction with macrophages and persist intracellularly up to 48 h post infection. However, the actual location of live bacteria has never been determined. In order to investigate this issue we performed a fluorescent *in situ* hybridization (FISH) assay to image live *B. parapertussis* inside macrophages derived from human blood. Confocal analysis showed that 14% of the macrophages contained a high number of intracellular live *B. parapertussis* (~10 bacteria per cell). As assessed by immunostaining combined with FISH live bacteria in these macrophages represented 78% of the intracellular bacteria. Additional experiments demonstrated that solely those bacteria that were not colocalizing with the acid tropic dye LysoTracker were alive, confirming that the evasion of phagolysosomal fusion is required for *B. parapertussis* intracellular survival. In agreement with the hypothesis that lipid raft enrichment of the phagosome is an effective immune evasion mechanism to avoid the degradative pathway we found that live intracellular *B. parapertussis* were found in flotillin enriched phagosomes (a lipid raft marker) and retained early endosome characteristics. Since the bacterial survival within compartments that remain integral to the endosomal network carries the risk of continued sampling of bacterium-derived peptides and their presentation to T cells, we next analyzed the cell surface HLA-DR expression in macrophages infected with *B. parapertussis*. Using flow cytometry we observed that *B. parapertussis* macrophage infection inhibits HLA-DR increase in response to INF γ . Taken together these results suggest that *B. parapertussis* has evolved mechanisms that allows it to hide inside host macrophages even under inflammatory conditions.

675. (770) ROLE OF MTOR PATHWAY IN MACROPHAGE POLARIZATION AND TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION

Rojas Márquez, Jorge David; Baigorri, Ruth Eliana; Stempin, Cinthia Carolina; Cerban, Fabio

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Previously we have shown that *T. cruzi* modulates macrophage (Mo) polarization to M2 profile through the induction of arginase, generation of anti-inflammatory cytokines and up-regulation of co-inhibitory molecules such as PD-Ls. Besides, induction of M1 Mo is important to control *T. cruzi* intracellular replication. Furthermore, we have also demonstrated that mTOR pathway is activated by *T. cruzi* infection and its inhibition using Rapamycin (Rap) decreased parasite survival, modified IL-10/IL-12 balance, reduced arginase activity and expression in *T. cruzi* infected Mo. Therefore, the aim of this work was to extend the study of the role of mTOR in Mo polarization and *T. cruzi* replication. To do that, we evaluated the kinetic of mTOR activation through 4EBP-1 and p70S6K phosphorylation *in vitro* as well as *in vivo*. Bone marrow derived Mo (BMDM) infected *in vitro* showed 4EBP-1 and p70S6K phosphorylation after 6, 24, 48 and 72 hs post- infection, with a peak at 24 hs. In addition in adherent spleen cells and peritoneal Mo from *T. cruzi* infected mice 4EBP-1 phosphorylation was detected at 7, 14, 25 and 28 days post infection, with a peak at day 25. Next, BMDM were pre-treated with Rap and then incubated with *T. cruzi* trypomastigotes or in polarizing conditions with LPS + IFN-g (M1 Mo) or IL-4 (M2 Mo). Then, we examined the effect

of mTOR inhibition in iNOS/arginase balance. Surprisingly, as we have previously observed with the enzyme arginase, we have found that pre-treatment with Rap also decreased iNOS activity measured by nitrite content and down-regulated its protein expression in *T. cruzi* infected Mo. mTOR inhibition was confirmed by reduction in mTOR, 4EBP-1 and p70S6K phosphorylation at 48 hs of infection. Therefore, it remains to elucidate the mechanism/s of parasite inhibition in Rap-treated Mo. Taken together these results suggest that the modulation mTOR pathway may be important during the course of *T. cruzi* infection.

676. (808) CAPACIDAD PROTECTORA DE FORMULACIONES VACUNALES BASADAS EN VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *BORDETELLA PERTUSSIS* FRENTE A CEPAS DEFICIENTES EN ANTÍGENOS VACUNALES

Bartel, Erika¹; Ormazabal, Maximiliano¹; Carriquiriborde, Francisco¹; Flores, Darío¹; Rumbo, Martín²; Hozbor, Daniela¹

*Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)-UNLP-CONICET*¹ *Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-UNLP-CONICET*²

Pertussis es una enfermedad respiratoria aguda de origen bacteriano, causada por *Bordetella pertussis* (*Bp*). En los últimos 2 décadas pese al uso masivo de vacunas, pertussis ha resurgido en varios países incluido el nuestro. Esta resurgencia se ha asociado, entre otros factores, a la adaptación del patógeno a la inmunidad conferida por las vacunas. Recientemente se ha detectado en algunos países la circulación de aislamientos clínicos que no expresan alguno de los antígenos vacunales tales como la Pertactina (Prn) favoreciendo el escape a la inmunidad conferida por las vacunas acelulares. Nuevas vacunas se están desarrollando para poder superar estas limitaciones. Nuestro grupo ha propuesto el uso de formulaciones vacunales basadas en Vesículas de Membrana Externa (del inglés OMVs). Estas estructuras proteicas en dosis de 3µg proteína han mostrado ser protectoras y bioseguras en el modelo murino de desafío intranasal. En este trabajo se evaluó la capacidad protectora de nuestra formulación frente al desafío con bacterias que no expresan pertactina. Empleando el modelo de desafío intranasal en ratones pudimos detectar que nuestra formulación reduce en 3 órdenes de magnitud el número de bacterias recuperadas de los pulmones respecto de los animales no inmunizados ($p < 0,05$). Estos resultados indican una protección adecuada de la vacuna superando así a las actuales vacunas acelulares respecto de su protección frente a los aislamientos Prn-. Sin embargo cuando la formulación de OMVs es empleada en baja dosis (0,75µg de proteína) para emular una situación de pérdida de la inmunidad detectada con las actuales vacunas, esta capacidad se vió disminuida (2 órdenes de magnitud respecto al control, $p < 0,05$). Estos resultados si bien posicionan favorablemente a nuestra formulación sobre las actuales vacunas cuando las mismas son utilizadas en concentración de 3µg/dosis, también refuerzan la hipótesis de la posible ventaja adaptativa de cepas Prn- en poblaciones con inmunidad antipertussis debilitada.

677. (816) ANTIGENIC SIMILARITY BETWEEN MEMBRANE AND CYTOPLASMIC PROTEINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND PROTEINS OF *LARREA DIVARICATA* CAV

Pellarin, Nicolás Wilson; Méndez, Cinthia Soledad; Ferramola, Florencia Fátima; Dávila, Silvia Del Valle; Mattar Domínguez, María Aída

Universidad Nacional de San Luis

Larrea divaricata Cav. (Jarilla) is a bush widely used in folk therapy for the treatment of several pathologies. *Pseudomonas aeruginosa* proteins cross-reacted with proteins of partially purified proteins of crude extract of jarilla (JPCE). The aim of this work was to investigate if antibodies elicited with different JPCE proteins reacted with proteins from the different cellular compartments of *P. aeruginosa*. The strain used was *P. aeruginosa* ATCC 27853 and total cellular proteins (PS), membrane proteins (PM) and cyto-

plasm proteins (PC) were obtained. JPCE were partially purified by using membranes with 10, 30, 50 and 100 kDa cutoffs. Mice were immunized with fractions of JPCE and titres of IgG were obtained by using ELISA test. The immunoreactivity anti-JPCE 10, 30, 50 and 100 sera (titles $\geq 1/800$) against PM and PC antigens was evaluated by WB. The sera obtained from animals immunized with the different proteins of JPCE reacted with PS ($p \leq 0.052$), PM ($p \leq 0.002$) and PC ($p \leq 0.002$) in relation with the negative control. When PM and PC were employed as sensitizing antigens, high levels of IgG were observed with titles up to 1/1.600 and up to 1/800, respectively. The results demonstrate antigenic similarity between PM and native proteins ≥ 30 kDa and ≥ 100 kDa of jarilla. However, PC reacted with anti-JPCE50, showing cross reactivity. Immunoreactive bands between 30 and 50kDa were detected by WB when PM and PC was used as sensitizing antigens. The most reactive bands were observed when PM and PC reacted with IgG anti-JPCE30 and IgG anti-50, respectively. These results demonstrate the similarity of jarilla proteins, between 30 and 50 kDa, with membrane and cytoplasmic proteins from *P. aeruginosa*. Given that membrane proteins from *P. aeruginosa* involved in the formulation of vaccines as major immunogenic components, our results suggest the participation of proteins *Larrea divaricata* against infections caused by *P. aeruginosa*.

678. (826) DIFFERENT RESPONSIVENESS TO AHR LIGANDS OF MACROPHAGES FROM B6 AND BALB/C MICE: IMPACT ON *T. CRUZI* INFECTION

Elizalde, Carina; Ambrosio, Laura F.; Volpini, Ximena; Motrán, Claudia C.

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Despite being more resistant to *T. cruzi* infection than BALB/c mice, B6 mice are unable to expand Treg cells populations and show high mortality due to an imbalance between pro- and anti-inflammatory mediators. AhR is a ligand-activated transcription factor that binds xenobiotics that has recently emerged as a critical physiological regulator of immune responses affecting both innate and adaptive systems. Macrophages (Mo) and dendritic cells activation by TLR-ligands stimulate AhR expression which is necessary for IDO induction, kynurenines production and Treg and Tr1 cells expansion. AhR signaling can be activated by TCDD (xenobiotic), endogenous agonists like ITE, kynurenines and it is possible that constituents from microorganisms interact with AhR. The polymorphism in AhR system influence responsiveness to AhR ligands. B6 and BALB/c express AhR^{b-1} and AhR^{b-2} alleles respectively, and both strains were classified on the basis of TCDD induced CYP1A1 expression as high responder. Our hypothesis is that the differential innate immune response and Treg development observed between both mice strains after *T. cruzi* infection may be influenced by functional polymorphisms of AhR. Mo from mice of BALB/c and B6 strains were treated with TCDD (160 nM), ITE (100 nM) and *T. cruzi* lisate (10 ug/ml) for 24 h and the expression of *Cyp1a1*, *ahr* and *ido 1* determined by qPCR. *AhR* and *ido 1* expression was not affected by different ligands in both mouse strains. As was demonstrated, both AhR alleles showed similar *Cyp1a1* induction by TCDD, while Mo AhR^{b-2} (Balb/c) stimulated with ITE or *T. cruzi* showed 2-fold increase in *Cyp1a1* expression compared to Mo AhR^{b-1} (B6). In addition, *Cyp1a1* induced by *T. cruzi* was inhibited by the addition of CH223191 (AhR antagonist). Moreover, TCDD and ITE induced AhR-dependent secretion of pro-inflammatory (TNF and IL-6) or IL-10 in B6 Mo and Balb/c Mo respectively. These results suggest that the less responsive AhR allele present in B6 mice may define the magnitude of the inflammatory responses and Treg induction during *T. cruzi* infection.

679. (633) NEUTROPHILS RECRUITMENT IMPACT ON T CELL RESPONSE IN LYMPH NODES

Castell, Sofía Daiana; Harman, María F; Gorlino, Carolina V; Morón, Victor G; Maletto, Belkys A; Pistoresi, María C. *Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UBA*

Previously we demonstrated that when mice were immunized with OVA emulsified in Freund's complete adjuvant (OVA/CFA) at days 0, 15, 30, and ten days after the last immunization were injected with OVA-FITC in the footpad, the main OVA-FITC+ cells recruited in draining popliteal lymph nodes were neutrophils, this influx was dependent on an antigen-specific response (Maletto et al, Blood, 2006; Gorlino et al, Journal of Immunology, 2014). In order to reduce CFA potentially harmful effects, in the present study we performed only two immunizations, for this, mice were immunized with OVA/CFA and 15 days after boosted with OVA/IFA; IFA is Freund's adjuvant incomplete form that lacks the mycobacterial components. Ten days after the last immunization, mice were injected with OVA-FITC in the footpad and we still found neutrophils migration in draining popliteal lymph nodes ($p < 0.05$). Next we evaluated whether neutrophils recruitment impact in T cell response. We analyzed CD25 and CD69 molecules in T lymphocytes of draining popliteal lymph nodes compared with the not draining. Interestingly, we observed that in presence of neutrophils, T cells upregulate those activation markers ($p < 0.001$). Cytokines levels were measured in culture supernatants of popliteal lymph nodes cells after 72h of OVA stimulation. Importantly, higher levels of IL-17 were found in draining popliteal lymph nodes compared to not draining ($p < 0.05$). In conclusion, these results suggest that in the less harmful model of immunization we also found neutrophil recruitment in draining popliteal lymph nodes and these cells could be modulating the T cell response.

680. (704) PHENOTYPIC MODULATION OF INFILTRATING MACROPHAGES IN THE MYOCARDIUM DURING EXPERIMENTAL INFECTION WITH *TRYPANOSOMA CRUZI*

Ponce, Nicolás Eric; Sanmarco, Liliana María; Aoki, María Del Pilar

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Emerging evidence points to the involvement of specialized immune cells as key drivers in the pathophysiology of cardiovascular diseases. Infection with *Trypanosoma cruzi* is a major cause of morbidity and mortality in Latin America. Innate and adaptive immune response allow for control of parasite levels, but are insufficient to completely clear the infection and most individuals remain infected for life, with parasites persisting primarily in muscle cells. Macrophages (Ma) are one of the main infiltrating leukocytes recruited to injured myocardium and they undergo two different polarization states: M1 (inflammatory/antimicrobial) and M2 (immunoregulatory/healing). The aim of this study was to characterize the phenotypic modulation of Ma in murine cardiac tissue during the acute phase of the infection. We found that at early days post-infection (4dpi) M1 Ma (F4/80+CD68+CD86+CD206-) predominated over M2 (F4/80+CD68-CD86-CD206+) in myocardium from BALB/c mice, but since 7dpi, Ma are sustained biased toward M2 phenotype during the acute infection ($p < 0.001$). Moreover, tissue-resident Ma (F480hi CD11b+) exhibited a M2 phenotype throughout the infection, while infiltrating Ma (F480lo CD11b+) switched from M1 to M2 following the observed kinetic for total Ma. According to the soluble cues that lead the M1 or M2 polarization, we found increased levels of cardiac IL17, IL12 and TNF α exclusively at 4dpi while MCP1, TGF β , IL6 and IL10 gradually augmented during the course of the infection. In order to lengthen the M1 antimicrobial profile in the myocardium, infected mice were treated with an inhibitor of adenosine production, a purine nucleoside with immunosuppressor functions. In fact, treated mice prevented the M1 to M2 phenotypic conversion sustaining the M1 biased profile at 7dpi. Together these results highlight the importance of studying new strategies to shape Ma functions in order to eradicate the parasite, minimize tissue damage and favoring a properly wound-healing.

681. (712) ACTIVATED NK CELLS REPROGRAM REGULATORY DENDRITIC CELLS INTO MATURE DENDRITIC-LIKE CELLS

Torres, Nicolás J.; Raffo, Ximena Lucía; Ziblat, Andrea; Spallanzani, Raúl Germán; Domaica, Carolina Inés; Fuertes, Mercedes Beatriz; Zwirner, Norberto Walter.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET

Reciprocal crosstalk between dendritic cells (DC) and NK cells plays an essential role during the immune responses against tumors. In addition, tumors promote the recruitment of regulatory dendritic cells (regDC), which contributes to immune escape. regDC also have been involved in the maintenance of immune tolerance. Previously, we demonstrated that regDC restrain NK cell activation through an NKp46-mediated regulatory mechanism. However, the consequences of the crosstalk between regDC and activated NK cells remain unknown. Thus, the aim of this work was to explore the outcome of such crosstalk using murine NK cells stimulated with agonists TLRs and IL-12. We obtained immature DC (iDC) from bone marrow cells differentiated for 6 days with GM-CSF. To obtain mature DC (mDC) and regDC, iDC were stimulated overnight with 25ng/ml of LPS (mDC) or 25ng/ml of LPS and 100nM of dexamethasone (regDC). We observed that regDC induced a ten-fold reduction in proliferation of allogeneic splenocytes as compared with mDC ($p < 0.05$). Flow cytometry analyses revealed that co-culture of regDC with NK cells pre-stimulated overnight with IL-12 and polyI:C (a TLR3 agonist), but not IL-12 alone, polyI:C alone or Loxoribine (a TLR7 agonist) alone or in combination with IL-12, induced and up-regulation of the activation markers MHC-II and CD86, suggesting that NK cells activated with IL-12 and polyI:C partially reverted the regulatory phenotype of regDC. Moreover, these regDC pre-cultured with NK cells previously stimulated with IL-12 and polyI:C, but not regDC cultured with NK cells previously stimulated with IL-12 alone, Loxoribine or IL-12 and Loxoribine stimulated the proliferation of naïve allogeneic splenocytes up to values comparable to mDC ($p < 0.05$). Therefore, we conclude that NK cells stimulated with polyI:C and IL-12 acquire the ability to revert the phenotype and stimulatory function of regDC, which might be relevant in the formulation of novel anti-cancer therapies.

682. (716) SYSTEMIC INFECTION WITH *CANDIDA ALBICANS* INDUCES DECTIN-1 EXPRESSION IN BRAIN

Vigazzi, Cecilia; Miró, María Soledad; Icely Paula Alejandra; Rodríguez, Emilse; Cejas, Hugo; Sotomayor, Claudia Elena.

Dpto. de Bioquímica Clínica, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Candida albicans is an opportunistic fungus that can cause brain infection in infants and immunocompromised host. Recognition of wall structures by *C. albicans* glucan receptor Dectin-1 is essential for the antifungal response in the periphery. At present little is known about the expression of this receptor in the Central Nervous System (CNS). Our objective was to evaluate the expression of Dectin-1 in the brain during the course of disseminated infection by this fungus. Male C57BL/6 mice were injected iv with $2.5 \cdot 10^6$ viable yeasts (ATCC36801) and at 12, 24, 48 and 72h post-infection (pi), animals were weighted to determine the Index of Body Weight (IBW) and sacrificed to obtain kidney, liver and brain to different studies: organ weight, fungal burden (CFU), histopathological changes (HE) and Dectin-1 expression (WB). The infection caused a significant decrease in the IBW of infected animals that was observed from 12h pi ($p < 0.05$). After fungal hematogenous spread kidney and liver were severely infected, and fungal burden was higher from 12h and lasted until 72h pi ($p < 0.05$); ongoing the infection increased of kidney weight was detected after 24h of fungal injection. *C. albicans* was able to cross the blood brain barrier and establish in the brain parenchyma; presence of invasive morphotype were observed (HE). Significant levels of CFU were recovered from 12h pi, and fungal load was maintained throughout the study kinetics ($p < 0.05$). The brain weight of animals 24h pi was higher than during other points of the study. The Dectin-1 expression showed a progressive increase along the different days of infection. These results provide novel evidence about the participation of β -glucan receptor in *C. albicans* recognition in brain, suggesting that Dectin-1 could have some implications in the local response during the neurocandidiasis.

683. (740) INVOLUCRAMIENTO DE DIFERENTES POBLACIONES CELULARES DEL HUÉSPED EN EL FENÓMENO STIR DETECTADO EN LAS INFECCIONES DE *BORDETELLA PERTUSSIS*

Zurita, María Eugenia¹; Moreno, Griselda²; Gaillard, María Emilia¹; Bottero, Daniela¹; Rumbo, Martín²; Hozbor, Daniela¹

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)-CONICET-UNLP¹ Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP²

La estimulación exacerbada de la respuesta inmune innata (STIR) en vías aéreas evita el progreso de las infecciones pulmonares causadas por *Bordetella pertussis*. Recientemente hemos demostrado que este fenómeno es inducido in vivo por LPS vía TLR4 e implica la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS). El objetivo de este trabajo fue identificar la contribución al fenómeno STIR de poblaciones celulares presentes en el pulmón del huésped. En particular evaluamos la contribución de las células epiteliales (células de línea A549, Neumocitos tipo II) y de los macrófagos alveolares (MA, extraídos de ratones). Para evaluar la capacidad de estas células de producir ROS realizamos como primera medida un ensayo para ajustar las condiciones de trabajo *in vitro*, utilizando diferentes dosis de LPS (0,1; 0,5 y 1 µg) y distintos tiempos de estimulación (1, 2, 3, 4 y 24 h). Pudimos establecer que a las 2h y con una concentración de 0,5 µg de LPS los niveles de ROS medidos por el método de DCFH-DA respecto del control sin LPS fueron: para las A549 2,95 ± 1,07 vs 1,01 ± 0,19 y para los MA 2,59 ± 1,50 vs 1,00 ± 1,39. En base a estos resultados procedimos a evaluar si en estas condiciones el ROS inducido por el LPS es capaz de eliminar a *B. pertussis* según observáramos in vivo. Para ello se coincubó *B. pertussis* (MOI 100:1) con las células A549 o MA por 2h en presencia de 0,5 µg de LPS. Los recuentos bacterianos mostraron que los MA fueron capaces de reducir el número de bacterias extracelulares (15 veces menos respecto del control) y las A549 las intracelulares. Los resultados presentados parecen indicar que tanto los Neumocitos tipo II como los macrófagos alveolares presentan capacidad para producir ROS en respuesta a la estimulación con LPS y que esta respuesta se correlacionaría con su capacidad para inducir la muerte de *B. pertussis* intracelularmente en el caso de los Neumocitos tipo II y extracelularmente en el caso de los macrófagos alveolares.

684. (756) INTERACTION OF PEPTIDOGLYCANS RECOGNITION PROTEINS (PGRPs) WITH MONOCYTES/MACROPHAGES CELLS

Todone, Marcos^{1,2}; Parrado, Cecilia¹; Romasanta, Pablo¹; Fernández Lynch, M Julieta¹; Noli Truant, Sofía¹; Antonoglou, M. Belén¹; Sarratea, M. Belén¹; Fernández, Marisa¹; De Marzi, Mauricio^{1,2}; Malchiodi, Emilio¹

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA¹ Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES), Departamento de Ciencias Básicas, UNL².

PGRPs are pattern recognition receptor that binds peptidoglycan (PGN). Previously, we have determined that PGRPs bind to monocytes/macrophages (THP-1) cell membrane increasing their capacity to phagocytose bacteria and promoting a potent inflammatory response. In the present work, we incubated THP-1 cells with PGRP-S, PGRP- α or PGRP- β conjugated with FITC at 37°C and analyzed the results, in the presence of Trypan Blue to quenching the extracellular fluorescence, by flow cytometry (FC) and fluorescence microscopy. We found an increase of 250-300% in FITC fluorescence signal in cells treated with PGRP-FITC respect to controls, suggesting that internalization is effectively occurring after binding. The presence of wortmannin in culture cells did not reduce the incorporation of PGRPs. These results suggest that macropinocytosis would not play a major role in PGRPs uptake. Moreover, PGRP-PGN or PGRP increases 30-100% the level of NF- κ B expression respect their respective controls of cells treated or not with PGN. These results suggest that a cellular receptor

would be able to recognize PGRPs. Moreover, preliminary results indicated that anti-TLR-2 antibodies reduce PGRPs binding to THP-1 cells. We observed that PGRPs not only diminish apoptotic process produced by PGN, but they also reduce apoptotic process of cells in cultures without PGN. In order to verify this phenomenon we use the LIVE/DEAD Cell Vitality Assay Kit to determine membrane integrity and THP-1 cell viability observing that PGRP or PGRP-PGN decrease ~50% the incorporation of Sytox Green by THP-1 cells respect to controls. Moreover, PGRPs or PGN-PGRPs increased 20-30% the metabolic activity of THP-1 cells respect controls determined as resazurin incorporation by FC. In all, these results suggest that the PGRPs mediated bacteria/PGN phagocytosis after been recognized by a cell receptor and protect cells from apoptosis induced by PGN or bacterial infection increasing their metabolic activity.

685. (776) REQUIREMENT OF AUTOPHAGY FOR IL-1 β SECRETION IN HUMAN NEUTROPHILS

Lula, Leonardo¹; Keitelman, Irene¹; Sabbione, Florencia¹; Jancic, Carolina¹; Trevani, Analía^{1,2}

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-Academia Nacional de Medicina¹ Depto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA²

Interleukin-1 β (IL-1 β) is a pro-inflammatory cytokine synthesized in the cytoplasm as a precursor, pro-IL-1 β , which has to be proteolytically processed to acquire biological activity. In human neutrophils (PMN) IL-1 β processing is dependent of caspase-1 and elastase and/or proteinase-3. The release of IL-1 β does not follow the conventional ER-Golgi route of secretion, being secreted by poorly-defined non-conventional secretory pathways. The current study was undertaken to test the hypothesis that a non conventional autophagy (Au) mechanism is required for neutrophil IL-1 β secretion. We have previously determined that the Au inhibitors 3-MA, wortmannin and Bafilomycin A1 inhibit IL-1 β secretion induced by LPS and LPS+ATP. In this study we determined that in response to these agonists, the secretion of IL-8, a cytokine whose release follows the canonical ER-Golgi pathway, was not regulated by the above mentioned inhibitors. We also observed that Au stimulation by starvation promoted IL-1 β secretion induced by both agonists (n=4; p<0.01) but did not affect IL-8 secretion (n=4). We also found that neither the Au inhibitors nor starvation significantly affected PMN viability evaluated by annexin V-FITC/IP staining. Quantification of confocal microscopy (CM) images indicated that 74±5% of LPS+ATP-stimulated PMN exhibited autophagy vesicles (LC3B+) vs 3±1% of unstimulated cells and in 39±4% of the stimulated cells, IL-1 β colocalized with LC3B vs 4±1% in unstimulated cells (n=3; p<0.001). Kinetic studies performed in PMN stimulated for 3, 4 and 5 h that in parallel evaluated Au and IL-1 β secretion showed that lipidated-LC3B increased upon LPS+ATP stimulation and then decreased in currently to the secretion of IL-1 β to supernatants. Altogether, our findings confirm that Au is part of the pathway involved in IL-1 β exportation from PMN.

686. (381) DEVELOPMENT OF A NOVEL MURINE MODEL FOR THE STUDY OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA OVEREXPRESSING THE MUTAGENIC ENZYME AID

Morande, Pablo; Prieto, Daniel; Abreu, Cecilia; Sotelo, Natalia; Correa, Agustín; Ortega, Claudia; Crispo, Martina; Opezzo, Pablo

Instituto Pasteur de Montevideo. República Oriental del Uruguay

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a hematologic disease characterized by slow accumulation of clonal CD5+ B lymphocytes in peripheral blood (PB), bone marrow and lymphoid organs. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is an enzyme able to induce DNA mutations and whose activity is tightly regulated. Uncontrolled AID activity is related to the origin of several neoplasm diseases. We previously described that progressive CLL patients aberrantly express AID in CLL B-cells of PB (Opezzo et al, Blood 2005), specifically in a small proliferative subset (Palacios et al., Blood 2010 and Leukemia 2014). The aim of the present work was

to evaluate the role of AID in CLL disease progression, planning is to determine whether during the development of the leukemia AID can introduce DNA changes that lead to a more aggressive tumor development. To that aim we used a murine model that mimics a progressive CLL disease, the transgenic Eu-TCL1 mice. This strain develops an aggressive IgM+CD5+ leukemia starting at 8 months of age and due to over expression of the TCL1 gene in B cells. We crossed TCL1 mice with AID transgenic mice and obtained the double transgenic AID/TCL1 mice (DT), which resulted viable and showed no evident inborn alterations. Gene presence at the DNA genomic level was verified by PCR and quantitative PCR (qPCR); and gene expression was measured by qPCR in PB and spleen cells, for both TCL1 and AID transgenes. DT mice expressed TCL1 and showed higher expression of AID as compared to its monotransgenic TCL1 control, for both SP and spleen cells (n=5, p<0.05). Percentages of leukemic IgM+CD5+ cells in PB and spleen of DT mice of 4 and 6 months of age were increased as compared to TCL1 mice (n=5, p<0.05). We conclude that this novel murine model is viable and feasible to use for future studies, and that our preliminary results enable us to speculate of a more aggressive leukemic kinetics in DT mice as compared to TCL1 strain, due to AID over expression.

687. (653) ON THE MECHANISMS UNDERLYING THE IMMUNOSTIMULATORY THEORY OF CANCER

Chiarella, Paula^{1,2}; Machuca, Damián^{1,2}; Montagna, Daniela R.^{1,2}; Dran, Graciela^{1,2}; Meiss, Roberto P.¹; Ruggiero, Raúl A.^{1,2}

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET¹ Laboratorio Oncología Experimental-IMEX-CONICET-ANMF²

There is a generalized belief that the worst possible outcome for the application of immunological therapies against cancer is a null effect on tumor growth. However, the immunostimulatory theory (IT) of cancer suggests that, upon certain circumstances, the growth of tumors can be accelerated, rather than inhibited, by the specific immune response (IR) designed to attack the tumor. In this work, we have confirmed and extended the empirical basis of the IT demonstrating that the IR evoked by strongly immunogenic chemically-induced and weakly immunogenic spontaneous murine tumors is biphasic, with weak IRs inducing stimulation and strong IRs inducing inhibition of tumor growth. In line with these observations, we could also demonstrate that most spontaneous murine tumors (12 of 15) grow in an accelerated way in pre-immunized hosts (p<0.01) and grow more slowly -instead of faster as strongly immunogenic tumors do- in immunodepressed mice (p<0.01). These results do not fall in easily with a linear and monotonic IR curve but is consistent with the biphasic IR curve postulated by the IT. Our experiments also revealed that a weak T-dependent anti-tumor IR could not explain by itself the phenomenon of tumor-immunostimulation. However, the interaction of specific anti-tumor immune cells (but not naïve or immune cells to another tumor) and target tumor cells at a low ratio induced the production of RANTES and MIP-1 α chemokines, which recruited resident macrophages to the tumor site which in turn, upon TLR4 activation, would recruit more macrophages which might produce growth-stimulating signals for the residual tumor cells. In addition, attempts to treat established tumors displaying weak or strong immunogenicity by immunological schedules demonstrated that anti-tumor vaccines may produce inhibitory, null or stimulatory effects on tumor growth depending on the antigenic profile of the tumor, the immunogenic strength of the vaccine and the immunological state of the host.

688. (656) TYPE I IFNS SIGNALS ON HOST CELLS MODIFY THE PATTERN OF TREG INFILTRATION IN B16 MELANOMA TUMORS

Araya, Paula¹; Nocera, David Andrés¹; Roselli, Emiliano¹; Núñez, Nicolás Gonzalo¹; Gatti, Gerardo²; Maccioni, Mariana¹

Dpto. de Bioquímica Clínica- Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC¹ Fundación por el Progreso de la Medicina²

Early induction of type I IFNs is crucial in priming the antitumor immune response and in controlling tumor growth. Type I IFN signals through its receptor IFNAR, present in several cell types. In contrast, Tregs can compromise an effective antitumor immune response when recruited to the tumor site. In this work, we investigate whether the levels of type I IFN (generated spontaneously or upon therapeutically treating tumor-bearing animals with Poly AU (pAU), a TLR3 ligand) can modulate the biology of Tregs in the tumor microenvironment. B16 melanoma cells generated larger tumors in *ifnar*^{-/-} than in C57BL/6 (wt) mice (p<0.05), which were infiltrated with reduced numbers of CD45+ cells per gram of tumor (*ifnar*^{-/-}:1.08x10⁶/gr vs wt:6.4x10⁶/gr, p<0.05). However, a higher frequency of CD4+T cells and a lower percentage of CD4+CD25+Foxp3+T cells were found among CD45+ cells in tumors developed in *ifnar*^{-/-} compared to wt mice (CD4+:35% vs 19%; CD4+CD25+Foxp3+:0.8% vs 8.75% respectively). When draining (DLN) and non-draining lymph nodes (NDLN) were evaluated in both strains of mice, smaller LN were observed in *ifnar*^{-/-} (p<0.05), but strikingly, a 4-fold increase in the number of CD45+ cells were present in *ifnar*^{-/-} DLN and NDLN. Interestingly, whereas the frequency of CD4+T cells did not differ between LN in both strains, the percentage of CD4+CD25+Foxp3+T cells among the total CD45+ population was higher in *ifnar*^{-/-} LN, mainly in DLN (*ifnar*^{-/-}:3.39% vs wt:1.92%). Intratumoral treatment with pAU, inhibited tumor growth and increased mice survival in wt mice but not in *ifnar*^{-/-}. Lower numbers of CD4+CD25+Foxp3+T cells were found in pAU treated tumors compared with non-treated ones; even more, these Foxp3+ cells expressed 2-fold decreased levels of LAP1, a marker associated with TGF β production. A decreased expression of CCL22 and CCL17 mRNA was found in pAU treated tumors. Thus, type I IFN signals on host cells modified the pattern of Treg infiltration in B16 melanoma tumors.

689. (661) ISOLATION OF TUMOR EXOSOMES WITH IMMUNOREGULATORY PROPERTIES FROM THE ASCITIC FLUID OF TUMOR BEARING MICE

Menay, Florencia; Cocozza, Federico; De Toro, Julieta; Vendrell, Alejandrina; Waldner, Claudia; Mongini, Claudia Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-UBA

Exosomes (Exo) are micro vesicles of 60-100 nm secreted by most cells. Tumor derived Exo may have either immunostimulating or immunosuppressant properties. The aim of this work was to isolate and define the immuno-modulating characteristics of Exo derived from the ascitic fluid obtained from T-cell lymphoma bearing mice. BALB/c mice were inoculated ip. with 1,00E+06 LBC cells and after 20 \pm 2 days ascites were collected by ventral puncture. Exo were isolated by a serial of differential centrifugation, ultrafiltration and ultracentrifugation at 100,000xg. The microvesicles were characterized by their floating density in a sucrose gradient and the presence of marker proteins Alix, Tsg, CD63, Hsp70 determined by Western blotting and flow cytometry. To study the immune properties *in vivo*, BALB/c mice were immunized twice with 20 μ g /mouse with an interval of 7 days and 14 dpv were challenged with 1,00E+06 LBC. To assess the specificity of the immune response generated, mice that rejected LBC tumor, were re-challenged with 2,00E+05 cells of the breast adenocarcinoma LM3. Fifty percent of the mice immunized with Exo did not develop tumors, while the tumor incidence in control mice (non-immunized and challenged with the LBC cells) was 100% (n = 8). All LBC tumor free mice that were re-challenged with tumor cells developed the LM3 breast tumor. The humoral immune response induced was studied in sera obtained from immunized mice and compared with those from naïve mice, by dot and Western blot. All mice studied had high titre of serum antibodies against both Exo and LBC cells. Antibodies recognized proteins of 45 and 50 kDa present in the Exo as determined by Western blot. We conclude that Exo are present in the ascitic fluid of LBC tumor bearing mice and have immune-stimulating properties. The immune response elicited in hosts was specific as it was sufficient to prevent tumor development but failed to prevent the progression of a non-related tumor.

690. (665) RELEVANCE OF GALECTIN 7 (GAL7) IN SKIN-RELATED IMMUNE DISORDERS DURING CARCINOGENESIS

Pinto, Nicolás Alejandro; Maller, Sebastián Matías; Rabinovich, Gabriel Adrián; Cerliani, Juan Pablo
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET

Galectins are members of a family of b-galactoside binding proteins, which have been involved in a number of biological processes such as immune system homeostasis. In particular, Galectin-7 (Gal7) is differentially expressed in all stratified epithelia mainly in the epidermis. It has been described that under physiological conditions Gal7 contributes to skin homeostasis, showing an augmented expression in inflamed skin. However, its expression in cancer-skin models has shown contradictory results. In this sense, some groups found lower levels of Gal7 expression in epidermal tumors, while others observed a higher expression of this lectin in transformed keratinocytes cell lines. The epidermis has several specialized cells including Langerhans cells (epidermal dendritic cells (LCs), CD207+CD11b+CD205+) that remain anchored to keratinocytes through E-Cadherin specific interactions. The relevance of LCs in immune response to skin tumors has not been elucidated. The aim of this work is to examine the relevance of Gal7 and glycan-LCs interactions in the skin immune system using a carcinogenesis model. We observed that Gal7-glycan binding endows LCs with a tolerogenic phenotype that promotes T cell differentiation towards a Treg (CD4+CD25+FoxP3+) profile ($p < 0.05$). We established a chemically-induced carcinogenic model in *wild type* (WT), *Gal7 knock out gal-7^{-/-}* (KO), and Gal7 transgenic (Tg) mice (*Tg46*, which over-express Gal7) during 3 months using DMBA and TPA. Tg draining lymph nodes of treated mice, develop a higher frequency of Treg cells ($p < 0.05$) in comparison to KO and WT mice, thus contributing to a tolerogenic immune response. In addition, Tg mice showed an increased skin hyperplasia/dysplasia as compared with WT or KO mice. Our results suggest that Gal7 promotes a tolerogenic microenvironment in the skin favoring keratinocyte transformation and proliferation disorders.

691. (666) CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL): THE CLINICALLY RELEVANT DRUG R406 IMPAIRS T CELL ACTIVATION AND PROLIFERATION

Colado, Ana¹; Borge, Mercedes^{1,2}; Podaza, Enrique¹; Fernández Grecco, Horacio³; Cabrejo, María³; Bezares, Fernando Raimundo⁴; Giordano, Mirta^{1,2}; Gamberale, Romina^{1,2}
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET-ANM/ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA² Hospital Méndez³ Hospital Alvarez⁴

Despite advances in the treatment of CLL patients, the disease remains incurable with standard therapies and relapse is inevitable. Leukemic B cells survive and proliferate within lymphoid tissues in close contact with stroma, myeloid cells and T lymphocytes. Activated T cells support the accumulation of the leukemic clone by producing soluble and contact dependent factors, such as IL4 and IFN γ and the expression of CD40L. Several orally bioavailable kinase-inhibitors are currently being tested in clinical trials with promising clinical responses and minimal side effects. This is the case of the SYK inhibitor Fostamatinib (R788) which is converted in vivo into its bioactive form R406 and favors the redistribution of CLL cells from lymphoid tissues to circulation. R406 reduces leukemic cell migration, chemokine secretion and BCR signaling in vitro. The objective of this study was to determine whether R406 is able to impair the activation, proliferation and migratory response of T cells from CLL patients. We first evaluated R406-induced apoptosis on T cells from CLL patients, finding significant levels of apoptosis only at the higher dose used (40 μ M, $p = 0.02$). Then we wondered whether clinically relevant doses of R406 (<5 μ M) were able to inhibit T cell activation and proliferation. To this aim, PBMC from CLL patient were cultured with or without R406 in the presence of isotope control or anti-CD3 antibodies. We found that R406 impaired the expression of the activation markers CD25, CD69 and CD40L on T cells, evaluated by flow cytometry at 24hs ($p < 0.05$) and the T-cell proliferation evaluated by the CFSE

dilution assay at 5 days ($p < 0.05$). We also observed, by using the Transwell system assay, that R406 inhibits T cell migration towards CXCL12 ($p = 0.01$). Our results suggest that R406 may be successful in the treatment of CLL patients because of its effect not only on the malignant B cell but also on the T cells from the supportive microenvironment.

692. (713) THE OROGASTRIC VACCINATION WITH AN ATTENUATED STRAIN OF SALMONELLA TYPHI, TRIGGERS AN IMMUNE RESPONSE THAT PROMOTES METASTATIC CELLS ELIMINATION IN THE LIVER

Vendrell, Alejandra¹; Tesone, Agustina¹; Menay, Florencia¹; Coccoza, Federico¹; Gravisaco, María J.²; Goin, Juan C.¹; Larotonda, Gerardo³; Canellada, Andrea⁴; Mongini, Claudia¹; Waldner, Claudia¹
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET-UBA¹ Instituto de Biotecnología, INTA Castelar² Lavet Lab Argentina³ Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET-UBA⁴

Previously, we showed that the administration of CVD 915 via the orogastric route (o.g.) 24 h before tumor challenge can prevent implantation of LM3 cells in the liver, in a mouse model of liver metastasis. Twenty days after tumor challenge, treatment with CVD 915 significantly decreased the occurrence of liver metastases and total tumor volume. The aim of this work is to elucidate the immune mechanisms involved in the antitumor effect. For this purpose, 1×10^9 UFC of CVD 915 was inoculated via o.g. in a group of BALB / c mice, while another group received PBS as a control. After 24 h, mice were injected with 100000 LM3 cells (mammary adenocarcinomas) into the spleen in a surgical frame and underwent splenectomy. After 24 h of the o.g. gavage with the bacteria, we find an innate immune response activation at the liver, characterized by a significant increase in IFN- γ production ($p < 0.05$) by intrahepatic immune cells (IHIC) from treated mice. Also, we found an increase in the population of natural killer and neutrophils (Gr1⁺) in the spleen ($p < 0.05$). Furthermore, we found after 20 days of tumor challenge, a specific immune response in the liver with an increase in the population of CD4⁺ cells of the IHIC ($p < 0.05$) and a significant increase in the IFN- γ , TNF- α and IL-2 production in cultures of IHIC from treated mice ($p < 0.05$). Indeed, we demonstrated the IFN- γ and TNF- α tumor-specific production when co-culturing the IHIC or the liver draining lymph nodes (the portal and celiac) cells with LM3 cells ($p < 0.05$). These results indicate that immunization with CVD 915 via o.g. route induces an antitumor immune response which reduces the metastases development in a vital organ. The use of this vaccine as an adjunct therapy to conventional cancer treatments, such as surgery, should be assessed in the future.

693. (433) PARTICIPATION OF IFN GAMMA IN IL-12 PLUS IL-18-INDUCED NEUROINFLAMMATION

Gaviglio, Emilia Andrea; Peralta Ramos, Javier María; Arroyo, Daniela Soledad; Bussi, Claudio; Rodríguez-Galan, María Cecilia; Iribarren, Pablo
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC

Microglial cells (MC) are key immune cells within the central nervous system (CNS). They participate in CNS homeostasis and become activated once they contact pro-inflammatory signals. Some CNS injuries are accompanied by cell infiltration, which could contribute to tissue damage and to induce persistent activation of MC. Hydrodynamic injection of IL-12 and IL-18 cDNAs has previously been reported to generate high and persistent systemic levels of IL-12, IL-18 as well as IFN gamma (IFN γ) and TNF alpha (TNF α) and to induce leukocyte recruitment and activation of MC in the brain. Since IL-12 and IL-18 were able to induce increased levels of IFN γ and TNF α in mice, we wanted to evaluate the impact of systemic absence of TNF α or IFN γ on the neuroinflammatory response. Therefore C57BL/6J, TNF α KO and IFN γ KO mice were injected intravenously by hydrodynamic shear with the cDNAs for IL-12 plus IL-18 or control plasmid. Seven days after injection, mice

were sacrificed perfused with HBSS and brains were collected. Cells suspensions were obtained for analysis of brain inflammatory cells using flow cytometry. Data demonstrated that the effects of hydrodynamic injection of IL-12 plus IL-18 were not affected by the absence of TNF α , however, IFN γ deficiency decreased the number of recruited cells (CD45 high CD11b+) ($p < 0.05$), which were mainly CD45 high CD11b+ Ly6C+ ($p < 0.05$). Besides, IFN γ KO mice hydrodynamically injected showed reduced levels of MHC II molecules in both parenchymal MC (CD11b+CD45 low) ($p < 0.01$) and CD45 high CD11b+ ($p < 0.001$) recruited cells, compared with WT mice. Moreover, in IFN γ KO mice the hydrodynamic injection of IL-12 and IL-18 failed to induce splenomegaly ($p > 0.05$). Systemic expression of IL-12 and IL-18, in the absence of LPS, induces leukocyte recruitment to the brain and activation of resident MC. Interestingly, IFN γ seems to participate in monocyte recruitment into the CNS and activation of resident MC.

694. (815) CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL TEJIDO PROSTÁTICO POST ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE LIPOPOLISACÁRIDOS EN RATAS SPRAGUE DAWLEY ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN SEMILLAS DE CHÍA (SALVIA HISPÁNICA)

Martínez, Gustavo; Montes, Evelyn; Aquino, Marlen; Rocha, Maykon; Simón, Eduardo; Vaquero, David; Ivona, Javier; Oliveira Da Silva Pacheco, Sandaly; Pacheco, Fabio Juliano
Universidad Adventista del Plata

Introducción: Animales expuestos a lipopolisacárido (LPS) desencadenan una compleja respuesta inmunológica. Se ha sugerido que el consumo de alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados podría modular la respuesta inflamatoria, pero se desconocen hasta qué grado y contra cuales estímulos. **Objetivos:** Evaluar la histomorfología de la próstata de ratas Sprague Dawley alimentadas con una dieta rica en chía a la exposición intraperitoneal de LPS de *Escherichia Coli* cepa 055:B5. **Metodología** **Introducción:** La chía es conocida por contener concentraciones elevadas del ácido α -linolénico, precursor del ácido docosahexaenoico y del ácido eicosapentaenoico, ω -3. **Materiales y métodos:** Los animales fueron separados en 2 grupos, un grupo recibió la dieta con chía (GCh) y el otro recibió la dieta control (GC). Los animales fueron alimentados por un periodo de 13 meses y luego sacrificados. Doce horas antes del sacrificio 5 animales del GCh y 5 del GC fueron inoculados intraperitonealmente con LPS, a su vez los otros 5 animales del GCh y el GC fueron inoculados con solución fisiológica estéril. **Resultados:** En las secciones histológicas de próstata, se evaluó la presencia de inflamación intersticial. Las muestras se clasificaron en sin inflamación, inflamación moderada e inflamación acentuada. Los GCh y GC que fueron inoculados con solución fisiológica y el GC inoculado con LPS presentaron en 40% de los animales la próstata sin inflamación, 60% con inflamación moderada y ninguno con inflamación acentuada. El GCh inoculado con LPS presentó en su mayoría inflamación acentuada. **Conclusión:** El tejido prostático de animales del GCh presentó respuesta inflamatoria más marcada en relación a los otros grupos.

695. (685) AGAMMAGLOBULINEMIA: 30 YEARS FOLLOW UP IN A SINGLE CENTER IN ARGENTINA

Moreira, Ileana; Bravo Kleiman, Alejandra; Seminario, Ana-lía; Esquivel, Myrian; Gómez Raccio, Andrea; Di Giovanni, Daniela; Bezrodnik, Liliana
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Introduction: Agammaglobulinemia is a primary immunodeficiency characterized by early onset of recurrent bacterial infections, very low immunoglobulins levels and fewer than 2% circulating B cells. **Methods:** Retrospective analyze of medical records of patients with agammaglobulinemia of one center from Argentina, followed since 1994. **Results:** 31 patients were studied, all of them male. 26 patients present a BTK mutation, 1 presents a μ heavy chain mutation, 2 are actually being study, and in other 2 there were not found any mutation. Mean age of the first symptoms:

9.6 months. Mean age at diagnosis: 31.9 months (Excluding one patient diagnosed at 80 years old). 25 patients were diagnosed because of recurrent infections and 6 because of positive family history. Patients with family history were diagnosed earlier than those without it. (Mean: 20 vs 34.9 months). Pulmonary infections were the most frequent infections before diagnosis. Bacterial pneumonias, otitis, sinusitis, meningitis, arthritis and sepsis were reduced after an adequate immunoglobulin (IG) treatment, also hospitalizations. 10 patients have bronchiectasis, 7 patients other sequelae. Actually 4 patients were died and 8 are over 18 years old. 23 are under Intravenous IG (IVIG) treatment and 4 patients are using Subcutaneous IG (SCIG). Mean doses: 599 mg/k/month with IVIG, and 793 mg/k/month with SCIG. Mean serum IgG level: 784 mg/dl with IVIG and 1060 mg/dl with SCIG. **Conclusion:** During this time the patients have presented an acceptable survive, reaching now a days some of them the adulthood. With the adequate treatment we observed a significant reduce in the severe infections and the hospitalizations.

696. (732) DESCRIPTION OF A COHORT OF PATIENTS WITH CHRONIC MUCOCUTANEOUS CANDIDIASIS

Esquivel, Myrian Ines; Moreira, Ileana; Bravo Kleinman, Alejandra; Caldirola, Soledad; Esnaola, María; Carabajal, Patricia; Gómez Raccio, Andrea; Di Giovanni, Daniela; Bezrodnik, Liliana
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Chronic mucocutaneous candidiasis (CMC) is a *Candida* non-invasive infection that affects skin, nails and mucous membranes. To date, five genes are associated with CMC (IUIS 2014): IL-17RA deficiency, IL-17F deficiency, GOF STAT1, ACT1 deficiency and also it could be presented with AIRE and STAT3 mutations. **OBJECTIVES:** To describe patients with CMC followed in our center and analyze phenotype and genotype features. **METHODS:** Retrospective analysis of medical records of patients with confirmed or suspected CMC. **Inclusion criteria:** proven *Candida* infection in skin, nails and/or mucous membranes that were recurrent, persistent or refractory. **Exclusion criteria:** invasive infection by *Candida*; CMC due to drugs or HIV. **RESULTS:** 15 patients were selected according to the study criteria. 9 female, 6 male. 7 patients started with symptoms at infancy, 4 in early-childhood, 2 during late-childhood, 1 in adulthood. 6 of them had only CMC whereas 9 patients presented with multiple infections by other microorganisms. Besides, 4 patients had hypothyroidism, 3 chronic hepatitis, 2 hypocalcemia, 1 early menopause, 1 with cerebral aneurysms. No deaths or sequelae. **Laboratory findings:** 4/15 presented hypo IgA, 5/15 hyper IgE, 5/10 impaired antibody polysaccharide response. 6/13 CD4 lymphopenia and 8/13 diminished NK cells. 4 patients have GOF STAT1 mutation, 1 have STAT1 polymorphisms, 1 with suspected STAT1 mutation, 4 HIES (2 with STAT3 mutation), 3 suspected APECED; and 1 have not defined phenotype. 1 patient has not IDP (Acrodermatitis enteropathica). **Treatment:** 12 patients are under antifungal prophylaxis and 4 receive immunoglobulin treatment. **CONCLUSION:** Our cohort has different IDP with a wide phenotypic presentation. Although multiple concomitant infections and other complications, there were not deaths or sequelae by CMC. Due to the number of patients without molecular diagnosis, we can infer that there could be other predisposing mutations which are not elucidated yet.

697. (811) CELIAC DISEASE ANTIBODIES AND SMALL BOWEL HISTOLOGICAL PATTERNS IN PEDIATRIC PATIENTS

Martínez, María Paula; Ginaca, Alejandra; Carabajal, Patricia; De Matteo, Elena; Domínguez, Maximiliano; Bezrodnik, Liliana
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

A definite diagnosis of celiac disease (CD) is based on histological changes in duodenal mucosa, graded according with Marsh classification. The detection of anti-tissue transglutaminase (tTG), anti endomysial (EMA) and anti deamidated gliadin peptide (DGP) antibodies (Ab) have improved the diagnosis rate of CD. **Aim:**

check whether small bowel mucosal histology patterns correlate with serum CD markers in children. Materials and Methods: We retrospectively analyzed 127 small bowel biopsies from pediatric patients which were classified according to Marsh criteria since 2011 to 2014 and laboratory findings around biopsies date. Serum IgA normal levels were measured by kinetic nephelometry, EMA IgA by indirect Immunofluorescence, tTG IgA and DGP IgG by ELISA. Non parametric Spearman correlation coefficient was applied. Results: Out of 127 biopsies: 20 have normal histology pattern (Ab frequencies: 25%, median tTG IgA :26 U, DGP IgG: 24 U, EMA IgA:1+); 21 nonspecific duodenitis (Ab frequencies: 25%, median tTG IgA :49 U, DGP IgG: 51 U, EMA IgA:1+); 16 were Marsh IIIb enteropathy (Ab frequencies: tTG IgA 94%,DGP G 64%, EMA A 80%, with median titers 88U, 56U and 4+ respectively). 65 biopsies were Marsh IIIc with TGA: 85% (median titer 102 U), DGP IgG: 73% (median titer 98 U), EMA IgA: 79% (median: 4+); 15 biopsies showed atrophic mucosal lesions in bulb with non-atrophic mucosal lesion or normal duodenum. The correlation between histological grade versus tTG IgA, DGP IgG and EMA IgA was 0.58; 0.53, 0.51 respectively ($p < 0.0001$). Conclusions: We found that there was higher frequency and levels of CD associated antibodies in more severe histological lesions. Despite of the moderate correlation coefficient, the difference between histological patterns was significant. tTG IgA antibodies showed the best performance.

698. (832) B LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS (BLS) ANALYSIS BY FLOW CYTOMETRY (FC): ITS USEFULNESS FOR THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS IN PATIENTS SUSPECTED WITH HYPER IGM (HIGM) SYNDROMES

Simesen De Bielke, María Gabriela; Sanz, Marianela; Danelian, Silvia; Bernasconi, Andrea; Rossi, Jorge
Hospital de Pediatría Garrahan

The HIGM syndromes are a group of immune disorders characterized by impairment of immunoglobulin isotype switching, resulting from inherited defects in the CD40 ligand (CD40L)/CD40 signaling pathway. The most common form is X-linked inherited (X-HIGM), caused by defects in *CD40L* gene. CD40L protein expression can be evaluated by FC for diagnosis when absent, but some mutated proteins can be expressed on T cells rendering difficulties in the diagnosis. Our aim was to compare retrospectively the BLS in patients with and without mutations in *CD40L* to assess its value in the differential diagnosis of X-HIGM. In 67 patients with suspicion of X-HIGM analyzed by FC for CD40L expression, BLS was performed in 38 patients (median age: 2.8 years old). From this group, 14 were diagnosed with X-HIGM by absence of protein by FC and/or complete gene sequencing, 5 with Common Variable Immunodeficiency (CVID) and 19 remained undiagnosed. Naive B cells (CD27⁻) resulted higher in both X-HIGM and CVID patients (97.3% and 97.8%) compared to undiagnosed patients and healthy controls ($n=34$) (86.7 y 81% respectively). X-HIGM patients showed a significantly lower percentage of CD27⁺memory B cells compared to patients without diagnosis, and to healthy controls with median values of 2.1, 17.9, and 25.7% respectively (Wilcoxon Test, $p < 0.0001$). From the undiagnosed patients, 3 with diminished CD40L expression (55%) and without mutations presented normal CD27⁺ B lymphocytes supporting the fact that the defect in these cells is a characteristic of X-HIGM. CVID patients also had lower memory B cells (4%) but we were able to distinguish both entities by observing the switched memory B cell (CD27⁺IgD⁺) compartment where X-HIGM had significantly lower % ($p=0.0269$). The analysis of BLS additional to CD40L induction study by FC in patients with suspicion of X-HIGM results a useful tool to decide the molecular evaluation, especially in cases where the CD40L protein is expressed at the membrane.

699. (428) SUB-CELLULAR FRACTIONS OF PROBIOTIC BACTERIA ADMINISTERED BY ORAL ROUTE INDUCE PERITONEAL MACROPHAGES ACTIVATION

Lemma Dumit, José María¹; Maldonado Galdeano, Carolina^{1,2}; Perdígón, Gabriela^{1,2}

Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT¹ Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET²

The ability to affect the host immune response is a feature of importance in the application of the probiotic bacteria strains. The identifying and characterizing of bacterial components that stimulate the immune system is crucial for the elucidation of novel structure as oral adjuvant. Aim: To evaluate the impact of sub-cellular components: exopolysaccharide (EPS), intracellular components (IC) and wall cellular (WC) of probiotic bacteria by *in vitro* and *ex vivo* assays, on the activity of peritoneal macrophages (MQP) to be the sentinels of immune innate response. We compared with a commensal bacterium. Different fractions were obtained from two probiotic bacteria: *Lactobacillus casei* CRL 431 (*Lc*), *Lactobacillus paracasei* CNCMI-1518 (*Lp*) and a commensal bacteria: *Lactobacillus acidophilus* CRL 730 (*La*). *In vitro*, the production of IL-6 was determined by ELISA in the supernatant of MQP stimulated with the sub-cellular fractions. *Ex vivo*, BALB/c mice received by oral route: EPS, IC and WC of *Lc* and *La* for 7 days, and for *Lp* 5 days. Phagocytic and antimicrobial activities of MQP were determined. Results: *In vitro*, IL-6 levels increases significantly ($p \leq 0.05$) when the cells were stimulated with IC and WC for probiotics *Lc* and *Lp*, and with EPS for *La*. *In vivo*, phagocytic and antimicrobial activities of MQP were enhanced for the WC ($p \leq 0.05$) of both probiotic strains. Phagocytic activity increases also with IC from *La*. Conclusion: We showed that the main immunomodulatory effect of probiotic bacteria (*Lc*, *Lp*) are in the wall cellular and exopolysaccharide for the commensal bacteria (*La*). The characterization of probiotic components able to act as oral adjuvant is an approach to elucidate the molecules involved in such effect.

700. (599) NASAL PRIMING WITH IMMUNOBIOLOGIC LACTOBACILLUS RHAMNOSUS MODULATES INFLAMMATION-COAGULATION INTERACTIONS AND REDUCES INFLUENZA VIRUS-ASSOCIATED PULMONARY DAMAGE

Zelaya, Hortensia^{1,4}; Tada, Asuka²; Vizoso-Pinto, María Guadalupe^{3,4}; Salva, Susana¹; Álvarez, Susana^{1,4}; Kitazawa, Haruki²; Agüero, Graciela⁴; Villena, Julio^{1,2}
Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET¹. Food Immunology Group Japan². Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO)-CONICET³. Universidad Nacional de Tucumán Argentina⁴

Five to fifteen percent of global population is affected by seasonal influenza yearly. Thus, influenza represents a major public health problem. Symptoms are variable ranging from mild respiratory distress to massive organ failure resulting in death. Seasonal influenza is usually self-limiting but in susceptible patients it may progress to acute lung injury, which is characterized by augmented pulmonary microvascular permeability leading to pulmonary edema, hypoxemia and respiratory failure. Available drugs are of limited efficacy in this setting, therefore, the development of novel therapeutic or preventive alternatives are a milestone in influenza research. We examined the effect of nasal administration of live and heat-killed (HK) *Lactobacillus rhamnosus* 1505 (Lr1505) on influenza infection and found that both treatments were able to protect mice challenged with influenza virus (IFV). Furthermore, we unraveled several mechanisms by which this immunobiotic strain protected infected mice by reducing pulmonary injury and lung viral loads: a) inflammatory cytokines were down-regulated diminishing inflammation ($p < 0.01$), b) IFNs with direct antiviral activity were enhanced ($p < 0.01$), c) regulatory cytokines such as IL-10 were up-regulated ($p < 0.05$), d) maturation markers and costimulatory molecules were up-regulated in lung antigen presenting cells ($p < 0.01$), e) IFN- γ and IL-10 producing CD4⁺ lymphocytes were recruited to the lungs, and f) the pro-coagulation state was reversed mainly by down-regulating tissue factor and restoring thrombomodulin levels ($p < 0.05$). In conclusion, our results strongly suggest that administration of live or HK Lr1505 may represent an interesting alternative to modulate inflammation-coagulation interactions and reduce influenza virus-associated pulmonary damage.

701. (621) MODULATION OF INTESTINAL EPITHELIAL INNATE RESPONSE BY MICROBIAL FERMENTATION PRODUCTS

Iraporda, Carolina¹; Romanin, D.E.²; Pereyra, E.³; Pignataro, O.P.^{3,4}; Rumbo, M.²; Abraham, A.G.¹; Garrote, G.L.¹
Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)-CONICET¹ Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UNLP² Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET³ Depto de Química Biológica-FCEN-UBA⁴

Short chain fatty acids (SCFA), acetate, propionate and butyrate are the main fermentation products of intestinal microbiota. Beyond *in situ* generation, they can also be found, as well as lactic acid, in fermented food products. These molecules have been identified as targets of G-protein coupled receptors and are putative mediators of host immune response modulation. The aim of this work was to analyze the capacity of SCFA to modulate intestinal epithelial innate response. We used reporter cell line Caco2-CCL20:luc, that is a human intestinal epithelial line stably transfected with luciferase under the control of CCL20 promoter. We used dose response pretreatment with neutralized filtrated solutions of acetate, propionate, lactate and butyrate (1 to 100 mM). 30 minutes pretreatment with the different SCFA downregulated in a dose response manner the luciferase activity induced by stimulation with either flagellin of *S. typhimurium* (FlhC, 1 µg/ml) or IL-1β (10 ng/ml) as well (p<0.05). Similar results were observed at the mRNA level using RTqPCR. Maximal inhibition of FlhC-induced CCL20 expression was observed upon pretreatment with 100 mM of SCFA (p<0.05). In all cases, butyrate and propionate showed higher capacity to modulate activation than lactate and acetate. SCFA pretreatment does not affect basal expression of CCL20, neither of different housekeeping epithelial cell genes. Using transient transfection with a NFκB driven reporter system we observed that lactate pretreatment downregulates this signaling pathway in Caco-2 cells. Although SCFA pretreatment affects intracellular levels of AMPc, we could not observe inhibition of SCFA activity upon pretreatment of cells with *Bordetella pertussis* toxin. Our results showed that SCFA, at concentrations that can be found within the colonic lumen or in fermented food products can modulate epithelial innate response *in vitro*.

702. (687) LACTIC ACID BACTERIA AS A NEW SCAFFOLD FOR DNA VACCINE DELIVERY

Wagner, Paula Micaela^{1,2}; García, María Inés^{1,2}; Attallah, Carolina^{1,2,3}; Bailat, Alejandra^{1,2}; Vázquez-Levin, Mónica⁴; Vinderola, Gabriel⁵; Veaute, Carolina^{1,2}
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL¹ Laboratorio de Inmunología Básica, FBCB, UNL² Laboratorio de Cultivos Celulares, FBCB, UNL³ Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET⁴ Instituto de Lactología Industrial, CONICET-UNL⁵

Non-invasive routes for vaccine delivery are attractive alternatives to classical methods. Bacteria, as cellular vehicles for the administration of antigens and for DNA delivery, are candidates for the development of new vaccines. Nevertheless, most of the bacteria in study are attenuated strains of pathogenic microorganisms. In contrast, food-grade Lactic Acid Bacteria (LAB) are safe candidates as delivery vectors. The efficiency of a DNA vaccine is closely related to the level of expression of the encoded antigen. Thus, our aim was to evaluate two strains of LAB as oral vehicles of a eukaryotic expression vector. The coding sequence of the *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) was inserted in an *E. coli*-LAB shuttle plasmid with kanamycin resistance (pLKV1-EGFP). Performance of the plasmid for eukaryotic protein expression was verified by *in vitro* transfection of cells from the HEK293 line. *Lactobacillus paracasei* JP1 and *Lactococcus lactis* Mo12 were transformed with pLKV1-EGFP by electroporation. The plasmid was stable in both LAB strains in the absence of selective pressure: after 20 generations 71% of *L. paracasei* JP1 cells and 84% of *L. lactis* Mo12 cells displayed the antibiotic resistance. 10⁸ CFU of each recombinant strain of LAB were orally administered to 5-6 weeks old, Balb/c female mice, every 24 hours for

3 consecutive days. Control animals received no bacteria. Mice were sacrificed 24 hours after the last administration, intestine regions containing Peyer Patches were removed and treated with hyaluronidase. The cell suspension obtained was analyzed by flow cytometry. The reporter protein was detected in animals receiving both transformed bacteria strains, but the percentage of green cells in the analyzed cell population was significantly higher in *L. paracasei* treated mice (14.6±2.15 vs 1.71±1.76; p<0.05 compared to control; Kruskal-Wallis). This study suggests that LAB, in particular *L. paracasei* JP1 could be used as vehicles for oral DNA vaccines.

703. (703) DO GALECTIN-GLYCAN INTERACTIONS PLAY ANY ROLE IN LINKING COMMENSAL MICROBIOTA, T CELLS AND THE INTESTINAL EPITHELIUM?

Morosi, Luciano Gastón¹; Cutine, Anabela¹; Morsales, Rosa María¹; Blancato, Víctor Sebastián²; Magni, Christian²; De Mendoza, Diego²; Toscano, Marta Alicia¹; Rabinovich, Gabriel Adrián¹; Mariño, Karina Valeria¹
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IDICER)-CONICET-UNR²

The intestinal microbiota plays a crucial role in the host defense, helping to shape the immune system throughout life. A dynamic dialogue between intestinal immune cells and bacteria ensures a homeostatic immune state, which includes protection from pathogens and hypo-responsiveness to environmental antigens (dietary antigens and commensals). The mechanisms underlying this delicate balance are not completely understood. Galectins, soluble lectins capable of recognizing *N*-acetylglucosamine residues in glycoconjugates, are key modulators of the immune response. Galectin-1 (Gal1), a member of this family, can directly induce apoptosis of T_H1 and T_H17 lymphocytes or activate regulatory circuits mediated by T regulatory cells (Tregs) and regulatory dendritic cells. However, little is known on the influence of microbiota on the intestinal repertoire of galectins and on the glycophenotype of epithelial and mucosa-associated immune cells. We studied the effects of oral daily administration of *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus casei* BL23 and *Enterococcus faecalis* JH2-2 (commensal bacteria) to 8 weeks-old male BALB/c mice. Using flow cytometry, we characterized the glycophenotype of intestinal epithelia and CD4 and CD8 T cells isolated both from spleen (systemic) and subepithelial cells/lamina propria (local compartment). The galectin gene expression profile was also analyzed by RT-qPCR. Our results showed that the glycophenotype of T cells (CD4 or CD8) is different between subepithelial and lamina propria. Moreover, in the presence of commensal bacteria, CD4 and CD8 T cells developed a differential glycophenotype in the local compartment (but not at the systemic level), both when compared to controls and between T cell populations. Colonization by commensal bacteria also caused a three-fold downregulation of Gal1 expression in epithelial and lamina propria compartments, showing that galectin-glycan interactions could be involved in intestinal tolerance to microbiota.

704. (301) CHARACTERIZATION OF COLORECTAL POLYPS IN CHILDREN WITH COW MILK'S ALLERGY

Canziani, Karina Eva¹; Candia, Martín¹; Nanfito, Gabriela³; Balcarce, Norma³; Guzmán, Luciana³; Borobia, Paula³; Altamirano, Eugenia²; Ben, Ricardo³; Muglia, Cecilia¹; Docena, Guillermo¹
Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP)-CONICET-UBA¹ Servicio de Patología del Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata² Servicio de Gastroenterología del Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata³

Cow milk allergy (CMA) is the most common food allergy amongst infants, affecting 2-5% of children. Our preliminary studies showed that 90% of patients older than 1 year old with rectal bleeding and colorectal polyps had high levels of serum cow's milk protein (CMP) specific IgE. Besides, when milk is avoided

as treatment no recurrent polyps were observed. In this work we studied the cellular components of the benign colonic polyps that are routinely removed. Resected polyps from 20 patients were analyzed by immunohistochemistry and confocal microscopy using anti-IgE and anti-CD138 conjugated antibodies. Besides, cytokine and transcription factor expression were analyzed by RT-qPCR; and finally T cell lines were established from peripheral blood and lamina propria to study their specificity by proliferation assays ($^3\text{HThymidine}$ and CFSE). We found that 15 patients had serum CMP-specific IgE. The stroma of polyps showed a cellular infiltrate composed of mononuclear cells eosinophils, mast cells, and membrane-bound IgE cells. We confirmed the presence of IgE secreting plasma cells and IgE-bearing mast cells. Biopsies from mucosae surrounding the polyps showed a mononuclear cell infiltrate with no eosinophils and a low frequency of IgE⁺ cells (30 ± 15 vs 2 ± 3 cells, polyps vs mucosa). Moreover, we found a trend to a higher expression of *il-13* and *gata-3* in polyps than in the lamina propria outside the polyps. T cell lines were developed from PBMC (n=6) and polyps (n=2) and they showed a high proliferative responses to CMP (P<0.05) and the CMP protein fraction, κ -casein (P<0.05), with a significant increased response of T cell lines from polyps compared to T cell lines from PBMC of the same patient (P<0.05). In conclusion, our results showed that IgE-secreting plasma cells and CMP-specific T cells are part of the Th2 inflammatory cell infiltrate of polyps, which could be related to the allergic condition of patients.

VARIOS SAIC

705. (38) ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y ATROSCLEROSIS EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2

Quesada, Isabel María¹; Cejas, Jimena Beatriz²; Aybar, Jimena³; Bustos Guillén, Mario Javier²; Castro, Claudia Magdalena¹

Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo¹ Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Cuyo² Hospital Luis Lagomaggiore³

Los individuos que padecen Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) tienen un riesgo cardiovascular superior al de la población general y el 70-80% de la mortalidad de los pacientes diabéticos es atribuible a patología de origen arteriosclerótico. La identificación de biomarcadores séricos de injuria vascular significaría un avance en la prevención de las complicaciones cardiovasculares graves en estos pacientes. Nos propusimos determinar marcadores séricos de disfunción endotelial (DE) y aterogénesis en pacientes con DM2, correlacionarlos con las variables bioquímicas y compararlos con sujetos sanos. El estudio se llevó a cabo utilizando muestras de suero de individuos sanos, (grupo control n=26); y de pacientes con DM2 (n=56), divididos en dos subgrupos: pacientes con perfil lipídico normal (n=30) sin dislipidemia (DL) y pacientes con perfil lipídico alterado (n=26), con DL. Se midieron niveles circulantes de colesterol total, colesterol-HDL, triglicéridos, glucosa, insulina, hemoglobina glicosilada e índice HOMA-IR. Se determinó la fracción soluble de la molécula de adhesión vascular-1 (sVCAM-1), Dimetilarginina Asimétrica (ADMA) y la proteína C3 del complemento. Los resultados mostraron un aumento en los niveles circulantes de sVCAM-1 sólo en pacientes DM2 sin DL comparado con el grupo control, encontrando valores normales en los pacientes diabéticos con DL. Se hallaron niveles aumentados de ADMA y C3 en DM2 con DL comparados con los pacientes sin DL y grupo control. Se observa correlación positiva entre ADMA y HOMA-IR, colesterol total y colesterol HDL. También existe relación positiva entre C3 y HOMA-IR, colesterol total y trigliceridemia. El riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares podría detectarse mediante la determinación de sVCAM-1, ADMA y C3 del complemento. sVCAM-1 podría ser un marcador temprano de riesgo vascular previo al inicio de la DL, en pacientes con DM2.

706. ESTUDIO PROTEÓMICO DEL DAÑO OXIDATIVO DE PROTEÍNAS EN EL CARCINOMA HEPÁTICO DERIVADO DEL SÍNDROME METABÓLICO

Martín, Fernando Ariel^{1,3}; Mebarki, Mouniya²; Paradis, Valerie²; Friguet, Bertrand⁴; Radman, Miroslav^{1,3}; Matic, Ivan¹ *Laboratory of Robust¹ Hospital Beaujon² Mediterranean Institute for Life Science³ UR4-IFR83, Université Pierre et Marie Curie, Paris Francia⁴*

El síndrome metabólico (SM) es hoy la principal causa de enfermedad hepática crónica en el mundo. El desequilibrio metabólico de lípidos y carbohidratos en el SM produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las proteínas representan el principal blanco de los ROS, siendo la carbonilación el principal daño oxidativo no reversible que lleva a la acumulación de proteínas no funcionales y a la disminución de la función celular. El objetivo del presente trabajo es estudiar el daño irreversible de proteínas en tumores hepáticos. Para ello, se seleccionaron 10 resecciones tumorales hepáticas en cada grupo de estudio en base a la historia clínica del paciente y los parámetros histológicos. El daño oxidativo de proteínas se detectó mediante electroforesis en dos dimensiones. Luego de la extracción, los carbonilos presentes se marcaron con el fluoróforo CF 647-hidrazida y las proteínas totales se marcaron con el fluoróforo Cy3NHSTM. Un patrón interno se preparó y se marcó con Cy2NHSTM. Luego de la separación de proteínas por isoelectroenfoque y SDS-PAGE, los geles fueron escaneados utilizando un Typhoon FLA300. Se detectaron un total de 1184 spots con 36 spots expresados diferencialmente y 47 spots diferencialmente oxidados (incremento > 1,5, p < 0,05). En VHC se detectó la sobreexpresión de proteínas involucrados en las vías de señalización: tales como la señalización de EGFR, Wnt, Cdc20 y el ciclo celular mientras que en los tumores SM_HCC, se detectó la sobreexpresión de proteínas implicadas en el metabolismo de hidratos de carbono y aminoácidos. El análisis diferencial de la carbonilación de proteínas mostró un mayor daño de: glucosa isomerasa, fosfato, isocitrato deshidrogenasa, y 3-cetoacil-CoA thiolasa entre otras en VHC. Por otro lado, las proteínas implicadas en la respuesta redox y el metabolismo de los lípidos presentaron un mayor daño oxidativo SM_HCC. En conclusión, la diferencia en los niveles de expresión y daño oxidativo observadas en el tumor hepático derivado de SM o Virus C podría representar las diferentes vía de desarrollo del tumor.

707. (137) FARMACOVIGILANCIA: REVISIÓN DE 3966 NOTIFICACIONES Y ANÁLISIS DE SUS CARACTERÍSTICAS

Keller, Guillermo Alberto^{1,2}; Ponte, Marcelo Luis³; Diez, Roberto Alejandro¹; Di Girolamo, Guillermo¹ *Unidad de Farmacovigilancia - Segunda Cátedra de Farmacología - Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires¹ Departamento de Urgencias, Hospital General de Agudos Francisco J Santojanni² Servicio de Clínica Médica, Hospital General de Agudos Cosme Argerich³*

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 2014 se recibieron 3966 notificaciones de 3788 reacciones adversas, 150 casos de falta de eficacia y 28 fallas de calidad correspondiente a notificaciones de una población con ligero predominio femenino y predominio de sujetos adultos. La mayoría (98%) fueron obtenidas por el enfoque proactivo. Las reacciones adversas fueron causadas predominantemente por fármacos antimicrobianos, cardiovasculares y neurológicos. De las reacciones adversas, 785 (21%) fueron serios (641 internaciones, 98 la prolongaron, 41 riesgo de vida, 1 incapacidad y 4 muertes), siendo la severi-

dad: 72% leves, 8% moderados y 20% severas. Los problemas de eficacia/calidad estuvieron relacionados predominantemente a fármacos cardiovasculares, neurológicos, y antimicrobianos. Las notificaciones recibidas generaron conductas como cambio de fármaco, marca comercial, o dosis, realización de estudios complementarios, internación, u tratamiento específico de un

evento generado. Las muestras de notificaciones de problemas de calidad/eficacia fueron analizadas por INAME con resultado de "cumple con las especificaciones". Conclusiones: 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.