

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

ENDOCRINOLOGIA A

1. (11932) **PERFIL LIPÍDICO DE MACHOS DE UN AÑO DE EDAD DE LA LÍNEA DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE DIABÉTICA ESS.** DANIELE, STELLA (1); MONTENEGRO, SILVANA (2,3); PICENA, JUAN (2); TARRÉS, MARÍA (2,3); MARTÍNEZ, STELLA (2,3)

(1) Facultad de Ciencias Bioquímicas-UNR. (2) Facultad de Ciencias Médicas-UNR, 3Consejo de Investigaciones-UNR

Las ratas eSS desarrollan diabetes tipo 2 sin sobrepeso. Las alteraciones lipídicas podrían preceder las del metabolismo glucídico ya que en machos de 5-6 meses se comprobaron modificaciones de lípidos de membrana y aumento de la trigliceridemia (Tg) con glucemia basal (G0) normal. Durante el segundo año de vida se verifica hiperglucemia creciente, descenso de la insulina plasmática, aumento del colesterol total (Co), disminución del número y tamaño de los islotes de Langerhans y lesiones glomerulares y túbulo-intersticiales. Se estudió el perfil lipídico de machos eSS de 12 meses (n=8) tomando como testigos machos Wistar (W) de la misma edad (n=7). Los valores se expresan como media±error estándar. Se comprobó en eSS dosajes de G0 indicativos de diabetes grave (>1.40 mg/dl) y superiores a los de W (1.65±15 mg/dl vs 99±12; P<0.001) pese a los mayores valores de insulina basal plasmática (38±1.74 vs 16±2.17; P<0.001). eSS presentó concentraciones superiores de NEFA (1.38±0.09 mmol/ vs 0.89±0.02; P<0.001), Co (105±9 mg/dl vs 57±2.16; P<0.001), de Tg (228±24 mg/dl vs 97±5.5; P<0.001) y LDL-Co (44.2±7.8 mg/dl vs 14.2±1.8; P<0.001), mientras que los valores de HDL-Co estuvieron disminuidos (15.2±0.81 vs 23.1±0.87; P<0.001). Respecto de la composición porcentual de VLDL, se comprobó mayor proporción de Tg en eSS (67.4±2.29% vs 45.9±1.05; P<0.001). La proporción TG/proteínas en VLDL indicó que éstas fueron de mayor tamaño en la línea diabética. Los machos eSS de 12 meses muestran hiperglucemia e hiperin-sulinemia de ayuno, indicadores de insulinoresistencia. En este proceso intervendría el incremento de los NEFA plasmáticos –producto del aumento de la lipólisis por insuficiencia de insulina- que induciría mayor resistencia hepática y periférica a la hormona. Respecto de Tg, puede suponerse que un aumento de su síntesis hepática originaría las VLDL de alto contenido de Tg. Estas alteraciones influirían en la evolución de las lesiones renales propias de la línea.

2. (12137) **EL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL RESTITUYE LA RESPUESTA DEL TEJIDO AORTICO DE RATA A PROGESTERONA Y ESTRONA.** POLINI, NELIDA (1); BENOZZI, SILVIA (1); ALVAREZ, CRISTINA (1); MASSHEIMER, VIRGINIA (1,2); SELLES, JUANA (1).

(1) Cátedra de Análisis Clínicos II. Dto. Biol. Bioq. y Farm. UNS, (2) CONICET

Estudios previos demostraron que en ratas con niveles normales de estrógenos (REN) el tratamiento "in vitro" con estrona (E[1]) y progesterona (Pg) estimula la actividad NOS e inhibe la agregación plaquetaria, esta respuesta se pierde en ausencia de función ovárica. En este trabajo estudiamos el efecto de la administración "in vivo" de estradiol (E[2]) intraperitoneal (IP) de ratas ovariectomizadas (OVX) sobre la acción no genómica de la Pg y E[1]. Se ensayaron diversos protocolos de terapia sustitutiva,

seleccionándose 7 días con E[2] 50 mg/kg/día. Incubando "in vitro" anillos de aorta de rata OVX y OVX IP, con Pg 10(-9) M o E1 10(-9) M por tiempos cortos (5 – 10 minutos) se comprobó que la administración de E2 restituye la capacidad de activación de NOS (OVX; 1,09 ± 0.08 vs 1,11 ± 0.15 y 1,02 ± 0,11 pmol/mg prot control vs Pg y E[1] respectivamente y OVXIP 1.39 ± 0.18 vs 1.63 ± 0.22 y 1.68 ± 0.10 pmol/mg prot control versus Pg y E[1] respectivamente, p< 0, 001)). Hemos reportado que en REN la regulación vascular de la agregación plaquetaria inducida por Pg y E[1] es mediada por NO. Demostramos que el tejido vascular aislado de OVX IP exhibe una acción antiagregante similar al aislado de REN (REN: 58 y 45%, OVX: 2 y 5%, OVXIP: 40 y 48% con Pg 10(-8) M y E[1] 10(-9) M Utilizando el antagonista de RPg RU 486 comprobamos que en OVXIP en presencia de 10 mM RU, el estímulo sobre NOS inducido por Pg "in vitro" no se altera, sugiriendo que el RPg no mediaría la estimulación de la enzima. Estos resultados sugieren que la suplementación con E[2] a animales privados de función ovárica restituye la capacidad de activación de NOS. El efecto de Pg sería independiente de la participación de su receptor.

3. (12153) **ENVEJECIMIENTO DE LA ESTRUCTURA TESTICULAR Y EPIDIDIMARIA DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE DIABÉTICAS OBEsas Y NO OBEsas** FERESIN, NANCY MARÍA; HISANO, NORIYUKI.

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR

Las alteraciones metabólicas y el envejecimiento modifican las funciones del aparato genital. Estudiamos la histología testicular y epididimaria de ratas espontáneamente diabéticas a edades avanzadas Ratas machos de 18 meses de edad (4-5 por cada grupo) de la línea Wistar (control), eSS (no obesas, diabéticas a los 6 meses), β (obesa, diabéticas a los 8 meses de edad), eSMT (eSS x β, obesa, diabéticas a los 3 meses). Los animales fueron sacrificados con sobredosis de éter. En la autopsia, se disecaron y se pesaron los testículos que se fijaron en Bouin, los epidídimos se fijaron en formaldehído 4% en PBS, incluidos en parafina, coloreados con PAS + H, Giemsa y H-E. Datos: media ± SEM. Peso de ratas: Wistar: 495.20±8.81g; eSS: 374.80±6.07g; eSMT 349.60±18.07g; β: 426.83±24.06g. Pesos testículos: Wistar 0.6±0.02g/100gCBW; eSS: 0.57±0.03 g/100gCBW; β 0.65±0.04 g/100gCBW; eSMT: 0.31±0.04g/100gCBW. (eSMT<W,eSS,β). Wistar: la mayoría de los túbulos seminíferos están conservados, alternando con zonas de túbulos hipotróficos. La región cefálica del epidídimo caudal se observan túbulos de estructuras conservadas, mientras que la zona distal, algunos túbulos tienen bordes ondulados e irregulares. La mayoría de los túbulos contienen espermatozoides. eSS: los bordes de los túbulos seminíferos son irregulares, conteniendo epitelio germinal y espermatozoides, observándose algunos túbulos hipotróficos El epitelio tubular epididimario presenta un epitelio disminuido en altura celular. β: se pueden observar zonas de epitelio seminífero conservado, intercalado con zonas amplia de túbulos hipotróficos Los epidídimos coincide con las imágenes testiculares, mostrando una estructura tubular hipotrófica. eSMT: en la mayoría de los animales se observa un epitelio germinal atrófico, que se correlaciona con una estructura epididimaria atrófica. En los animales diabéticos obesos (eSMT y β) se observan una aceleración del proceso de envejecimiento, histológicamente, del testículo y epidídimo que en ratas diabéticas no obesas (eSS).

4. (12173) FOSFORILACIÓN PROTEICA EN RESPUESTA A EFECTOS RÁPIDOS MEDIADOS POR ESTRONA EN TEJIDO AORTICO DE RATA. RAUSCHEMBERGER, MARÍA BELÉN (1,2); SELLÉS, JUANA (1); MASSHEIMER, VIRGINIA (1,2).

(1) *Cátedra de Análisis Clínicos II, Dto de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS.* 2 CONICET

En este trabajo investigamos la participación de distintas vías mensajeras en la transducción de la señal mediada por estrona (E[1]), en aorta de rata. Hemos demostrado previamente que en forma semejante al estradiol, la E[1] estimula la síntesis de vasodilatadores (óxido nítrico y prostaciclina) pero su mecanismo de acción es ligeramente diferente ya que la activación de NOS es independiente de calcio. Usando ensayos de fosforilación de sustratos (histona III-S y mielina básica) se midió la actividad PKC y MAPK en homogenados totales obtenidos de aorta de rata, tratados "in vitro" con concentraciones fisiológicas de E[1]. La hormona estimula muy marcadamente la actividad PKC, a todas las dosis ensayadas (0.1-50 nM), siendo mayor el estímulo a dosis mayores (937% y 103%; s/c; E[1] 50 y 1 nM, $p < 0.001$). Se realizaron estudios tiempo respuesta (1-10 min.), obteniéndose el máximo estímulo luego de 3 min. de tratamiento con E[1] 10 nM (0.42 ± 0.01 vs 0.20 ± 0.04 pmol Pi/mg prot/min., E[1] vs C). Se comprobó la especificidad del ensayo, usando TPA como activador directo de PKC. Tratamientos de 5 min., 100 nM TPA, estimulan significativamente la actividad PKC (425% s/c, $p < 0.001$). Se demostró también que la E[1] estimula la actividad MAPK a tiempos muy cortos de tratamiento. Luego de 30 segundos de exposición a E[1] 10 nM, la fosforilación de la proteína básica de mielina se incrementa en un estímulo de 341% sobre el control ($p < 0.02$). Se estudió la contribución de fosfatasa en el mecanismo de acción hormonal cuantificando la producción de NO en presencia del inhibidor de fosfatasa PP-1 y PP2A, Calyculin A (10nM), observándose que la acción estimuladora de E[1] sobre la actividad NOS se potencia significativamente (121% vs 73% s/c; E[1] + Calyculin A vs E[1], $p < 0.01$). Los resultados presentados aportan evidencias que, en tejido vascular, la acción no genómica de E[1] comprende la fosforilación proteica y la estimulación de la síntesis de NO.

5. (12191) MODULACIÓN DE LA 11 BETA HIDROXIES-TEROIDE DESHIDROGENASA 1 (HSD 1) HEPÁTICA POR ESTRÉS, SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO HIDROCARBONADO. ALTUNA, MARÍA EUGENIA; LELLI, SANDRA MARCELA; SAN MARTÍN DE VIALE, LEONOR CARMEN; DAMASCO, MARÍA CRISTINA

Dto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN). Univ. de Buenos Aires UBA

El estrés activa la síntesis y secreción de catecolaminas y de glucocorticoides adrenales, produciendo un aumento de los niveles circulantes. En hígado la HSD 1 cataliza in vivo la conversión de 11 dehidrocorticosterona a corticosterona, regulando en forma parácrina la oferta de glucocorticoide activo a nivel tisular. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de dos tipos de estrés, uno de ellos producido por una sobrecarga buco-gástrica con HCl 200mM (HCl) que produce una acidosis metabólica y el otro con una sobrecarga simulada (Cánula) sobre la cinética en la HSD 1 hepática y su influencia en la actividad de la enzima gluconeogénica de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), glucemia y depósitos de glucógeno comparados con controles no estresados (Control). Los dos tipos de estrés ensayados producen un aumento significativo de la actividad de la HSD 1 (146% cánula, 253% HCl), un aumento en la actividad de la PEPCK (51% Cánula y 86% HCl), lo cual podría estar directamente relacionado con un aumento significativo de la glucemia (29% cánula y 41% HCl), e indirectamente relacionado con la disminución observada en los niveles de glucógeno hepáticos (68% Cánula y 78% HCl). Los resultados obtenidos sugieren la siguiente secuencia de eventos: aumento de la actividad de la HSD1 hepática,

incremento de los niveles de glucocorticoides, activación directa de la gluconeogénesis y múltiples eventos indirectamente relacionados con los glucocorticoides que incluiría el incremento de la fosforilasa-a produciendo una depleción de los depósitos de glucógeno y un aumento en la glucemia. Este nuevo enfoque confirmaría resultados obtenidos en la investigación básica y clínica que proponen que la actividad de la HSD 1 hepática está involucrada en el desencadenamiento del Síndrome Metabólico.

6. (12274) EFECTOS AGUDOS DE LA PANCREATECTOMIA EN RATAS PREPUBERALES Y EN ANIMALES POSDESTETADOS SOBRE LA HISTOLOGIA TESTICULAR. VAZQUEZ, SILVIA M.; HISANO, NORIYUKI

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR

Resultados previos que presentamos indicaron que el aloxano inyectado en ratas posdestete provocaba una alteración histológica testicular. Complementamos con el efecto de la pancreatectomía sobre testículos. Ratas machos de la línea "m" fueron separados en los distintos grupos: 1.-Ratas 23 días: pancreatectomizadas (P) y operación simulada (S), autopsia a los 30 días. 2.- ratas de 36 días "P" y "S", autopsia a los 45 días de edad. (4 ratas c/grupo). Se incorporó pancreatina (Pankeoflat A.D.) en el agua de bebida. Se determinó la glicemia a las 48 hs y previo a la autopsia mediante tiras reactivas Accu-Chek (Roche). Sacrificados con sobredosis de éter. En la autopsia se registraron: peso corporal y peso testicular. Los especímenes (testículos) fueron fijados en el líquido de Carnoy y procesados rutinariamente, incluidos en parafina, coloreados con H-E, Giemsa, PAS. Datos expresados: media \pm SEM. 1.-GLUCEMIA a los 30 días: 186 ± 0.01 mg/dl; a los 45 días: 145.25 ± 3.30 mg/dl. 2.- PESO CORPORAL: "P" 30 días: 70.50 ± 1.75 g; "S": 76.00 ± 2.31 g ($P < 0.05$). "P" 45 días: 178.00 ± 2.88 g; "S": 168.00 ± 4.62 g (n.s) 3.- PESO TESTICULAR: "P" 30 días: 0.72 ± 0.02 g/100g CBW; "S" 0.72 ± 0.03 g/100g CBW (n.s.). "P" 45 días: 0.96 ± 0.02 g/100g CBW; "S" 0.91 ± 0.03 g/100g CBW (n.s.). 4.- HISTOLOGIA TESTICULAR: no se observan cambios significativos entre los operados y sus controles. Se pueden observar túbulos seminíferos compuesto en su mayoría con espermatogonias y espermatocitos en los animales de 30 días. Los animales de 45 días se pueden observar túbulos con epitelio seminal que llega hasta espermatides, y algunos espermatozoides. En algunos túbulos acúmulo celulares luminales de espermatocitos y espermatides. El efecto agudo de la diabetes por pancreatectomía no provoca lesiones primarias en el epitelio germinal, contrariamente a lo observado en animales tratados con la inyección única de aloxano en el posdestete provocando alteraciones histológicas significativas en el epitelio testicular a la semana posterior.

7. (12288) EFECTO DEL 17- β ESTRADIOL SOBRE LA GUANILIL CICLASA SOLUBLE (SGC), RECEPTOR DEL ÓXIDO NÍTRICO, EN ADENOHIPÓFISIS. CABILLA, JIMENA; DÍAZ, MARÍA C.; MACHIAVELLI, LETICIA; QUINTEROS, FERNANDA; DUVILANSKI, BEATRIZ

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET.

Previamente demostramos que el E2 modifica la expresión de las subunidades alfa1 (a1) y beta1 (b1) de la sGC en adenohipófisis. El tratamiento agudo con E2 aumenta los niveles de proteína a1 y disminuye tanto los niveles de b1 como la actividad global de la enzima. El objetivo de este trabajo fue dilucidar a través de qué mecanismos el E2 ejerce estos efectos sobre la expresión de las subunidades de la sGC en ratas hembras prepúberes de 21 días de la cepa Wistar. Se evaluaron por RT-PCR los niveles de mRNA de a1 y b1 bajo distintos tratamientos, tanto in vivo como in vitro. El tratamiento con E2 por 6 h (sc, 40 μ g/kg) solo o en combinación con el antagonista estrogénico específico ICI 182,780 (ip, 2 mg/kg) no modificó significativamente los niveles de mRNA de a1 ni b1 respecto del control (C) (% del

C, E2: a1=104%, b1=103%; ICI: a1=100%, b1=105%; ICI+E2: a1=96%, b1=92%). Tampoco la progesterona (sc, 40 mg/kg) sola o en combinación con E2 tuvo efecto sobre los mRNAs (% del C, P: a1= 100%, b1=108%; P+E2: a1= 97%, b1=100%, NS, n=3). Una respuesta similar se observó en células adenohipofisarias en cultivo, en presencia de E2 (10(-9) M) durante 6 h, con o sin ICI (10(-7) M) (% del C, E2: a1=105%, b1=98%; ICI: a1=100%, b1=101%; ICI+E2: a1=95%, b1=99%; NS, n=2). Se estudió por inmunocitoquímica la localización de ambas subunidades en los diferentes tipos celulares adenohipofisarios. Se observó la presencia de a1 y b1 en lactotrofos, corticotrofos, somatotrofos y gonadotrofos. El tratamiento in vitro con E2 (10(-9) M) durante 6 h no modificó la distribución citoplasmática difusa de la subunidad a1, mientras que la distribución de la b1 se condensó en acúmulos cercanos a la membrana plasmática. Este efecto se evidenció solamente en lactotrofos. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio del E2 sobre la expresión de la subunidad b1 y la actividad de la sGC es post-transcripcional y/o sobre la degradación de la proteína.

8. (12381) ESTUDIO DE LAS ISOFORMAS DE PROLACTINA HIPOFISARIA EN DOS MODELOS EXPERIMENTALES.

CARINO, MONICA(1, 2, 3); RULLI, SUSANA(1); CONSOLE, GLORIA(2); CAMPO, STELLA(4); GONZALEZ CALVAR, SILVIA(1,5); CALANDRA, RICARDO (1, 3, 6).

1 Instituto de Biología y Medicina Experimental, 2 Facultad de Medicina UNLP, 3 Facultad de Cs Exactas UNLP, 4 CEDIE, 5 Facultad de Medicina UBA, 6 IMBICE

La estructura de los oligosacáridos de hormonas glicoproteicas exhibe un rol importante en la secreción, metabolismo y regulación de la bioactividad de la hormona. La Prolactina (Prl) es una hormona que ejerce diversos efectos biológicos asociados a la microheterogeneidad de su molécula. El Objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar las isoformas de carga de la Prl correspondientes a: a) Hipófisis de hámsteres Dorados, machos adultos, mantenidos en condiciones lumínicas normales (FN 14 hs luz, 10hs oscuridad) y machos adultos sometidos a fotoinhibición (FI 6 hs luz, 18 hs oscuridad) durante 14 semanas. b) Hipófisis de ratones hembras controles de 12m de edad (WT) y Prolactinomas hipofisarios presentes en ratones Transgénicos (RT) del mismo sexo y edad, que sobreexpresan el gen de hCG β (SAIC, 2003). A partir de los homogenatos hipofisarios, se realizó el fraccionamiento utilizando la técnica de electroforesis en un rango de pH 3-10 y determinó la Prl en cada fracción por RIE. Los resultados obtenidos muestran (% relativo de Prl en cada rango de pl) en: A) hámsteres: FN: 21.24 \pm 1.83% (pl 5.15-5.17); 17.35 \pm 0.58% (pl 4.50-4.72); 6.88 \pm 1.30% (pl 4.33-4.35); FI: 45.29 \pm 1.02% (pl 5.42-5.47); B) ratones: WT: 47.52 \pm 1.05% (pl 4.33-5.50); 16.35 \pm 0.92% (pl 6.00-7.20); 25.30 \pm 1.20% (pl 7.80-8.30); RT: 72.20 \pm 1.11% (pl 4.33-5.50); 12.70 \pm 1.80% (pl 6.00-7.20). Los resultados indican que: a) en las hipófisis de hámsteres, la heterogeneidad de la Prl se refleja en un perfil de isoformas que varía en función del fotoperíodo. Así, predominan en el FN las tres isoformas más ácidas mientras que una sola isoforma se detecta en el FI; b) en los Prolactinomas hipofisarios se observa una disminución en la heterogeneidad de las isoformas con un predominio de las formas más ácidas con respecto a los Controles.

9. (12406) EVIDENCIAS DE UN EFECTO PROLIFERATIVO INDIRECTO DE LA INSULINA SOBRE LAS CÉLULAS LACTOTROPAS. LOCALIZACIÓN DE SU RECEPTOR EN ADENOHIPÓFISIS DE RATA. GUTIERREZ, SILVINA; AOKI, AGUSTÍN; TORRES, ALICIA; ORGNERO, ELSA

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Los mecanismos regulatorios de la proliferación de las células lactotropas son sumamente complejos. Entre los factores que

intervienen se halla la insulina (Ins). Sin embargo, hay controversias sobre cuál/les tipos celulares adenohipofisarios expresan sus receptores. El objetivo del trabajo fue localizar el receptor de Ins (InsR) en adenohipófisis de rata in vitro y analizar los cambios proliferativos y morfológicos que induce esta hormona. Se realizaron cultivos primarios adenohipofisarios de ratas hembras tratados por 48, 72 o 96h con Ins (174nM) sola o combinada con un bloqueante de receptores tirosina quinasa, genisteína (Ge) (25 μ M). Se valoró la proliferación de las lactotropas por doble inmunocitoquímica para BrdU y prolactina. Se aplicó test ANOVA-Tukey. Se detectaron los InsR por inmunocitoquímica para microscopía fotónica (ICQf) (sistema ABC) y electrónica (ICQe) con oro coloidal (técnica de preincubación para células intactas). Se incluyeron las células para su observación ultraestructural. La Ins estimuló la proliferación de las células lactotropas aproximadamente un 50% (p<0.001), efecto revertido parcialmente por Ge (p<0.001). Por ICQf se observaron células positivas para InsR distribuidas en la monocapa. La ICQe reveló células marcadas para InsR identificadas como gonadotropas, por sus característicos gránulos secretorios de dos tamaños: de 150nm y alta electrodensidad y de 400nm y reducida electrodensidad, ambos positivos para β LH. Tanto las lactotropas como las gonadotropas estimuladas con Ins exhibieron una morfología ultraestructural característica de células activas en la síntesis proteica. Los resultados obtenidos nos permiten inferir la presencia de InsR en las células gonadotropas, evidenciando que la Ins estimularía de manera directa la actividad proteínopoyética de estas células e indirectamente a través de algún factor liberado por las mismas, la proliferación de las lactotropas.

10. (12419) EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN DE RATAS NORMALES CON DIETA RICA EN FRUCTOSA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA Y METABOLISMO INSULAR DE GLUCOSA. MAITZEGUI, BÁRBARA; ALZUGARAY, M. EUGENIA; BORELLI, M. INÉS; RASCHIA, M. AGUSTINA; GAGLIARDINO, JUAN J.

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

Introducción: La dieta rica en fructosa (DRF) induce insulinoresistencia (IR) con hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia. Previamente demostramos que la DRF aumenta la secreción de insulina in vitro en respuesta a la glucosa (G). Objetivo: Estudiar la correlación entre secreción de insulina y metabolismo de G en islotes aislados de ratas normales alimentadas con DRF. Material y Métodos: Ratas Wistar macho normales se alimentaron durante 3 semanas con dieta comercial (C) o con la misma dieta más el agregado de fructosa al 10% en el agua de bebida (F). Antes del tratamiento y al momento del sacrificio se midieron glucemias, trigliceridemias e insulinemias. Se aislaron islotes (colagenasa) y se estudió el metabolismo de G (producción de (14)CO[2] y (3)H[2]O) en presencia de G 3.3 y 16.7 mM y la actividad (producción de G-6-P) de hexoquinasa (HQ) y glucoquinasa (GQ) en presencia de G 1 y 100 mM, respectivamente. Resultados: Los datos se expresan como X \pm EEM (n=18); F vs. C. Las glucemias, insulinemias y trigliceridemias fueron significativamente mayores en los animales F (p<0.005, 0.02, 0.001, respectivamente). La producción de (14)CO[2] y (3)H[2]O (pmol/islote/120 min) fue significativamente mayor en islotes de F en presencia de G 16.7 mM ((14)CO[2]: 21.7 \pm 1.01 vs. 14.8 \pm 2.9, p<0.05; (3)H[2]O: 55.12 \pm 3.6 vs. 34.3 \pm 6.6, p<0.025). La actividad de HQ fue similar en F y C (1.12 \pm 0.13 vs. 1.12 \pm 0.17 pmol/islote/min, NS), mientras que la actividad de GQ fue significativamente mayor en F (1.94 \pm 0.39 vs. 0.97 \pm 0.19 pmol/islote/min, p<0.02). Siendo la actividad de GQ el paso limitante del metabolismo de G insular; el aumento de su actividad en los islotes de DRF aumenta la metabolización de la hexosa. Este sería uno de los mecanismos responsables del aumento de secreción de insulina en respuesta a la glucosa en la IR inducida por DRF.

11. (12424) FACTORES DE INHIBICIÓN LIPÍDICA SECRETADOS POR CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS. JULIANELLI (1), V; CALVO (1,2), J C; GUERRA(1), L.

(1) Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (2) IBYME, CONICET.

Nuestro objetivo es estudiar factores de interacción entre el epitelio y el tejido adiposo de la glándula mamaria, utilizando como modelo líneas celulares murinas: NMMG (epiteliales mamarias) y 3T3-L1 (preadipocitos). Medio condicionado (MC) de NMMG fue obtenido y fraccionado por cromatografía en HiPrep Sephacryl S-200. Los eluidos fueron analizados a 280 nm y subfraccionados en una columna de FPLC Sepharosa 12. Las 3T3-L1 se cultivaron hasta el 80% de confluencia y se indujo su diferenciación (1-metil-3-isobutilxantina 0.5mM, dexametasona 0.1 uM y insulina 10ug/ml) en presencia o ausencia de MC. Se tomó como control positivo (CP) a células diferenciadas. Se cuantificaron los triglicéridos (Tg), usando un kit condicionado (MC) de índice de diferenciación. Resultados: La diferenciación de 3T3-L1 (CP) produjo 141.5 ± 3.5 ug Tg/ug ADN. Medios condicionados de NMMG (300ug proteínas/ml) y T47D-células de cáncer de mama (23ug proteínas/ml), inhibieron en 80% la acumulación de Tg respecto de CP. Al fraccionar en Sephacryl el MC se obtuvieron 5 fracciones, sólo la primera produjo un 70% de inhibición respecto de los valores observados en CP (Fracción 1: 44.0 ± 2.8 ug Tg/ug ADN, $p < 0.01$). En un gel de poliacrilamida 10%, teñido para proteínas, observamos que la fracción 1 está compuesta por más de una banda proteica; al sembrarla en Sepharosa 12 obtuvimos 6 posibles fracciones, (A-F). Estas fracciones inhibieron o incrementaron los niveles de Tg respecto de CP: A: $47.5 \pm 2.1\%$, B: $72.0 \pm 1.3\%$; C: $77.0 \pm 1.4\%$; F: $67.5 \pm 2.8\%$; E: $199.0 \pm 1.5\%$; D: no afectó la acumulación de Tg. Sólo la fracción A (peso molecular aproximado de 67 kDa) inhibió considerablemente los Tg (55.0 ± 0.7 ug Tg/ug ADN, $p < 0.01$). Nuestros resultados muestran que factores producidos por células de glándula mamaria normal inhiben la acumulación de triglicéridos en los adipocitos 3T3-L1. Estamos trabajando en la purificación e identificación de los factores, para poder correlacionar estos hallazgos con la situación in vivo. Agradecemos a L. Matkovic y S. Rumille por el procesamiento de muestras por FPLC.

12. (12427) ROL DE LA HIPERGLUCEMIA Y LA PROTEINA QUINASA C (PKC) EN LA RESPUESTA INMUNE DURANTE EL ESTADO DIABÉTICO. RUBINSTEIN GUICHON, ROXANA; SGANGA, LEONARDO; WALD, MIRIAM

CEFYBO - CONICET

El paciente con diabetes sufre de frecuentes procesos infecciosos, hecho que sugiere la presencia de un paralelismo entre el estado diabético y la inmunosupresión. Entre los principales agentes causales que participan en el desarrollo de estas complicaciones se encuentra la hiperglucemia. En el presente trabajo se estudió la respuesta inmune en el estado diabético y su interrelación con el efecto de la hiperglucemia sobre la funcionalidad linfocitaria normal. Se observó en ratones BALB/c diabéticos una disminución en la producción de anticuerpos tras una inmunización con antígenos T dependientes (glóbulo rojo de carnero) (control (C): 1:640, diabético (D): 1:160 $n=9$, $p < 0.01$) o T independientes (LPS) (C: 1:640, D: 1:320 $n=8$, $p < 0.01$) luego de 1 mes de inducida la patología. Sin embargo, la respuesta proliferativa in vitro –estimulada por mitógenos selectivos para linfocitos T (LT) y B (LB)- disminuyó significativamente en ambos, a partir de los 6 meses de diabetes. Con relación al efecto de la hiperglucemia, se observó que la proliferación celular fue inhibida por la preincubación con altas concentraciones de glucosa (Glu) de forma concentración y tiempo dependiente (24 hs con Glu 55.5 mM, LT: 48 ± 6 ; LB: 26 ± 6 % de inhibición, $n=8$, $p < 0.01$). Paralelamente se observó un incremento de la apoptosis. Los linfocitos preincubados con Glu recuperaron su capacidad proliferativa en ausencia de la misma. Altas concentraciones de manitol así como la presencia de Glu sin preincubación no alteraron la proliferación de LT y LB. Al estudiar la actividad de PKC observamos que Glu

(24 hs, 55.5 mM) la estimuló (ganglio: 41 ± 8 , bazo: 29 ± 5 % de incremento del control, $n=5$, $p < 0.01$) mientras que no se observó en presencia de Glu el aumento de la actividad enzimática que produce el mitógeno. De este modo, altas concentraciones de glucosa disminuyen la proliferación linfocitaria, involucrando un incremento sostenido en la actividad de PKC, que contribuiría a disminuir la respuesta inmune en el estado diabético.

13. (12429) CORRELACIÓN ENTRE INSULINORRESISTENCIA, ESTRÉS OXIDATIVO Y DENSIDAD DE VOLUMEN DE CÉLULAS B PANCREÁTICAS. DEL ZOTTO, HECTOR (1); BORELLI, M. INÉS (1); MADRID, VIVIANA (1); GARCÍA, M. ELISA (1); CHICCO, ADRIANA (2); LOMBARDO, YOLANDA (2); REBOLLEDO, OSCAR (1); GAGLIARDINO, JUAN J. (1).

CENEXA (UNLP-CONICET), La Plata Dpto Cs. Biológicas, Fac. Bioq. y Cs. Biológicas, UNL, Sta Fé

Introducción: La diabetes tipo 2 (DT2) se caracteriza por insulinoresistencia y disminución de la función y de la masa de células B. No está claro sin embargo el mecanismo que genera los cambios en las células B. Objetivo: Estudiar la correlación entre insulinoresistencia inducida por dieta rica en sacarosa (S), marcadores de estrés oxidativo (EO) y densidad de volumen (DV) de células B pancreáticas. Material y métodos: Utilizamos ratas normales alimentadas con almidón (C) o sacarosa (S) al 40% que sacrificamos a los 12 meses (S12), midiendo glucemias, insulinemias e inmunocitoquímica pancreática cuantitativa de células B y no B, Pdx-1, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OH-G) y apoptosis (histoquímica). Resultados: Las glucemias de las ratas S12 aumentaron y las insulinemias disminuyeron significativamente (S vs. C: Glucemias 8.3 ± 0.2 vs. 6.5 ± 0.2 mmol/L, $p < 0.05$; insulinemias 23 ± 2 vs. 58.8 ± 0.2 μ U/mL, $p < 0.05$). Morfometría: DV de células B: 0.5 ± 0.07 vs. 0.9 ± 0.09 , $p < 0.02$, células Pdx-1 positivas: 32.40 ± 3.2 vs. $45.7 \pm 2.9\%$, $p < 0.02$ y apoptosis: 13.5 ± 0.5 vs. $4.9 \pm 0.5\%$, $p < 0.02$. También se observó un incremento del índice de núcleos marcados con 8-OH-G. Nuestros resultados sugieren la siguiente secuencia de eventos patogénicos de los elementos estudiados: aumento del EO \rightarrow aumento de apoptosis \rightarrow disminución de la DV células B pancreáticas. Su identificación permitiría implementar nuevas estrategias de prevención de la DT2 basadas en el control del EO.

14. (12483) EFECTO PROLIFERATIVO DE CÉLULAS LACTOTROPAS INDUCIDO POR EGF: ACTIVACIÓN DE LA ERK1/2 POR ACCIÓN DE PKC. DE PAUL, ANA; GUTIERREZ, SILVINA; PETITI, JUAN PABLO; AOKI, AGUSTÍN; TORRES, ALICIA

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron un aumento de la expresión de la Proteína Quinasa C (PKC) isoforma epsilon asociado con la proliferación de células lactotropas inducida por EGF. En este trabajo nos propusimos determinar la posible interacción de PKC en la activación de la cascada de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) en los procesos proliferativos y biosintéticos de células lactotropas inducidos por EGF. Cultivos primarios adenohipofisarios de ratas hembras adultas fueron tratados por 24h con EGF (25ng/ml) sólo o combinado con bisindolymaleimide I (BIM) (0.5; 2; 5 y 10 μ M), un inhibidor de las PKC, incorporado 1h antes que el EGF. Se evaluó la proliferación celular mediante la doble detección inmunocitoquímica de BrdU y prolactina (PRL) (método ABC) y se procesaron las células para evaluar las modificaciones ultraestructurales. Se cuantificó por western blot la expresión de PKC-epsilon, ERK1/2- fosforilada (ERK 1/2-P) y ERK total (ERK-T) así como los niveles de PRL intracelular. Para el análisis de los datos, se aplicó test ANOVA-Tukey. EGF aumentó la actividad mitótica de las lactotropas ($p < 0.001$), así como la expresión de la PKC epsilon y ERK1/2-P. Un incremento similar

se obtuvo en los valores de PRL intracelular. El análisis ultraestructural reveló una activación de las organelas proteínopoyéticas involucradas en la síntesis de PRL. El tratamiento con las dosis mayores de BIM (5 y 10 μ M) revirtió parcialmente (25% y 50% respectivamente; $p < 0.001$) la proliferación de lactotropas inducida por EGF, así como los niveles de ERK1/2-P. Los niveles de la ERK-T se mantuvieron invariables frente a EGF sólo o en combinación con BIM. Los resultados indican que la vía de las ERK 1/2 participa en la proliferación y actividad biosintética de las células lactotropas inducida por EGF. Se demuestra que la PKC isoforma epsilon contribuiría a la activación de esta cascada de señales, exponiendo una interacción entre ambas enzimas.

15. (12570) REGULACIÓN ADRENOCORTICAL DE LA ENZIMA BETAÍNA-HOMOCISTEÍNA METILTRANSFERASA EN HÍGADO DE RATA. BORTONI, LAURA (2); MORALES, ANALÍA (2); PAZ, DANTE (1,3); D'ERAMO, JOSÉ L (2,4); FRIDMAN, OSVALDO (1,2)

1 CONICET. 2 Instituto de Ciencias Ambientales y Salud. 3 Dto de Biodiversidad y Biología Experimental. FCEyN. UBA. 4 Personal de Apoyo CONICET.

La elevación de la concentración de homocisteína plasmática total (tHcy) es un factor de riesgo de enfermedades vasculares. Pacientes tratados con glucocorticoides presentan niveles reducidos de tHcy y en ratas la adrenalectomía aumenta la tHcy y la dexamentasona restituye los niveles normales. Para investigar el sitio de intervención de la regulación adrenal sobre el metabolismo de la Hcy estudiamos los efectos de los glucocorticoides sobre la betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT) hepática, enzima que cataliza la remetilación de Hcy a metionina por captación de un metilo de la betaína. Ratas hembras adultas Sprague-Dawley fueron adrenalectomizadas (ADX) o falsamente operadas (sham) y sacrificadas 15 días después. Las ratas ADX recibieron salina como agua de bebida. Un segundo grupo de ratas fue tratado con metil-prednisolona (MP)s.c. (2mg/rata/día durante 14 días). Los controles recibieron vehículo. Mediante un método radioenzimático utilizando 14C-betaína, se midió la actividad de la BHMT en sobrenadantes de homogenatos de los hígados por cuantificación de la producción de 14C-metionina. Se determinó por Western blot si la respuesta a los glucocorticoides incluye un aumento de la cantidad de proteína BHMT. Resultados. La adrenalectomía produjo una reducción en la actividad de la enzima (Sham 14,23 vs ADX 9,26 nmoles/mg prot; $p < 0,005$) y el tratamiento con MP la estimuló (Cont: 15,65 vs MP: 21,52 nmoles/mg prot; $p < 0,02$). En un segundo experimento las ratas ADX tuvieron un 21,5% menos de actividad que las sham ($p < 0,04$). El Western blot mostró una disminución en los niveles de la proteína BHMT en los hígados de las ADX y un aumento en los de las tratadas con MP. Estas variaciones involucraron a la forma monomérica de 45 kDa y también a una banda de 32 kDa, posible producto de degradación metabólica de la enzima. Estos resultados muestran que los glucocorticoides están involucrados en la regulación de la concentración de tHcy afectando la vía de remetilación hepática.

16. (12652) PARTICIPACIÓN DE LA PKC ALFA Y ERK 1/2 EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS DE RATA INDUCIDAS CON ESTERES DE FORBOL PETITI, JUAN PABLO; DE PAUL, ANA; GUTIERREZ, SILVINA; MUKDSI, JORGE; TORRES, ALICIA

Centro de Microscopía Electrónica. Fac. de Cs. Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Las PKC involucradas en la proliferación celular constituyen un blanco atractivo en la terapia del cáncer. El objetivo de este trabajo fue determinar si las isoformas de PKC alfa, epsilon y delta están involucradas en la proliferación de lactotropas inducidas con esteres de forbol (PMA) y la posible participación de las ERK1/2. Cultivos de adenohipófisis de ratas hembras fueron tratadas con

PMA (400 nM) por 15min para activar las PKC y por 5 y 8h para analizar su desregulación. Además la activación de las PKC fue bloqueada con un inhibidor específico (BIM 4 μ M) por 30min. La proliferación de lactotropas fue cuantificada por doble inmunomarcación para BrdU y PRL. La expresión de las PKC alfa, epsilon, delta y ERK1/2 fosforilada (P) fue determinada por western blot en extractos totales de células controles y tratadas con PMA y BIM +PMA. Los datos fueron analizados por ANOVA-Tukey. El tratamiento con PMA por 15min aumentó un 37,3% la proliferación de lactotropas ($p < 0.001$). Este efecto fue revertido en un 60% por acción del BIM ($p < 0.05$). Tratamientos prolongados con PMA (5 y 8h) disminuyeron la proliferación de lactotropas con respecto a la observada a los 15min ($p < 0.001$). Un comportamiento similar mostró la expresión de la PKC alfa al aumentar un 46,6% ($p < 0.05$) a los 15min de exposición al PMA y disminuir ($p < 0.01$) a tiempos prolongados. Las PKC epsilon y delta no mostraron diferencias significativas en los tratamientos con PMA. Un marcado incremento ($p < 0.05$) en la expresión de ERK1/2-P fue observado a los 15min con PMA, efecto bloqueado parcialmente por BIM. La correlación entre la expresión de PKC alfa y la proliferación de lactotropas inducida con PMA, indicaría la participación de esta isoforma en el proceso proliferativo. Los cambios observados en la expresión de las ERK1/2-P, demostrarían que una de las vías de transducción de señales involucradas en la proliferación de células lactotropas inducidas por PMA estaría mediada por la activación de las ERK1/2.

ENDOCRINOLOGIA B

17. (11868) LIBERACIÓN RÁPIDA DE CORTICOSTERONA: INTERACCIÓN ENTRE ÓXIDO NÍTRICO Y MONÓXIDO DE CARBONO. MOHN, CLAUDIA; PRESTIFILIPPO, JUAN PABLO; FERNANDEZ SOLARI, JAVIER; BORNSTEIN, STEFAN R(1); MCCANN, SAMUEL; RETTORI, VALERIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET), Facultad de Medicina, UBA. PICT 03-14264 (1) Universidad de Dresden, Alemania.

ACTH es la principal hormona estimuladora de la secreción de glucocorticoides por la glándula adrenal (GA). Hemos demostrado que en la liberación no genómica de corticosterona (B) estimulada por ACTH participan el óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas. El monóxido de carbono (CO) podría estar involucrado en la liberación de B ya que ACTH estimula la actividad de la hemo oxigenasa (HO). En el presente trabajo estudiamos la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en GA incubada con ACTH. GA de ratas macho Wistar (n=10/grupo) fueron incubadas in vitro en: Krebs Ringer= control, ACTH 10 (-7, -8, -9)M. ACTH 10(-9)M en presencia de un inhibidor de la HO, estaño protoporfirina IX (SnPPIX 50 μ M) y SnPPIX solo. La actividad de NOS se midió por el método Arginina C(14) citrulina y B en el medio de incubación por RIA. Los resultados se analizaron por ANOVA y test de Newman-Keul's, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ACTH inhibió la actividad de NOS en todas las concentraciones usadas (C: 1.14 \pm 0.2 nmol NO/min/mg prot; 10 (-9)M: 0.66 \pm 0.1*; 10(-8)M: 0.46 \pm 0.1**; ACTH 10(-7)M: 0.38 \pm 0.01**). El inhibidor de HO revirtió la inhibición de NOS y dejó en evidencia el aumento de NOS producido por ACTH (C: 1.25 \pm 0.1; ACTH 10(-9) 0.83 \pm 0.6*; SnPPIX+ACTH: 2.23 \pm 0.3***; SnPPIX: 1.01 \pm 0.07). ACTH estimuló la liberación de B en todas las concentraciones usadas y el inhibidor de HO aumentó el estímulo de ACTH 10(-9)M (C:30 \pm 2 ng/mg prot, ACTH 10(-9)M: 46.6 \pm 4.6**, ACTH+SnPPIX: 151.9 \pm 37***, SnPPIX: 42 \pm 4.6). El contenido de AMPc fue aumentado por ACTH y FRSK (C: 343.7 \pm 13.8 fmol/mg prot; ACTH 10(-9)M: 409.2 \pm 16 **; FRSK: 997 \pm 229***). Tanto FRSK como mbAMPc no tuvieron efecto sobre la liberación de B. En la vía de liberación rápida de B estimulada por ACTH participan NO y las prostaglandinas. ACTH activa la NOS y el NO liberado activaría la COX y la HO. El aumento de CO inhibiría la actividad de la NOS a modo de retroalimentación negativo evitando una liberación excesiva de corticosterona inducida por NO.

18. (11947) CAMBIOS MORFOMÉTRICOS EN LA POBLACIÓN LACTOTROPA CON INMUNONEUTRALIZACIÓN DE LA TIMULINA SÉRICA DURANTE LA VIDA TEMPRANA. CAMIHORT, GISELA(1); LUNA, GEORGINA(1,2); FERESE, CELIA(2); BRACAMONTE, MARIA(3); GOYA, RODOLFO(3); CÓNSOLE, GLORIA(1,2)

Cátedra "B" Histología - Embriología Facultad de Ciencias Médicas UNLP. Cátedra "B" de Citología, Histología-Embriología. Facultad de Ciencias Médicas UNLP (1), CICBA(2), INIBIOLP-CONICET(3)

En animales timectomizados y en ratones nude se halló que la ausencia de timo durante la vida perinatal causa múltiples desórdenes neuroendocrinos. La inmunoneutralización de la timulina sérica pretende explorar la hipótesis de que la timulina participa en dichos cambios. Se investigaron los parámetros morfológicos en la población lactotropa. Ratones hembras y machos C57BL/6 fueron inyectados con suero normal de conejo (SNC) o con antisuero anti-timulina (AAT) (12µl/g, vía i.p.) en los días 2,3,7,14,21 y 29 de vida postnatal. A los 33 días fueron sacrificados, obteniéndose pituitarias que fueron procesadas para microscopía de luz y muestras séricas para la determinación de timulina mediante RIA, 10 días: pre-tratamiento 288±81; post-tratamiento 24±20 fg/ml y bioensayo de rosetas. Se inmunomarcó con un sistema anti-PRL-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros morfológicos mediante videomicroscopía (Optimas), densidad de volumen (DV), densidad de células (DC) y tamaño celular (TC). Se hallaron cambios significativos en DV (p=0.003) y DC (p=0.0004) en animales tratados (AAT) respecto a controles.

	HEMBRAS	HEMBRAS	MACHOS	MACHOS
PRL	SNC	AAT	SNC	AAT
DVX10 ⁻²	12.1±0.6	4.2±1*	11.1±1	3.2±0.3*
DCX10 ⁻⁴	23±1	10±2*	20.5±2	6.7±0.6*
TCµm ²	52.3±1	49.5±2	53±0.5	50.4±0.8

Se concluye que los cambios morfométricos hallados en el grupo tratado son compatibles con una hipoplasia celular lactotropa.

19. (12120) EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LHRH SOBRE LOS MEDIADORES DE SU LIBERACIÓN. FERNÁNDEZ SOLARI, JAVIER (1); PRESTIFILIPPO, JUAN PABLO(1); MOHN, CLAUDIA(1); REYNOSO, ROXANA(2); MCCANN, SAMUEL(1); RETTORI, VALERIA(1).

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET-Facultad de Medicina, UBA (PICT 03-14264) (2) Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA.

El control neuroendocrino de la reproducción se ejerce principalmente a través de la secreción de gonadotropinas en respuesta a la estimulación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH). La expresión de receptores de LHRH en neuronas LHRHérgicas sugiere la existencia de una regulación autócrina de la liberación del péptido. La función de estos receptores sería autoinhibitoria ya que hipotálamos medio basales (HMB) incubados en presencia de agonistas de LHRH disminuyeron la liberación del péptido. El objetivo del presente trabajo fue determinar los mecanismos de la retroalimentación negativa de LHRH sobre su propia liberación. Se realizaron incubaciones "in vitro" de HMB de ratas Wistar macho adultas (6/grupo) durante 30 min con distintas concentraciones de LHRH y luego se midieron los mediadores de su liberación. El contenido de AMPc (fmol/HMB), GMPc (pmol/HMB) y PGE (pg/HMB) se midieron por RIA, la liberación de GABA (nmol/HMB) y glutamato (nmol/HMB) por HPLC y la actividad de la NOS (pmol NO/HMB) por el método de argininaC(14). Los resultados fueron analizados por ANOVA-Newman Keuls, *p<0.05 y **p<0.01 vs control (C). El contenido

de PGE (C: 263.0±30.1; LHRH 10(-11)M: 141.1±12.2**; 10(-9)M: 134.0±17.1**; 10(-7)M: 106.2±18.3**) así como la liberación de glutamato (C: 13.9±0.9; LHRH 10(-9)M: 8.6±0.6**; 10(-7)M: 7.7±0.3**), factores estimuladores de la liberación de LHRH, disminuyeron en los HMB incubados con distintas concentraciones de LHRH. Por otro lado, la liberación del neurotransmisor inhibitorio, GABA, aumentó en los HMB incubados con LHRH a bajas concentraciones (C: 9.0±0.8; 10(-11)M: 15.5±2.2*), coincidiendo con el aumento del contenido de AMPc. Además, LHRH 10(-7)M incrementó la actividad de la NOS y el contenido de GMPc. LHRH genera respuestas concentración-dependientes distintas sobre los mediadores de su liberación. El aumento de GABA y la disminución de glutamato y PGE serían los factores involucrados en la retroalimentación negativa.

20. (12121) REGULACIÓN HORMONAL DEL POLIMORFISMO DE FSH: ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN GÉNICA DE SIALILTRANSFERASAS AMBAO, VERÓNICA (1); ULLOA-AGUIRRE, ALFREDO (2); RULLI, SUSANA (3); CALANDRA, RICARDO (3); CAMPO, STELLA (1).

CEDIE, Buenos Aires, Argentina 2 UIMER, México DF, México. 3 IBYME, Buenos Aires, Argentina.

En trabajos previos hemos demostrado que el entorno hormonal regula el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH y, en consecuencia, la biopotencia de la hormona. El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad (evaluada por la abundancia relativa de análogos de carga de FSH) y expresión génica (niveles de ARNm) de las sialiltransferasas ST3N y ST6N en hipófisis de ratas macho durante el desarrollo sexual (15, 22 y 60 días de vida) y luego de 40 días de castración en animales adultos. Se utilizó isoelectroenfoque preparativo, cromatografía en Concanavalina A y RT-PCR semicuantitativa. Se observó un aumento significativo en la proporción de análogos de carga más ácidos/sializados (aislados a pH < 4.0) en animales adultos respecto de infantiles y prepúberes: 40.0 ± 1.4 vs 27.5 ± 2.1 y 25.4 ± 3.7%, respectivamente (P < 0.01). Concomitantemente, se observó un incremento significativo de la expresión génica de la ST6N (DO ST6N/ DO GAPDH: 1.37 ± 0.24 vs 0.35 ± 0.06 y 0.46 ± 0.03; P < 0.01). Luego de la castración, la proporción de FSH aislada a pH < 4.0 disminuyó y los niveles de ARNm de la ST6N aumentaron significativamente (P < 0.05; P < 0.001, respectivamente). La expresión génica de la ST3N no presentó cambios. El aumento de la expresión génica de la ST6N luego de la castración no se evidenció en el grado de sialización de la hormona debido a la imposibilidad de incorporar ácido siálico a las cadenas de carbohidratos incompletos, de tipo híbrido que están presentes en un 69% del total de la hormona sintetizada en estas condiciones experimentales. Estos resultados sugieren que los cambios del entorno hormonal, GnRH y andrógenos, modulan el grado de sialización de la FSH a través de la expresión génica de la sialiltransferasa ST6N. La expresión de la sialiltransferasa ST3N no estaría regulada hormonalmente en la rata macho.

21. (12196) EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN ADENOHIPOFISARIA DE TNF-ALFA, SU RECEPTOR TIPO I (TNFRI) Y BAX. ZALDIVAR, VERÓNICA; CANDOLFI, MARIANELA; ZÁRATE, SANDRA; JAITA, GABRIELA; CARUSO, CARLA; PISERA, DANIEL; SEILICOVICH, ADRIANA.

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que el TNF-alfa induce apoptosis de células adenohipofisarias. La liberación adenohipofisaria de TNF-alfa es dependiente del estradiol y mayor en células provenientes de ratas en proestro que en diestro. Además, demostramos que los efectos pro-apoptóticos del TNF-alfa en células adenohipofisarias son estrógeno-dependientes. Uno de los mecanismos que interviene en la regulación de los procesos de apoptosis es el balance entre proteínas pro y anti-

apoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2. En el presente trabajo investigamos la expresión de TNF-alfa, TNFRI y Bax (una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2) en adenohipófisis de ratas hembras Wistar adultas y su posible modulación por estrógenos. En ratas ciclanteras, la expresión de TNF-alfa (por RT-PCR) fue mayor en las adenohipófisis de ratas en proestro que en diestro (D: 1.00 ± 0.03 , P: 1.12 ± 0.02 ; $p < 0.05$). En cultivos de células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas (OVX), la presencia de estradiol (E2, 10-9M) aumentó la expresión de TNF-alfa (Vehículo: 1.00 ± 0.07 , E2: 1.39 ± 0.06 ; $p < 0.01$) pero no modificó la expresión de TNFRI (por RT-PCR). La estrogenización crónica de ratas OVX (implantes s.c. con 1 mg E2) aunque no modificó la expresión adenohipofisaria de TNFRI (por RT-PCR y Western Blot) incrementó aproximadamente 2.5 veces la expresión de Bax (por Western Blot). Estos resultados sugieren que la acción sensibilizadora del estradiol al efecto proapoptótico del TNF-alfa no involucraría cambios en la expresión de TNFRI pero estaría mediada por modificaciones en la síntesis de proteínas pro-apoptóticas.

22. (12398) ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO DE INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA REBOLLEDO, OSCAR; GARCÍA, M. ELISA; ALZUGARAY, M. EUGENIA; MAIZTEGUI, BÁRBARA; GAGLIARDINO, JUAN J.

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

La insulinorresistencia (IR) previa al desarrollo de una diabetes Tipo2 (DT2) se caracteriza por una respuesta deficiente de diferentes tejidos a la insulina, que produce alteraciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. Recientemente se ha sugerido que dicho dismetabolismo generaría en etapas tempranas un estrés oxidativo (EO) que contribuiría al desarrollo de la DT2. El objetivo de este trabajo fue determinar si la IR inducida por la administración de una dieta rica en fructosa promueve la aparición simultánea de marcadores de EO. Material y métodos: Empleamos ratas Wistar normales alimentadas durante 3 semanas con una dieta comercial con o sin el agregado de fructosa al 10% (DFR y DCT, respectivamente). En ambos grupos se midió glucosa (G), triglicéridos (TG) (mét. enzimáticos), insulina (IN) (RIA) en plasma y TBARS (sustancias reductoras del ácido tiobarbitúrico producto de la degradación oxidativa de ácidos grasos polinsaturados; mét. colorimétrico) en homogenados de hígado, músculo esquelético, grasa epididimaria, corazón, riñón y cerebro. Resultados: Se observaron aumentos significativos en DFR respecto de DCT en G (149 ± 4.1 vs. 129 ± 4.8 mg/dl; $p < 0.005$), TG (114 ± 6.5 vs. 68 ± 7.0 mg/dl; $p < 0.001$) e IN (4.7 ± 0.6 vs. 2.7 ± 0.5 ng/ml; $p < 0.02$). En todos los tejidos analizados los TBARS (nmol/mg proteína) fueron significativamente mayores en los animales DFR que en los DCT (Tabla 1), así como el índice de medida de IR HOMA (40 ± 5.3 vs. 21 ± 3.4 ; $p < 0.005$).

Tejido	Hígado	Músculo	Grasa	Corazón	Riñón	Cerebro
DCT	8.8±0.5	20.9 ±1.3	243.4±12.2	10.0±0.7	18.2±1.2	88.1±5.2
DFR	13.9±1.0	31.1±4.6	378.9±31.9	15.4±1.2	26.6±1.8	123.7±8.9
DCT vs DFR	$p < 0.001$	< 0.05	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.01

La IR inducida por DRF induce cambios metabólicos y daño oxidativo que promoverían la lesión de las células B y el consecuente desarrollo de una DT2.

23. (12454) PARTICIPACIÓN DE LA DOPAMINA EN LA RESPUESTA ADENOHIPOFISARIA A LA ENDOTOXEMIA. RADL, DANIELA; DE LAURENTIIS, ANDREA; ZÁRATE, SANDRA; JAITA, GABRIELA; ZALDIVAR, VERÓNICA; SEILICOVICH, ADRIANA; PISERA, DANIEL

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Hemos observado que en ratas machos la endotoxemia aguda inducida por la administración sistémica de lipopolisacárido

bacteriano (LPS) aumenta la actividad dopaminérgica hipotálamo-hipofisaria y reduce la concentración plasmática de prolactina. Además, la endotoxemia induce apoptosis de lactotropos en ratas hembras estrogenizadas pero no en ratas ovariectomizadas. De hecho, la respuesta apoptótica de la adenohipófisis a la administración de LPS es mayor durante el proestro. Nuestro objetivo fue investigar la participación del sistema dopaminérgico hipotálamo-hipofisario en la respuesta adenohipofisaria a la endotoxemia en la rata hembra, y su posible modulación por estrógenos. Para ello determinamos los efectos de la endotoxemia aguda (LPS ip 250 µg/rata, 4 h) sobre la actividad dopaminérgica hipotalámica (evaluada como la relación DOPAC/dopamina, mediante HPLC) en ratas ovariectomizadas (OVX) y en ratas crónicamente estrogenizadas mediante implantes sc conteniendo 1 mg de 17β-estradiol (E[2]). La actividad dopaminérgica hipotalámica inducida por la administración de LPS fue significativamente mayor en las ratas estrogenizadas (OVX+LPS: 0.120 ± 0.012 vs E[2]+LPS: 0.228 ± 0.021 , $p < 0.01$, ANOVA). Con el objeto de investigar la posible participación de la dopamina en los procesos de muerte celular en la adenohipófisis, evaluamos los efectos de esta catecolamina sobre la viabilidad (determinada por MTS, D.O. 490 nm) de células adenohipofisarias en cultivo provenientes de ratas OVX. La dopamina (DA, 10(-6) M, 4 h) disminuyó la viabilidad sólo cuando las células fueron cultivadas en presencia de 17β-estradiol (E[2], 10(-9) M) (Control: 0.408 ± 0.011 vs DA: 0.426 ± 0.016 , n.s.; E[2]: 0.422 ± 0.012 vs. E[2]+DA: 0.361 ± 0.014 , $p < 0.05$, ANOVA). Estos resultados sugieren que la dopamina podría estar involucrada en la respuesta adenohipofisaria a la endotoxemia, y que su participación en los procesos de muerte celular estaría modulada por los estrógenos.

24. (12458) PAPEL DEL RECEPTOR GABAB EN LA REGULACIÓN DE LA GLUCEMIA. BONAVENTURA, MARÍA MARTA (1); CATALANO, PAOLO (1,3); BETTLER, BERNHARD (2); LIBERTUN, CARLOS (1,3); LUX-LANTOS, VICTORIA.

Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET. (2) Universidad de Basilea, Suiza (3) Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Se ha descrito la presencia de altas concentraciones de GABA y de receptores GABAB (RGABAB) en células β de islotes de Langherhans. Dado que no se ha establecido aún la importancia del sistema gabaérgico en la regulación de la glucemia, se decidió estudiar el rol de los RGABAB en dicho proceso. Se utilizaron los siguientes modelos experimentales in vivo en machos adultos BALB/c: a) salvajes (WT) tratados con baclofén (BACL) o salina (SAL) y b) Knock-out para la subunidad B1 del receptor GABAB (KO) y controles WT. Se determinó la glucemia (GLUC) con tiras reactivas y la insulinemia por ELISA. Se cuantificó el contenido pancreático total de insulina por RIA. Se hicieron tests de tolerancia a la glucosa (TTG, 2 g/kg i.p.) en animales WT pretratados con BACL (7.5 mg/kg i.p., 20 min previo a la glucosa) y en controles (SAL), hallándose diferencias significativas [GLUC (mg/dl) SAL: T0': 78.2 ± 5.7 , T30': 190.0 ± 21.6 , T75': 106.5 ± 15.1 (n=6); BACL: T0': 79.3 ± 7.2 , T30': 152.5 ± 14.6 , T75': 172.2 ± 15.8 (n=6), ANOVA en dos sentidos: interacción: $p < 0.05$]. Se realizó un ensayo de secreción de insulina frente a la sobrecarga de glucosa (3g/kg i.p.) obteniéndose diferencias significativas entre tratamientos [Área bajo la curva (ABC) de insulinemia (ng/ml*min): SAL: 30.8 ± 1.6 vs BACL: 23.5 ± 2.6 , (n=11), $p < 0.05$]. La GLUC basal en KO, tanto ayunados como no ayunados, no difirieron de los WT, sin embargo se observó una respuesta diferencial en los TTG (ANOVA en dos sentidos: tiempo y genotipo $p < 0.01$, interacción ns), siendo el ABC significativamente menor en animales KO [ABC de GLUC (mg/dl*min): WT: 15094 ± 607 (n=16) vs KO 17478 ± 607 (n=16), $p < 0.03$]. El contenido de insulina en páncreas de KO fue mayor que en WT [Ins (ng/mg tejido): WT: 9.8 ± 1.9 (n=10) vs 22.7 ± 4.1 (n=12), $p < 0.02$]. Estos hallazgos indican que el receptor GABAB estaría involucrado en la regulación de la glucemia al inhibir la secreción de insulina y jugaría algún papel fisiológico en la respuesta frente a la sobrecarga de glucosa (CONICET-UBA-ANPCYT).

25. (12459) CARACTERIZACIÓN DE TUMORES TESTICULARES DEL ESTROMA GONADAL EN RATONES TRANSGÉNICOS CON FUSIÓN DEL PROMOTOR DE AMH Y EL ONCOGEN SIMIAN VIRUS 40. VENARA, MARCELA (1); QUINTANA, SILVINA (1); REY, RODOLFO (1); DUTERTRE, MARTIN (2); PICARD, JEAN YVES (2); XAVIER, FRANCOISE (2); CHEMES, HÉCTOR (1)

(1) CEDIE, Hosp. Niños Gutierrez, Buenos Aires y (2) Unidad INSERM, Clamart, Francia.

Los ratones portadores de un transgén en el que la expresión del oncogén SV40 está dirigida por el promotor de AMH (ratones AT) desarrollan tumores testiculares a lo largo de su vida. Nuestro objetivo fue estudiar las etapas tempranas del desarrollo tumoral y caracterizar los tumores a diversas edades con técnicas histológicas, morfométricas e inmunohistoquímicas. En los ratones AT de 22 días a 3 meses se observó hiperplasia multifocal de células de Leydig. El área ocupada por el intersticio fue mayor en algunos animales transgénicos que en controles de la misma edad. Entre los 5 ½ y 7 meses se asociaron microtumores intersticiales (no en todos los ratones AT), que en animales mayores de hasta 14 meses, se presentaron como tumores confluentes de gran tamaño con aspectos cordonado-tubulares, de diferenciación de Leydig y alto índice mitótico. Hiperplasias y tumores expresaron difusamente 3βhidroxiesteroidesdeshidrogenasa (HSD) y alfa inhibina. La AMH fue negativa en hiperplasias y débilmente positiva en tumores. Los antígenos SV40T y de proliferación celular (PCNA) fueron muy positivos en las células hiperplásicas y tumorales. En controles no hubo hiperplasias ni tumores y SV40T fue negativo. El fenotipo histopatológico e inmunohistoquímico de los tumores de los ratones AT (estructura cordonado-tubular-Leydig, 3βHSD +, alfa inhibina + variable y AMH+ débil) sugiere que son del estroma gonadal específico con diferenciación de Leydig. Evolutivamente están precedidos por una etapa de hiperplasia intersticial, y a veces por la formación de microtumores. El interesante hallazgo que un transgén destinado a expresarse en las células de Sertoli dio lugar a un tumor del estroma gonadal con diferenciación de Leydig, es compatible con el origen común del estroma gonadal específico (células de Sertoli y Leydig).

26. (12460) EXPRESION DIFERENCIAL DEL RECEPTOR DE OREXINAS (OX1) DURANTE EL CICLO ESTRAL. (1,2); PAOLO, CATALANO (1,2); VICTORIA, LUX-LANTOS (1); CARLOS, LIBERTUN (1,2)

IBYME-CONICET (1) Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET (2) Universidad de Buenos Aires

Recientemente informamos en ratas hembras adultas un incremento en la expresión de los receptores de orexinas en hipotálamo, hipófisis y bulbos olfatorios, pero no en corteza frontoparietal (CF), a partir de las 19 h del proestro. Postulamos que estos cambios selectivos podrían asociarse a los patrones hormonales del proestro, y/o, al ciclo luz-oscuridad (Medicina 64 (Supl. II), Pág 243). Aquí analizamos la expresión del receptor OX1 en ratas de 60 días: hembras en todos los estadios del ciclo estral y machos. Se decapitaron a las 11, 15, 17, 19 y 23 hs; extrajeron y homogeneizaron en TRIzol: hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio basal (HMB), hipófisis (Hf) y CF. Analizamos mediante RT-PCR y confirmamos por Real Time PCR la expresión de OX1. Por RIA verificamos los estadios del ciclo mediante los niveles de LH, FSH, PRL, estradiol y progesterona en suero de hembras, y determinamos LH, FSH y testosterona en suero de machos. También medimos la ingesta diaria (7h a 19h) y nocturna (19h a 7h) de los animales. Observamos los picos preovulatorios de gonadotropinas y esteroides propios de la cepa y la mayor ingesta durante la noche, sin diferencias entre los grupos. En hembras, en HA, HMB e Hf se observó un aumento significativo de la expresión de OX1 a las 19 hs del proestro [RNAm OX1/ RNAm ciclofilina (UA). HA: 11h: 0.64±0.09 (n=5) vs 19h: 1.97±0.09 (n=5), p<0.05; HMB 11h 1.36±0.17 (n=8) vs 19h

3.10±0.35 (n=6), p<0.05; HF 11h 0.41± 0.03 (n=5) vs 19h 1.52±0.05 (n=5), p<0.05]; no se observó dicho aumento en CF ni en los otros días del ciclo. En machos tampoco observamos diferencias en los niveles de expresión de OX1 entre todos los horarios y tejidos ensayados. Concluimos que la expresión diferencial del receptor OX1 en hipotálamo e hipófisis en la noche del proestro puede estar asociada a los patrones hormonales propios del proestro y no al ciclo luz-oscuridad. (CONICET-UBA-ANPCYT).

27. (12475) EFECTO DEL DISRUPTOR ENDOCRINO OMC (OCTYL-METHOXY-CINNAMATE) SOBRE AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES HIPOTALÁMICOS EN RATAS ADULTAS. CARBONE, SILVIA; SZWARCFARB, BERTA; REYNOSO, ROXANA; BOLLERO, GABRIELA; PONZO, OVALDO; MOGUILVSKY, JAIME A.; SCACCHI, PABLO

Instituto de Fisiología. Fac. Medicina-UBA-CONICET

El disruptor endócrino OMC (octyl-methoxy-cinnamate), es una sustancia con propiedades anti UV, usada en los protectores solares. Observamos que inhibe al Gn-RH en ratas macho adultas, correlacionándose con cambios en los neurotransmisores. Se estudió el efecto del OMC sobre la liberación hipotalámica de aspartato (ASP), glutamato (GLU) y GABA en ratas macho y hembra adultas post 30 días de castración y con reemplazo hormonal. Se incubaron, en medio de Earle's, fragmentos de hipotálamo anterior y medio basal de animales (n= 10): 1) Machos post castración; 2) Hembras post castración; 3) Machos castrados inyectados 48 hs. antes del sacrificio con testosterona (To) (100 ug/0.1 ml) ; 4) Hembras castradas con tratamiento de estrógenos (20 ug/0.1 ml) y progesterona (2 mg/0.1 ml) 72 y 4 hs. respectivamente, antes del sacrificio (E-P). Luego de un período de estabilización se midió la liberación basal durante 30 min y se adicionó OMC 10 (-7) M, prosiguiendo hasta los 60 min. Se determinó en el medio de incubación, la concentración de ASP, GLU y GABA por HPLC. El OMC no modificó la liberación de aminoácidos neurotransmisores en los animales de ambos sexos gonadectomizados. En machos y hembras castrados tratados con hormonas sexuales, el OMC disminuyó significativamente (p<0.001) la liberación (pm/100ul de medio) de ASP (MACHOS: 1124 ± 58 vs 584 ± 72; HEMBRAS: 803 ± 51 vs 370 ± 44); GLU (MACHOS: 4518 ± 169 vs 1132 ± 158; HEMBRAS: 365 ± 70 vs 86 ± 12) y no modificó GABA (MACHOS: 1528 ± 183 vs 1225 ± 230; HEMBRAS: 1331 ± 320 vs 1158 ± 47). Se concluye, que el OMC sólo inhibe la liberación de ASP y GLU hipotalámicos en ratas macho y hembra gonadectomizadas con tratamiento hormonal, no observándose efecto del disruptor sobre la liberación de GABA. Los resultados indicarían que es necesario la presencia de hormonas sexuales para que el OMC ejerza su efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo-hipofisogonadal.

28. (12545) CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES EN LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA GENERACIÓN E INVOLUCIÓN DEL BOCIO. RANDI, A.; THOMASZ, L.; CABRINI, R.; BRANDIZZI, D.; JUVENAL, G.; KLEIMAN DE PISAREV, D.; PISAREV, M

CNEA. Deptos de Radiobiología (CNEA) y de Bioquímica Humana (Fac. de Medicina, UBA)

El exceso de yodo inhibe la proliferación tiroidea a través de un compuesto organificado (autorregulación). Se ha propuesto a la iodolactona del ácido araquidónico (IL) como intermediario. Dado que TGF-B1 reproduce los efectos del yodo se ha propuesto que participa de la autorregulación. Para aclarar los mecanismos bioquímicos involucrados se realizaron los siguientes estudios. Ratas Wistar macho 80-120 g peso corporal fueron tratadas durante 3 días con metilmercaptoimidazol (bociógeno, MMI) 10 mg/d; IL ó IK 10 ug/d; MMI + IL ó IK. Se determinó la relación peso tiroideo/peso corporal (PT/PC); la expresión de c-fos, c-myc

y TGF-B1 y -B3 por Western blot y el contenido de ADN (Feulgen microespectrofotometría). Se obtuvieron gráficos de ploidía, asimetría e índice de desviación del valor de diploidía (2cDi). Resultados: MMI: aumentó la relación PT/PC un 40% (ns), c-fos (157%, $p < 0.05$), TGF-B1 (54% $p < 0.05$), TOD, area nuclear y asimetría. No alteró: c-myc y TGF-B3; Iodolactona: aumentó: c-myc (29% n.s.), TGF-B3 (55%), TOD y area nuclear. No altera: TGF-B1 y c-fos; IK: aumenta: c-myc (50% $p < 0.05$), TGF-B1 (110% $p < 0.05$) y B3 (78% $p < 0.05$), TOD. No altera: c-fos y disminuye: área nuclear y ploidía. en esta etapa temprana en que hay un leve y no significativo aumento del peso tiroideo se observa un aumento de c-fos (pro-proliferación) y de TGF-B1 (acción contra-regulatoria). La IL, pero no el IK, revierten el efecto del MMI, mostrando una vez más que el yodo debe ser organificado para ejercer su acción antiproliferativa. Hay una acción diferencial: IL aumenta TGF-B3, y el IK aumenta TGF-B1, cuyo significado debe aclararse. Los estudios a 7 y 14 días permitirán completar el panorama. Apoyado por CNEA y subsidios de CONICET, SECYT y UBA.

29. (12609) RESPUESTA DIFERENCIAL DE AMINOÁCIDOS HIPOTALÁMICOS, LIBERACIÓN DE Gn-RH Y SECRECIÓN DE LH ANTE LA INYECCIÓN DE LPS. INFLUENCIA DEL CICLO LUZ-OSCURIDAD. REYNOSO, ROXANA MARÍA; BOGGIO, VERONICA I.; BOLLERO, GABRIELA; SZWARCFARB, BERTA; SCACCHI, PABLO; CARDINALI, DANIEL P.; CUTRERA, RODOLFO A.

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

Trabajos previos demuestran que la disminución de la liberación de LH por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) se correlaciona con el efecto de esta endotoxina sobre la liberación de algunos aminoácidos (AA) hipotalámicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del LPS en dos horarios del ciclo Luz-Oscuridad (ZT6: la mitad del ciclo luz y ZT18: mitad del ciclo oscuridad; definiendo ZT12 como el apagado de la luz) sobre la liberación de: a) Gn-RH, b) ácido glutámico (Glu), c) ácido aspártico (Asp), d) GABA, e) Glicina (Gli) así como sobre la secreción de LH. Para ello, se inyectó LPS (30 ug/kg, i.p.) o vehículo a hámsteres dorados machos adultos ($n=7-9$ /grupo), sacrificándolos 3 horas después. Se recolectó la sangre troncal midiéndose LH sérica (RIA, ng/ml). Además, se disecó el área preóptica/hipotálamo medio basal para la incubación y posterior medición de los aminoácidos (HPLC, pmol/100 ul medio) y de Gn-RH (RIA, pg/ml). La administración de LPS disminuyó los niveles plasmáticos de LH ya sea a ZT6 (45%, $p < 0.001$) como a ZT18 (61,9%, $p < 0.001$). Esto se acompañó de un descenso significativo en la liberación de Gn-RH a ZT6 (57.7%, $p < 0.001$) y a ZT18 (50.4%, $p < 0.001$). La liberación de Asp disminuyó un 36% (ZT6) y un 40% (ZT18) ($p < 0.01$), la de Glu no se modificó a ZT6, disminuyendo a ZT18 (34.6%, $p < 0.002$). El GABA aumentó a ZT6 (65%, $p < 0.0001$) sin mostrar cambios a ZT18. Por último, Gli disminuyó a ZT6 (64%,) aumentando a ZT18 (175%) ($p < 0.0001$). La disminución de la liberación de Gn-RH y de la secreción de LH observada en la mitad del periodo de luz podría asociarse a un aumento del tono inhibitorio del GABA sumado al descenso del Asp. En cambio, en la mitad del periodo de oscuridad, el importante incremento observado en la liberación de Gli junto con la disminución de ambos AA excitatorios jugarían un papel en dicho efecto.

30. (12782) EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICAS BRION, LAURA; GOROSTIZAGA, ALEJANDRA; CORNEJO MACIEL, FABIANA; PODESTA, ERNESTO J.; PAZ, CRISTINA

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UBA.

El ácido valproico (AV) es una droga antiepiléptica de uso frecuente y capaz de producir diferentes desórdenes endócrinos,

entre los que se incluye una alteración en el patrón de secreción de esteroides gonadales. Parte de los efectos adversos producidos por el AV se atribuyen a su capacidad de inhibir a las histona-deacetilasas, lo cual aumenta el grado de acetilación de las histonas y consecuentemente, la transcripción génica. Previamente demostramos que en células adrenocorticales de la línea Y1 el AV estimula la producción de progesterona (P4), efecto neto que resultaría de una acción estimulatoria a nivel de la conversión de colesterol a pregnenolona (P5) y de otra inhibitoria sobre la conversión de P5 a P4. El objetivo de este trabajo fue analizar en células Y1 el efecto del AV sobre dos proteínas claves para la formación de P5 a partir de colesterol (StAR y la enzima P450 scc) y sobre la enzima que cataliza la conversión de P5 a P4 (3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3 β -HSD). Comprobamos que el AV (3 mM) aumenta rápidamente la acetilación de histona H3 detectada por Western blot sin aumentar la expresión del gen correspondiente a P450 scc, ya que el análisis por Northern blot no revela cambios en los niveles del ARNm aún luego de 6 hs de tratamiento. Similar resultado se obtuvo al analizar la expresión de StAR. Con respecto a la enzima 3 β -HSD se demostró una inhibición de su actividad en lisados celulares expuestos a AV (Control: $1,11 \pm 0,08$; AV 3mM: $0,68 \pm 0,06$ nmoles de NADH/min/mg de proteínas; $P < 0.01$). Los presentes resultados sugieren que el efecto estimulatorio del AV sobre la conversión de colesterol a P5 no se deben a un estímulo sobre la expresión de genes cuyos productos son necesarios en esta conversión. Concluimos además que el AV inhibe la actividad de la enzima 3 β -HSD aunque esto no se refleje en una disminución de la velocidad de transformación de colesterol a P4.

31. (12803) LA ADMINISTRACIÓN DE KETOCONAZOL ICV INHIBE LA LIBERACION DE LH EN RATA HEMBRA. FARRÉ, EUGENIA; CELEDÓN, VERÓNICA; CABRERA, RICARDO

LINCE-IMBECU-CONICET. FCM. Universidad Nacional de Cuyo.

En estudios previos demostramos que allopregnanolona, un neuroesteroide de síntesis glial interfiere con los mecanismos excitatorios / inhibitorios asociados a la regulación de la secreción de LH a nivel hipotalámico en la rata hembra. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de los neuroesteroides endógenos sobre la liberación de LH. Para este fin utilizamos Ketoconazol (Keto) el cual es un inhibidor selectivo de la P450scc. Se utilizaron ratas hembras ovariectomizadas impregnadas con estrógeno (25ug/rata sc) y progesterona (1mg/rata) ($n=5-9$) (OVX E+P). El Keto fue administrado (icv) mediante una cánula de acero inoxidable. El día del experimento se implantó un cateter en la vena yugular para la extracción de sangre. El keto (1ul) fue administrado en distintas concentraciones 0.15ug/ul, 0.3 ug/ul y 0.45ug/ul. Posteriormente (1:30 horas) se obtuvieron muestras de sangre cada hora desde las 17 hs a las 21 hs inclusive. Los resultados se expresan como la media + SEM en ng/ml de LH liberada y analizados estadísticamente por ANOVA 1 y post Hoc Test. Observamos que las distintas dosis de Keto administradas indujeron una disminución en forma dosis dependiente sobre la liberación de LH siendo representativos los valores para Keto 0.15ug a las 18,20 y 21hrs. 18hs (3.69 ± 0.21 vs 1.96 ± 0.36 $p < 0.001$), 20hs (5.09 ± 1.28 vs 12.55 ± 2.56 $p < 0.05$), 21hs (3.84 ± 0.99 vs 31.74 ± 4.41 $p < 0.0001$). Para keto 0.3 ug/gl a las 17, 18 y 21 hs; 17 (2.6 ± 0.34 vs 1.51 ± 0.27 $p < 0.05$), 18 (3.18 ± 0.23 vs 1.96 ± 0.36 $p < 0.05$), 21 (9.04 ± 1.76 vs 31.74 ± 4.41 $p < 0.0001$), respectivamente). Keto 0.45 ug/ul fue representativo a las 17, 20 y 21 hrs, 17 (2.43 ± 0.1 vs 1.51 ± 0.27 $p < 0.05$), 20 (2.23 ± 0.19 vs 12.55 ± 2.56 $p < 0.05$), 21 (4.21 ± 1.46 vs 31.74 ± 4.41 $p < 0.001$). Concluimos que la inhibición selectiva de la neurosteroidogénesis altera la descarga de LH inducida por estrógeno y progesterona, sugiriendo fuertemente que la descarga de LH estaría regulada tanto por el feed-back estrogénico periférico como por la esteroidogénesis central en forma interdependiente.

GENÉTICA A

32. (11964) DESARROLLO DE UN MODELO TEÓRICO DE EVOLUCIÓN MOLECULAR: ETAPA 1, GENERACIÓN Y SELECCIÓN DE GENOMAS ARTIFICIALES MARTINEZ, ERIKA; ARGIBAY, PABLO.

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental

La evolución molecular explica los efectos de mecanismos moleculares sobre la evolución de genomas, genes y sus productos. Modelizar estos mecanismos puede tener interés diverso desde biología básica hasta la comprensión de mecanismos de variabilidad de interés médico como la resistencia a antibióticos o la variabilidad antigénica. Objetivo: Desarrollar un modelo teórico de evolución molecular que intente explicar como se crearon y desarrollaron los organismos, partiendo de genomas generados al azar, simulando procesos evolutivos moleculares en diferentes estadios de la evolución. Materiales y Métodos: En lenguaje Pascal orientado a objetos sobre Delphi, se crearon genomas al azar, usando los cuatro tipos de caracteres equivalentes a las bases nitrogenadas. La selección de potenciales genes se realizó con un algoritmo de búsqueda de codones de inicio y de fin. Se define una longitud mínima para la consideración del estado de "gen". Se eliminaron aquellos genes que finalizan en la misma posición y cuyos inicios son diferentes. Se mantuvo el gen de mayor longitud. El algoritmo se validó para seis organismos procariontes. Resultados: Se encuentra un alto porcentaje de genes anotados en el GenBank (sensibilidad promedio: 86,3%), aunque se encuentra una gran cantidad de genes adicionales (especificidad promedio: 22,8%). Se generó un genoma al azar de 580074 pares de bases y se encontraron 488 genes con longitudes mínima y máxima de 269 y 716 pares de bases. Del total de genes, 40 no exhiben analogía con genes reales. Del resto, el grado parecido promedio es del 36,74%, con un máximo y mínimo de 77% y 23%. La definición de gen utilizada en el algoritmo de búsqueda y en la generación de genomas teóricos, ha sido eficiente en términos de sensibilidad. Sin embargo la escasa especificidad del modelo no es adecuada para desarrollar algoritmos de selección. Es probable que en nuestro modelo teórico debamos tener en cuenta mecanismos de transferencia horizontal y una tasa alta de mutaciones generadas en forma randomizada.

33. (12134) POLIMORFISMOS DE LA LIPOPROTEINLIPASA (LPL) E HIPERTRIGLICERIDEMIA EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS (DM) TIPO 2. SOLAND, MELISA (1); BOUVET, BEATRIZ (2); ARRIAGA, SANDRA (2); ALMARÁ, ADRIANA (1,2,3).

IBR. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (1) IBR. (2) Departamento de Bioquímica Clínica. (3) CIUNR. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

La DM tipo 2 es causa frecuente de dislipidemia que se caracteriza por hipertrigliceridemia. Polimorfismos en el gen de la LPL, la enzima principal en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG), podrían contribuir al aumento de los mismos. En este trabajo se evaluó el posible efecto de los polimorfismos Hind III (alelos H+ y H-) y Hinf I (alelos S y X). Se estudiaron sujetos con DM tipo 2 (n=46) los cuales se clasificaron como normotriglicéridémicos (NTG; n=18; TG<150 mg/dL) o hipertriglicéridémicos (HTG; n=28; TG>150 mg/dL). Las concentraciones plasmáticas (mg/dL) de glicemia, colesterol (C) total, C-HDL, C-LDL y TG se determinaron por métodos enzimáticos, y la hemoglobina glicosilada (HbA1c) por cromatografía de intercambio iónico. Los genotipos Hind III y Hinf I se identificaron en ADN genómico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior análisis de los tamaños de los fragmentos de ADN, obtenidos por digestión enzimática de los productos de PCR. La frecuencia del genotipo H+/+ tendió a aumentar en el grupo HTG: HTG= 75% vs NTG= 50%, p= 0,058. Además, los sujetos H+/+ (n=30) presentaron mayores valores de TG (promedio ± DE) que los portadores del alelo H- (n=16): [H+/+]= 219,6 ± 126,7 vs [H+/-, H-

/-]= 164,6 ± 83,9, p<0,05, observándose valores similares de C-HDL, de C-LDL y de HbA1c entre ambos grupos. La frecuencia del genotipo S/X fue mayor en NTG que en HTG aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa: NTG= 16,7% vs HTG= 7,1%, p= 0,22. Los TG de los sujetos con el haplotipo H+/S tendieron a aumentar con respecto a los valores de los portadores del haplotipo H-/X: H+/S= 219,6 ± 126,7 (n=30) vs H-/X= 153,8 ± 94,5 (n=5), p= 0,09. Los resultados sugieren asociación entre hipertrigliceridemia y genotipo H+/+ del polimorfismo Hind III de la LPL en la muestra de sujetos diabéticos analizada. Con respecto al polimorfismo Hinf I sería necesario estudiar un mayor número de pacientes para obtener conclusiones definitivas.

34. (12178) ROL POTENCIAL DEL BTF (BCL2-ASSOCIATED TRANSCRIPTION FACTOR) COMO MEDIADOR EN EL EFECTO PROAPOPTOTICO INDUCIDO POR AMIFOSTINA MAS IMATINIB EN LA LÍNEA CELULAR K562. BIANCHINI, MICHELE (1); MARTINELLI, GIOVANNI (2); RENZULLI, MATTEO (2); GONZALEZ CID, MARCELA (1); LARRIPA, IRENE (1).

Departamento de Genética, IHema, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires (1) Depto. de Genética, IHema, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina (2) Institute of Haematology and Medical Oncology "L. e A. Seragnoli", University of Bologna, Italy.

La etiopatogenia de la leucemia mieloide crónica (LMC) radica en la presencia del gen quimérico BCR/ABL. En nuestro laboratorio habíamos demostrado un efecto proapoptótico aditivo del Imatinib (inhibidor de tirosina quinasa) cuando es usado en combinación con Amifostina (agente antioxidante) en la línea celular K562 (derivada de LMC con amplificación del Bcr/Abl). Sin embargo, los cambios moleculares subyacentes a la inducción de apoptosis quedaban desconocidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión génica de la K562 expuesta al cotratamiento mencionado. El RNA extraído de las células tratadas y sin tratar fue copiado a cRNA y marcado con moléculas fluorescentes para luego ser cohibridados sobre un soporte de vidrio conteniendo una micromatriz de 19.200 sondas de cDNA. Se detectaron 70 secuencias correspondientes a genes conocidos; entre los sobreexpresados identificamos RHO6, PPP2R5E y BTF y entre los subexpresados encontramos API5, TUBB2 y TLK1. Además validamos la expresión diferencial de algunos de ellos mediante Real-Time PCR y Western blot. Entre los genes sobreexpresados, BTF (represor transcripcional de genes de sobrevivencia), representaría un mediador clave para la señal proapoptótica inducida por el cotratamiento. La posibilidad de realizar un amplio análisis de los genes de interés en oncohematología, a través del estudio de los perfiles de expresión en líneas celulares cotratadas in vitro con nuevas combinatorias de drogas (Imatinib+Amifostina), permitiría reconocer los cambios moleculares específicos, útiles para definir nuevas estrategias terapéuticas. Nuestros resultados sugerirían que la sobreexpresión del gen Btf, identificado a través de la metodología microarray y validado por real time PCR y western blot, podría representar un factor de transcripción útil para potenciar el efecto proapoptótico del Imatinib en pacientes con amplificación del Bcr/Abl.

35. (12334) ANÁLISIS DE VARIANTES GENÓMICAS EN EL GEN DEL RECEPTOR DE TSH EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO POR DISEMBRIOGÉNESIS TIROIDEA. ESPERANTE, SEBASTIÁN A. (1); CAPUTO, MARIELA (1); MIRAVALLE, LUCRECIA (2); IORCANSKY, SONIA (2); TARGOVNIK, HECTOR M (1); RIVOLTA, CARINA M (1).

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica. -UBA- Laboratorio de Pesquisa de Enfermedades Congénitas, Hospital Garrahan.

El hipotiroidismo congénito tiene una incidencia de 1 en 4000 nacidos vivos. En el 85% de los pacientes con este cuadro clínico

co heterogéneo se observa dismorfogénesis con ausencia de bocio y en el 15 % restante, dishormonogénesis con bocio. La dismorfogénesis está asociada tanto a mutaciones en los genes responsables del desarrollo: PAX8, TTF1 y TTF2 como en genes vinculados al crecimiento de las células tiroideas: receptor de TSH (rTSH). En el presente trabajo se realizó la búsqueda de mutaciones en el gen del rTSH en 60 pacientes no relacionados con hipotiroidismo congénito y sin bocio. A partir de ADN genómico purificado de sangre periférica se realizó un rastreo inicial por PCR-SSCP de los exones 1 al 9, y una porción de 900 pb del exón 10 correspondiente al dominio transmembrana del receptor. Los productos con movilidad alterada fueron secuenciados. En un paciente se identificó una nueva mutación H323Y y en otro la mutación ya descrita D36H. Ambos presentan una clínica compatible con atireosis. Por otro lado, se analizó una secuencia repetitiva CT a -14 pb del comienzo del exón 8, que presenta alelos de 6, 8 y 9 repeticiones. La variante de 9 repeticiones se halló en 3 de 120 alelos provenientes de los pacientes y no fue identificada en 200 alelos de la población normal, por lo que se estudió la posible implicancia de este alelo en el procesamiento (splicing) correcto del exón 8. Cada una de las variantes alélicas fueron amplificadas por PCR, clonadas en el vector pSPL3 y empleadas para transfectar células CV-1. El ARNm obtenido fue analizado mediante RT-PCR para determinar la influencia del repetitivo sobre el splicing. Las 3 secuencias repetitivas estudiadas en cada uno de los experimentos no mostraron ninguna diferencia en el procesamiento del exón. Próximos estudios de expresión permitirán evaluar el efecto de la mutación H323Y sobre la funcionalidad del receptor.

36. (12364) PRESENCIA DEL ALELO 2 DEL VNTR LOCALIZADO EN EL GEN ANTAGONISTA DE IL1R EN POBLACIONES NATIVAS SUDAMERICANAS. CATANESI, CECILIA INES; DI ROCCO, FLORENCIA

IMBICE

En poblaciones de origen caucasoide, se ha demostrado la asociación de un polimorfismo VNTR localizado en el intrón 2 del antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL1R) con procesos inflamatorios crónicos y dolor. Se ha visto que los individuos que portan el alelo 2 en homocigosis tienen posibilidades significativamente mayores de presentar estos procesos. Con el objeto de estudiar la variabilidad de este VNTR en poblaciones nativas americanas, tipificamos mediante PCR y electroforesis en agarosa 1,5%, 144 individuos pertenecientes a 5 grupos étnicos nativos sudamericanos: Mocoví (n=37), Chorote (n=13), Mataco-Wichí (n=36), Lengua (n=29) y Ayoreo (n=29). En este estudio hallamos sólo dos de los cinco alelos descritos para este VNTR: alelo 1 (78%) y alelo 2 (22%). La distribución genotípica se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg, y no se hallaron diferencias significativas entre las poblaciones muestreadas ($p > 0,05$). La heterocigosidad media hallada fue de 17%, y la proporción de individuos homocigotas para el alelo proinflamatorio fue del 13%. Dado que aún no se conocen los mecanismos responsables de la relación entre la respuesta inflamatoria y el alelo 2, en el futuro resta investigar si dicha asociación persiste en las poblaciones nativas sudamericanas.

37. (12498) IMPACTO DEL POLIMORFISMO ALA54THR SOBRE RIESGO CARDIOVASCULAR Y COLESTEROL ALTO. GOMEZ, LAURA (1); REAL, SEBASTIÁN (1); GIMENEZ, SERGIO(2); MAYORGA, LUIS (1); ROQUÉ, MARÍA(1)

Lab de Biología Celular y Molecular, IHEM, Fac de Cs Médicas, UNCuyo. OSEP-Mendoza.

El gen FABP2 codifica para una proteína involucrada en la absorción y el transporte de ácidos grasos. Se postula que un polimorfismo en el codón 54 de esta proteína (Ala54Thr) está asociado con niveles de colesterol, glucemia y presión arterial elevada y riesgo cardiovascular entre otros. Nuestro objetivo fue

examinar la frecuencia alélica de Thr54 en nuestra región (Mendoza, Argentina), y posteriormente analizar posibles asociaciones de este polimorfismo con riesgo cardiovascular y/o alteración de distintos marcadores metabólicos. Para la detección del polimorfismo, se puso a punto una estrategia basada en PCR y RFLP en 143 muestras de ADN obtenidas a partir de una gota de sangre entera periférica. De 141 muestras, se obtuvieron datos fenotípicos, para el análisis de asociación genotipo-fenotipo. La frecuencia observada en nuestra población para el alelo Thr 54 fue $q=0,2972$ (0,24483-0,3538; $p < 0,05$) y para el alelo Ala54 $p=0,7027$ (0,64617-0,755165; $p < 0,05$), no difiriendo significativamente de lo esperado por el equilibrio Hardy Weinberg ($p < 0,05$). No se encontró asociación significativa ($p < 0,05$) entre el polimorfismo y el índice de masa corporal (BMI), glucemia alta, colesterol total alto, presión arterial alta y el índice de riesgo cardiovascular (Framingham). Sin embargo, se observó una tendencia de asociación entre el polimorfismo con niveles de colesterol total alto OR 2,08 y riesgo cardiovascular alto OR 2,06 para un $p < 0,2$. Nuestros resultados para un N=141 no muestran una asociación significativa entre el polimorfismo y los datos fenotípicos analizados. Sin embargo, debido a la notable tendencia de asociación observada entre los portadores del polimorfismo y niveles altos de colesterol y riesgo cardiovascular, se aumentará el número de individuos analizados. De encontrarse una asociación con niveles de significancia superiores, estos resultados contribuirían a la prevención de enfermedades cardiovasculares.

38. (12508) CUANTIFICACIÓN RELATIVA Y SIMULTÁNEA DE 40 SECUENCIAS DE ADN POR "MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION" (MLPA). GOMEZ, LAURA(1); REAL, SEBASTIÁN(1); MARZESE, DIEGO(1); MAYORGA, LUIS(1); MAMPEL, ALEJANDRA(2); ECHEVERRIA, MARÍA I.(2); VARGAS, ANA LIA(2); ROQUÉ, MARÍA(1)

Laboratorio de Biología Celular y Molecular-IHEM Fac. Cs Médicas, UNCuyo, Mendoza. Instituto de Genética, Fac. Cs Médicas, UNCuyo.

Los cambios en el número de copias de secuencias de ADN suelen estar implicados en la predisposición a enfermedades humanas. Los métodos convencionales basados en PCR y secuenciación de exones individuales no son aplicables para detectar deleciones en un solo alelo, por no ser métodos cuantitativos y quedar enmascarada la mutación por el alelo sano. El método MLPA es una nueva estrategia de cuantificación relativa que permite detectar deleciones o duplicaciones en 40 secuencias de ADN simultáneamente y ha demostrado ser confiable para el diagnóstico de enfermedades genéticas caracterizadas por largas deleciones. El objetivo de nuestro grupo fue poner en funcionamiento la nueva metodología y aplicarla a la detección de portadoras de deleciones en el gen DMD. Este tipo de mutación (65%) es detectado por multiplex PCR en varones afectados, técnica que no es sensible para detectar madres portadoras. Brevemente se partió de 20 ng de ADN, que fueron hibridados con 40 pares adyacentes de sondas distintas, posteriormente ligadas, y amplificadas en conjunto por PCR. Finalmente, los productos fueron analizados por electroforesis capilar en un ABI3100. La metodología se puso a punto con sondas específicas para el cromosoma X e Y, y para cada uno de los exones del gen DMD. Al analizar cuantitativamente los 79 exones del gen DMD, se detectó en una portadora una deleción del exón 47 al 50. En análisis anteriores por PCR multiplex, sólo se había podido detectar en el hijo afectado una deleción del exón 48. La metodología MLPA es de enorme utilidad para detectar portadoras de deleciones en el gen DMD. A su vez es aplicable a varias patologías de origen tumoral, donde las deleciones de uno o más exones cubren más de la mitad de las mutaciones totales.

39. (12587) ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE TIOPURINA-S-METIL TRANSFERASA (TPMT) CON LA TOXICIDAD A 6-MERCAPTOPYRINA (6-MP) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA

AGUDA (LLA). ARÁOZ, HILDA VERÓNICA(1); D'ALOÍ, KARINA(2); CABALLERO, EMILCE(2); ALFARO, ELIZABETH(2); BARREIRO, CRISTINA(1); FELICE, MARÍA S(2); CHERTKOFF, LILIE(1).

(1) *Laboratorio de Biología Molecular-Servicio de Genética Hospital de Pediatría "Prof Dr J P Garrahan"* (2) *Servicio de Hemato-Oncología. Hospital de Pediatría "Prof Dr J P Garrahan"*.

La TPMT es una enzima esencial en la metilación de 6-MP, droga utilizada en el tratamiento de LLA. Diferencias en su actividad debido a variantes genéticas pueden alterar la respuesta de los pacientes a este antineoplásico. **OBJETIVOS:** 1) Establecer la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del gen de TPMT en niños con LLA. 2) Evaluar si existe asociación entre los polimorfismos de TPMT y la toxicidad a 6-MP. **PACIENTES Y METODOS:** Se determinaron variantes alélicas de TPMT en 148 niños con diagnóstico de LLA: TPMT*3A, TPMT*3C, TPMT*3B y TPMT*2. Las tres primeras se evaluaron mediante PCR-RFLP y TPMT*2, por PCR alelo específica. Se evaluó toxicidad hematológica, renal, hepática, gastrointestinal, de mucosa, infecciosa, cardíaca y neurológica en 365 ciclos de 7 a 14 días en los 94 niños que completaron el tratamiento con 6-MP + metotrexato a altas dosis. La toxicidad se definió en 5 grados según OMS. La asociación se analizó con tablas de contingencia y test de Fisher. **RESULTADOS:** La frecuencia genotípica en niños con LLA fue: 87.2% WT/WT, 12.8% WT/V y 0% V/V. Las frecuencias alélicas fueron: 3.71% TPMT*3A, 0.33% TPMT*3B, 1.35% TPMT*3C y 1.01% TPMT*2. Se ha observado asociación entre la presencia de alguna variante polimórfica en estado heterocigoto y toxicidad a nivel del recuento de leucocitos ($p=0.037$). Esta asociación se hizo más significativa cuando se analizaron los casos de toxicidad grado 0-1-2 vs 3-4 ($p=0.008$). La distribución de frecuencias genotípicas no presenta diferencias significativas respecto a la de población general de Argentina. En este grupo de pacientes las variantes genéticas de TPMT están asociadas a una marcada disminución en el recuento de leucocitos, sin aumentos de infecciones o fiebre. Estos resultados son similares a los encontrados en otros grupos de pacientes con LLA.

40. (12600) RASTREO DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA TIROGLOBULINA HUMANA: ALTA INCIDENCIA DE LA MUTACIÓN P.R277X EN PACIENTES CON BOCIO CONGÉNITO E HIPOTIROIDISMO. CAPUTO, MARIELA (1); GUTNISKY, VIVIANA J (1); ESPERANTE, SEBASTIAN A (1); VARELA, VIVIANA (1); GRUÑEIRO-PAPENDIECK, LAURA (2); CHIESA, ANA (2); RIVOLTA, CARINA M (1); TARGOVNIK, HÉCTOR M (1)

Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA 2 Centro de Investigaciones endocrinológicas CEDIE-CONICET. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

La prevalencia del hipotiroidismo neonatal es de 1/4.000 recién nacidos. Dentro de esta patología varias entidades poseen características propias; el hipotiroidismo congénito sin bocio (disembriogénesis) debido a agenesias, ectopías o hipoplasias, corresponde al 85 % de los casos. Un segundo grupo es constituido por los hipotiroidismos congénitos con bocio (dishormonogénesis) debido a alteraciones en alguno de los genes cuyas proteínas intervienen en la biosíntesis de hormonas tiroideas: tiroglobulina (TG), TPO, DUOX2, NIS y PDS. El gen de la TG está ubicado en el brazo largo del cromosoma 8, posee 270 kilobases de longitud, 48 exones y codifica para un ARN mensajero de 8,5 kilobases. Los objetivos del presente trabajo fueron desarrollar nuevas herramientas diagnósticas para bocios congénitos con defecto en la biosíntesis de TG e identificar nuevas mutaciones en dicho gen. Se diseñaron primers intrónicos para amplificar por PCR los diferentes exones. Los productos fueron purificados y

secuenciados por la técnica de Sanger. Se analizó el ADN genómico de 6 pacientes no relacionados con diagnóstico de bocio congénito con defecto en la biosíntesis de la TG. Se identificó una inserción heterocigota no descrita previamente, en el exón 7 (c.759_760insA) que produce un cambio en el marco de lectura en la posición aminoacídica 234 con la aparición de un codón de terminación prematuro en el mismo exón (p.L234fsX236). Además, se halló la mutación R277X en un individuo en forma homocigota, en tres pacientes de manera heterocigota y formando parte de un compuesto heterocigota junto con la mutación R1511X. Nuestros resultados y los publicados previamente demuestran la alta prevalencia de la mutación R277X en la población afectada. El desarrollo de esta metodología permitirá optimizar el diagnóstico de esta patología hereditaria recesiva.

41. (12738) RELACIÓN DOSIS EFECTO DEL PLOMO SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y GENOTOXICIDAD SISTÉMICOS. NAVONI, JULIO; PIÑEIRO, ADRIANA; QUIROGA, PATRICIA; SASSONE, ADRIANA; GONZÁLEZ CID, MARCELA (1); LARRIPA, IRENE (1); LLESUY, SUSANA (2); FERREIRA, SANDRA (2); ROSES, OTMARO; LÓPEZ, CLARA .

Cátedra de Toxicología y Química Legal-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (1) Dto. de Genética-Instituto de Investigaciones Hematológicas "M. Castex"-Academia Nacional de Medicina. (2) Cátedra de Química General e Inorgánica-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA.

El plomo (Pb) es un tóxico ambiental que provoca un amplio rango de disfunciones fisiológicas, bioquímicas y comportamentales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del metal a dos niveles de dosis sobre parámetros de estrés oxidativo (EO) y genotoxicidad sistémicos. Se emplearon 24 ratas Wistar adultas machos de 320 ± 20 g a las que se las distribuyó en tres grupos experimentales de 8 animales cada uno: los grupos tratados (T1 y T2) recibieron en el agua de bebida 500 y 1000 ppm de plomo, respectivamente durante 2 meses; el grupo control recibió agua destilada. Las condiciones de bebida y alimento fueron "ad libitum". Se evaluó la plumbemia (PbS), el estado redox: quimioluminiscencia espontánea inducida por terbutilo (QL), actividad de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) y el efecto genotóxico (electroforesis de células únicas en medio alcalino). En los grupos tratados la PbS ($\mu\text{g/dl}$) fue significativamente superior ($p<0,0001$) en los grupos T1 ($40,6 \pm 6,3$ $\mu\text{g/dl}$) y T2 ($78,7 \pm 5,2$) respecto de C ($3,8 \pm 0,8$). El grupo T2 mostró un incremento significativo ($p<0,02$) en la actividad de SOD ($0,90 \pm 0,18$ USOD/mg prot) respecto de C ($0,76 \pm 0,04$), parámetro no afectado en el grupo T1. Tanto T1 como T2 mostraron un incremento significativo ($p<0,01$) en la actividad de la CAT (pmoles/mg prot): T1= $2,47 \pm 0,9$; T2= $3,21 \pm 0,92$; C= $1,80 \pm 0,3$. No se observaron modificaciones en la QL. El efecto genotóxico, expresado como porcentaje de daño elevado (DE) fue: T1= $43,1 \pm 3,6$; T2= $50,3 \pm 4,3$; C= $7,2 \pm 1,2$ ($p<0,001$). El aumento en la actividad enzimática indica que el Pb genera especies reactivas del oxígeno que estarían relacionadas con el nivel de PbS alcanzado. Este incremento estaría vinculado con el daño al DNA observado. Estos resultados sugieren la necesidad de profundizar estudios de este tipo a niveles de exposición de Pb permitidos en el ambiente laboral.

42. (12807) REPARACIÓN DE RUPTURAS DE DOBLE CADENA SOBRE EL ADN INDUCIDAS POR VENENOS DE TOPOISOMERASA II EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS. DE CAMPOS NEBEL, MARCELO; LARRIPA, IRENE; GONZÁLEZ CID, MARCELA

Depto. de Genética. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires, Argentina.

Las rupturas de doble cadena (RDC) sobre el ADN se reparan en células de mamíferos mediante dos vías: unión de extre-

mos no-homólogos (NHEJ) y recombinación homóloga (HR). El presente trabajo evaluó la vía de reparación empleada por los venenos de Topoisomerasa IIa (Topolla) idarubicina (IDA 1µg/ml) y etopósido (ETO 10µg/ml) en células de mamíferos. La cinética de reparación de RDC evaluada por la formación de focos nucleares de gH2AX+, mostró valores máximos de daño a las 6hs para IDA (70,6±4,2%) y a las 2hs para ETO (62,25±7,4%) en fibroblastos humanos. La inhibición química de NHEJ por el pretratamiento con wortmanina y vanillina en células humanas y el análisis de supervivencia en células de hamster chino, deficientes en genes que intervienen en esta vía, mostraron una hipersensibilidad a ETO. La formación de focos nucleares de Rad51 en fibroblastos humanos evidenció la participación de HR en la reparación del daño inducido por IDA (40,8±5,8% a las 6h) y ETO (28,75±4,6% a las 2h). Esto se confirmó por un aumento en los niveles de expresión de Rad51 a los tiempos mencionados. Los niveles de RDC inducidas por ambos venenos de Topolla disminuyeron considerablemente cuando la expresión de la proteína fue inhibida mediante oligonucleótidos morfolidos antisentido. Nuestros resultados indican que las RDC sobre el ADN generadas por IDA y ETO ocurren en forma dependiente de Topolla y que ambos venenos inducen la actividad de la vía HR en células de mamíferos. Sin embargo, ETO promueve diferencialmente una respuesta mediada por NHEJ ante dichas lesiones.

GENÉTICA B

43. (11874) ANALISIS EPIGENÉTICOS DE GENES UBICADOS EN 9P21 EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC) Y MIELOMA MÚLTIPLE (MM). CHENA, CHRISTIAN; STANGANELLI, CARMEN; DE BRASI, CARLOS; SLAVUTSKY, IRMA

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" - Academia Nacional de Medicina

El patrón de metilación de las islas CpG localizadas en regiones promotoras constituye un importante mecanismo de regulación de la expresión génica. La región 9p21, donde se ubican los genes reguladores del ciclo celular p14(ARF), p15(INK4b) y p16(INK4a), constituye un sitio de frecuentes rearrreglos en diferentes neoplasias. En este trabajo se presenta el análisis del status de metilación de los promotores de dichos genes mediante la técnica de MSP (Methylation-Specific PCR). Se estudiaron 27 pacientes con LLC (edad media: 65 años, 11 mujeres, 78% estadios 0-II) y 12 con MM (edad media 63,5 años; 4 varones, 75% estadio III). Este ensayo se basa en la capacidad del bisulfato de convertir las citosinas en uracilo, pero sin modificar las 5-metilcitosinas. La secuencia blanco es amplificada por PCR utilizando primers específicos para secuencias metiladas y no metiladas en ADN tratado. Los datos obtenidos fueron correlacionados con el análisis citogenético y de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) con sondas: centromérica del cromosoma 12 y locus específicas de ATM (11q23), TP53 (17p13) y 13q14 (Vysis). En LLC se observaron 3 pacientes (11%) con metilación a nivel de 9p21, de los cuales 2 (7%) correspondieron a p15(INK4b) y 1 (4%) a p16(INK4a). Los dos casos con metilación de p15(INK4b) presentaron trisomía 12 por FISH y alteraciones cromosómicas clonales: inv(3)(q22q28) en uno de los pacientes, y del(6)(q25) con pérdida del cromosoma Y en el otro. En MM de detectó un 1 caso (8%) con metilación de p15(INK4b), sin alteraciones genómicas. En ninguna de las patologías se encontró metilación en p14(ARF). Estos estudios sugieren que la metilación de novo, aunque presente en baja frecuencia, sería un mecanismo alternativo de silenciamiento de estos genes supresores de tumor en LLC y MM.

44. (11907) CANCER DE MAMA: ESTUDIO MOLECULAR DEL GANGLIO CENTINELA. DENNINGHOFF, VALERIA;

ALLENDE, DANIELA; AVAGNINA, ALEJANDRA; CRIMI, GABRIEL; ABALO, EDUARDO; ELSNER, BORIS

Servicio de Patología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC). Servicio de Ginecología y Obstetricia, CEMIC.

El pronóstico de los individuos con cáncer de mama está dado por la resección primaria del tumor con márgenes óptimos y por la evaluación de los ganglios axilares. Varios estudios han validado la búsqueda del ganglio centinela (GC) de mama como evaluación confiable del status axilar. El motivo del presente estudio es evaluar, mediante técnicas de biología molecular, la presencia del ARNm de Mamaglobina (MAG) A y B por RT-PCR en GC de mama e identificar un subgrupo de individuos con mayor riesgo de tener metástasis en ganglios axilares. Desde Junio de 2004 hasta Mayo de 2005 se recolectaron 38 GC de individuos con diagnóstico de cáncer mamario. Cada ganglio se evaluó cada 2 mm por citología intraoperatoria. Se realizaron técnicas de hematoxilina-eosina (HE), inmunomarcación (IHQ) con CKAE1-AE3 (clon AE1 y AE3, DAKO, dilución 1:100) y moleculares. Se secuenciaron los diferentes fragmentos de DNA amplificados por la técnica RT-PCR. Se detectaron células neoplásicas con citología en 3/38 casos, que coincidieron con los casos detectados mediante HE. La Inmunohistoquímica detectó 5/38 que incluían los 3 casos antes mencionados. Mediante la RT-PCR desarrollada se identificó la presencia del ARNm e la MAG A y/o B en 12/38 (32%) casos: MAG A en 4, MAG B en 3 y ambas en 5, siendo 7/38 (18%) de los tumores positivos sólo con biología molecular. En todas las muestras se obtuvo material amplificable. Todos los controles y secuencias dieron los resultados esperados. La detección de MAG A y/o B mediante técnicas de biología molecular aumentó la sensibilidad de detección de micrometástasis de células neoplásicas en los ganglios centinela de individuos con carcinoma mamario, con respecto a las técnicas utilizadas habitualmente para su estudio (HE e IHQ). El hallazgo de estas micrometástasis podría modificar la estadificación y el tratamiento de estos individuos.

45. (12140) ESTUDIO GENÉTICO DE 136 PACIENTES HIPOACÚSICOS DE LA REPÚBLICA ARGENTINA. ANÁLISIS DE LOS GENES GJB2 (CONEXINA 26), GJB6 (CONEXINA 30), OTOF (OTOFERLINA) Y 12SRNA (MITOCONDRIAL). DALAMON, VIVIANA; ELGOYHEN, ANA BELÉN

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, INGEBI. UBA-Conicet.

Más del 10% de todos los adultos sufren algún tipo de hipoacusia. La forma hereditaria no sindrómica afecta a 1:2500 nacidos vivos y el 80% se debe a la forma autosómica recesiva. De éstos, más del 50% presenta alteraciones en los genes GJB2 y GJB6 (13q11-q12) los cuales codifican para las conexinas 26 y 30 respectivamente. En el gen GJB2 la mutación 35delG sería predominante en europeos mediterráneos y la 167delT en judíos Askenazis. En el gen GJB6 una delección de 342Kb sería la segunda mutación más frecuente en pacientes españoles y la mutación Q829X en el gen OTOF (2p23.1) la tercera. Las mutaciones en el ADN mitocondrial sensibilizarían a la ototoxicidad por aminoglucósidos. El objetivo del presente trabajo fue establecer cuáles y con qué prevalencia se presentan mutaciones en los genes GJB2, GJB6, OTOF y 12SrRNA en pacientes hipoacúsicos de la República Argentina. Se analizó el ADN de leucocitos de sangre periférica de 136 pacientes y sus familiares directos (198 muestras procesadas) mediante: PCR alelo específica, PCR-RFLP, SSCP, PCR-duplex y secuenciación. 42 de los 136 pacientes analizados (31%) presentaron variaciones de secuencia en el gen GJB2 y 3 (2%) en GJB6. 16 de éstos (38%) resultaron positivos para la mutación 35delG. Se identificaron en 29 pacientes otras 14 mutaciones en el gen GJB2: T8M, V27I, M34T, V37I, E47X, R75W, W77R, I82M, F83L, L90P, E129K, R143W, 153I y M163V. En 13 pacientes se identificaron mutaciones en ambos alelos. No se detectaron otras mutaciones en la región codificante

del gen GJB6. Ninguno de los 136 pacientes analizados presentó la mutación 167delT en el gen GJB2, ni mutaciones en los genes OTOF ni 12SrRNA. Los datos presentados en este estudio permitirían inferir la prevalencia de mutaciones en pacientes hipoacúsicos neurosensoriales no sindrómicos de la República Argentina. Permitiendo un diagnóstico certero de la causa de la hipoacusia y el consejo genético en individuos afectados.

46. (12170) IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN UNA FAMILIA CON RETINOBLATOMA Y SU EFECTO SOBRE EL FENOTIPO. FERNÁNDEZ, CECILIA; REPETTO, KARINA; FERREIRO, VERÓNICA; SZIJAN, IRENE

Genética y Biología Molecular, Fac. Farm y Bioq. Hospital de Clínicas, UBA. Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas, UBA.

El retinoblastoma (RB) es un tumor maligno de la niñez que puede ser o no hereditario. Se origina por mutaciones en el gen RB1 ubicado en 13q14. La forma hereditaria se transmite con alta penetrancia (90%), por lo tanto la identificación de mutaciones es importante para un diagnóstico precoz y el asesoramiento genético de la familia. El objetivo de este trabajo es el estudio molecular de una familia con varios afectados de RB para identificar la mutación y detectar a los portadores de la misma. Se analizaron 15 individuos, tres de ellos afectados: dos hermanos con RB unilateral y un primo con RB bilateral. Se utilizó la segregación de alelos polimórficos ubicados a lo largo del gen RB1 (27 exones): dos polimorfismos de restricción, un STR y un VNTR, en los intrones 1, 17, 4 y 20 respectivamente. La segregación de polimorfismos y la conformación de haplotipos reveló homo o hemiciogidad en todos los loci analizados para los tres afectados. El análisis de los haplotipos demostró ausencia de alelos de uno de los progenitores, confirmándose la hemiciogidad. Esto sugiere una delección del gen RB1, la cual sería la causa del desarrollo tumoral. La madre de los hermanos con RB y el padre del primo afectado, ambos hermanos, también presentaron la misma alteración genética, a pesar de ser asintomáticos. La correlación de genotipo/fenotipo en esta familia demostró una muy baja expresividad de RB. Esto podría deberse a que la delección abarcaría todo el gen y tal vez otros genes vecinos disminuyendo la viabilidad celular. 1-El análisis de segregación de polimorfismos es útil no solo para el estudio indirecto, ligando una enfermedad a marcadores polimórficos, sino también para identificar grandes rearrreglos genómicos. 2-Una delección que abarca el gen RB1 entero podría tener un efecto negativo sobre la cantidad de tumores desarrollados disminuyendo la penetrancia de RB.

47. (12182) NEUROFIBROMATOSIS TIPO 2: DIAGNÓSTICO MOLECULAR. FERRER, MARCELA (1); FERREIRO, VERÓNICA (1); CIAVARELLI, PATRICIA (2); BASSO, ARMANDO (2); SZIJAN, IRENE (1).

(1) Cátedra de Genética y Biología Molecular-INUBA-Hospital de Clínicas-UBA (2) Dep. Neurocirugía-Hosp.de Clínicas.

La neurofibromatosis tipo 2 (NF2) es un desorden hereditario caracterizado por el desarrollo de tumores intracraneanos principalmente schwannomas y meningiomas. El gen nf2 (22q12) de 17 exones codifica para un supresor tumoral. La neurofibromatosis 2 es poco común, aunque los tumores son benignos su localización provoca serios problemas neurológicos. El diagnóstico se basa en criterios establecidos por NIH pero es importante un diagnóstico seguro y presintomático en familias con antecedentes. Nuestro objetivo es el estudio molecular de NF2 para excluir o tratar tempranamente a los miembros susceptibles de padecer la enfermedad de familias afectadas. Para ello realizamos el análisis de segregación de alelos polimórficos comparando el ADN de sangre periférica y de tumores de los afectados con el ADN de sangre periférica de los familiares. Se utilizaron 2 STR intragénicos (nf2CA3, nf2CAV) y uno telomérico ubicado a 3 Mb (D22S281). Se evaluó la pérdida de heterocigocidad (LOH) de los

marcadores analizados en 60 tumores observándose LOH sólo en uno de ellos. Los estudios realizados en 5 familias fueron informativos en 2 de ellas. En la primera, dos hermanos y 3 hijos de un afectado fueron excluidos de portar el alelo ligado a la enfermedad. En la segunda, de los 7 individuos analizados se excluyeron del riesgo a 2 personas y 5 resultaron con alto riesgo de padecer la enfermedad. En las restantes 3 familias los resultados no fueron informativos ya que no se pudo identificar el alelo ligado a la enfermedad debido a que había un solo afectado y no se observó pérdida de heterocigocidad en el tumor. Conclusiones: 1. El análisis de segregación de polimorfismos es una importante herramienta diagnóstica en las familias con varios afectados por NF2; 2. El estudio molecular en dos familias con NF2 permitió excluir a 7 individuos; 3. El diagnóstico certero de predisposición ó la exclusión de la enfermedad mejora la calidad de vida de las familias, un ejemplo son los resultados presentados

48. (12202) ANÁLISIS DE LA INVERSIÓN DEL INTRÓN 22 DEL GEN DEL FVIII EN ARGENTINA: GENOTIPIFICACIÓN POR PCR INVERSA. ROSSETTI, LILIANA CARMEN; RADIC, PAMELA; LARRIPA, IRENE; DE BRASI, CARLOS.

Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R Castex. Academia Nacional de Medicina.

La hemofilia A (HA) es una coagulopatía hereditaria, ligada al cromosoma X, causada por defectos en el gen del factor VIII (F8). La inversión del intrón 22 (Inv22) constituye la mutación más frecuente en HA severa (42%). El objetivo de este trabajo es presentar el nuevo abordaje de análisis de la Inv22 aplicado al estudio de familias argentinas con HA severa (HAS). La metodología de PCR-inversa (PCR-I) incluye: (1) la restricción con BclI de las muestras de DNA genómico, (2) la ligación en gran volumen (600ul) de los fragmentos BclI (autoligado) para obtener círculos-B y (3) el análisis de los círculos-B por PCR standard multiplex (primers IU, ID y ED). Los círculos-B correspondientes al fragmento del gen del FVIII intacto (21,5kb) rinden una señal de 487bp, mientras que los círculos quiméricos (20kb) asociados a la Inv22, 559bp. Fueron estudiados 2 grupos de muestras de familias con HAS: (a) 16 individuos previamente estudiados por Southern blot (8 probandos, 5 de ellos Inv22 positivos; y 8 mujeres, 3 de ellas portadoras de la Inv22) para validación del nuevo abordaje y (b) nuevos casos clínicos de 13 familias no estudiadas previamente. En el grupo (a) el análisis por PCR-I indicó una correlación perfecta con el método clásico. En el grupo (b) se diagnosticó la Inv22 como la mutación causal en 8 familias (6 probandos, y 2 portadoras) donde además pudieron detectarse 4 portadoras de la inversión en 7 familiares en riesgo (3 madres y 1 tía Inv22 [+/-], 1 hermana y 2 primas Inv22 [-]). Incluyendo los nuevos casos, la frecuencia actual de la Inv22 en HAS es 32/76 (42%) y el riesgo de desarrollo de inhibidor observado en toda nuestra serie Argentina con HAS (24/75, 32%), no difiere de la estimada para los casos Inv22 positivos (10/32, 31%). Las frecuencias y riesgos de inhibidor observados coinciden con la literatura internacional. El abordaje de PCR-I/Inv22 resulta ideal para ser incorporado en primera línea, ya que proveerá información segura en el 42% de las familias con HA severa.

49. (12362) PRESENCIA DE UNA MUTACIÓN NOVEL DEL GEN CYP21A2 EN UN PACIENTE CON HIPERPLASIA SUPRARENAL CONGÉNITA (HSC). MINUTOLO, CAROLINA; BUZZALINO, NOEMÍ (2); BELLI, SUSANA (3); ONETO, ADRIANA (3); CHARREAU, EDUARDO (1,4); ALBA, LILIANA (2); DAIN, LILIANA (2,4)

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y Centro Nacional de Genética Médica División Endocrinología Hospital Durand, Instituto de Biología y Medicina Experimental.

La HSC es un grupo de desórdenes autosómicos recesivos causados en el 90% de los casos por déficit de la enzima 21-hidroxilasa. En un trabajo previo hemos estudiado la presencia

de las diez mutaciones más frecuentes del gen CYP21A2, habiendo caracterizado el 83% de los alelos de los pacientes de la forma Clásica (C) y el 74% de los alelos de los pacientes No Clásicos (NC). Con el objetivo de analizar 28 cromosomas no relacionados aún no caracterizados en 4 familias con afectados C y 17 familias con afectados NC, a partir de muestras de ADN se estudiaron en una primera etapa por secuenciación los exones 6, 7, 8, y 10 y por SSCP el exón 2 del gen. En un paciente NC genotipificado V281L/No Determinado, hemos hallado una mutación en el exón 10 no descrita hasta el presente, que genera un cambio E por K en la proteína. Esta variante ha sido posteriormente estudiada en el paciente y en 84 cromosomas provenientes de individuos controles no relacionados mediante "mismatch-PCR" y digestión enzimática. La presencia de la mutación fue detectada en heterocigosis sólo en el paciente antes mencionado. Asimismo se realizó un análisis comparativo de secuencia de citocromos CYP21 (CLUSTAL W 1.74), y se halló que la región donde se ubica este cambio- relacionada con la unión al hemo- se encuentra muy conservada entre bovinos, ratón, rata, cerdo y caninos. El cambio de un aminoácido básico por ácido en esta zona, así como la ausencia de esta mutación en los cromosomas de individuos controles analizados hasta el presente, sería un indicio de que la mutación podría estar asociada a una alteración de la funcionalidad de la proteína que explicaría el fenotipo en este paciente. Este cambio será corroborado mediante ensayos funcionales de la proteína mutada.

50. (12542) DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES DEL GEN FLT3 EN SÍNDROME MIELODISPLÁSICOS. BELLÍ, CAROLINA (1); ROSSETTI, LILIANA (1); ARROSSAGARAY, GUILLERMO (2); BENGIÓ, RAQUEL (2); LARRIPA, IRENE (1)

(1) Depto Genética (2) Depto Clínica Médica, IHEMA, Academia Nacional de Medicina

El FLT3 es un receptor tirosina quinasa (TK) importante en la regulación de la hematopoyesis temprana. Las mutaciones reportadas para el gen son la duplicación interna en tándem (DIT) del exón 14 y las mutaciones puntuales del codón D835 en el exón 20. Ambas mutaciones producen una activación constitutiva alterando la proliferación y apoptosis. Los Síndrome Mielodisplásicos (SMD) comprenden un grupo heterogéneo de desórdenes hematológicos con riesgo de progresión a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y estas mutaciones se asocian a estadíos tardíos y progresión neoplásica. Se evaluaron 51 pacientes (edad media: 59 años; M/F=27/24; mediana de seguimiento: 26 meses) con SMD de novo: 27 Anemia Refractaria (AR), 4 AR con Sideroblastos Anillados, 13 AR con Exceso de Blastos (AREB), 1 AREB en transformación y 6 Leucemia Mielomonocítica Crónica, al diagnóstico. La detección de la DIT se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación y la búsqueda de mutaciones D835 mediante digestión de los productos de amplificación con la enzima EcoRV. Asimismo se construyeron los controles D835E, D835H, D835V, D835Y y un generador de heterodúplex (GH) mediante mutagénesis dirigida utilizando oligonucleótidos modificados. El estudio de ambas mutaciones mostró que sólo 1 de los 51 pacientes presentó una mutación puntual en el codón 835. Al someter el producto de amplificación al análisis de GH, éste mostró un patrón compatible al de la mutación D835V. Este paciente tenía un cariotipo normal, diagnóstico de AREB con una pronta evolución a LMA. Estos resultados indican que la presencia de mutaciones del gen FLT3 en SMD es de baja frecuencia. Sin embargo, su hallazgo en pacientes con cariotipo normal aportaría un factor pronóstico adverso, un marcador molecular para realizar estudios de seguimiento clínico y un probable blanco terapéutico.

51. (12559) TRES MUTACIONES NUEVAS EN FAMILIAS CON PORFIRIA VARIEGATA. FERREIRA GOMES, MARIELA S

(1,2); PARERA, VICTORIA E (1,2); BATLLE, ALCIRA (1); ROSSETTI, MARÍA VICTORIA (1,2)

(1) CIPYP - CONICET-Hospital de Clínicas, (2) Departamento de Química Biológica - FCEN-UBA

La Porfirias surgen como consecuencia de deficiencias genéticas parciales en una de las enzimas de la biosíntesis del hemo. Según su sintomatología se clasifican en cutáneas, agudas y mixtas. La Porfiria Variegata (PV) es una porfiria mixta y la enzima deficiente es la Protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) que cataliza la oxidación del Protoporfirinógeno IX a Protoporfirina IX. La PV es un desorden genéticamente heterogéneo. Se han descrito en el gen de la PPOX más de 120 mutaciones diferentes responsables de la falla enzimática. En base a las manifestaciones clínicas y parámetros bioquímicos diagnosticamos como PV 54 familias argentinas y en 9 de ellas ya hemos detectado la mutación en el gen de la PPOX. Mediante amplificación por PCR del ADN genómico extraído a partir de sangre periférica y secuenciación manual se detectaron, en otras 6 familias, 3 mutaciones puntuales nuevas: 2 de ellas no producen cambio de aminoácido pero alteran sitios consenso de splicing (K269K y g-3912c) y la tercera es un mutación missense (E34V) que altera la interacción de la proteína con el cofactor esencial FAD. Estas mutaciones estaban ausentes en 50 individuos control indicando que eran las responsables de la porfiria en estas familias. En otras 3 familias detectamos la mutación 1320insT, con lo cual el número de familias argentinas no relacionadas portadoras de esta mutación asciende a 8. La mutación 1320insT detectada en un 40% (8/20) de los pacientes sugiere que sería la más frecuente en la población argentina con PV. Así, el screening inicial para la detección del defecto molecular PV incluye la búsqueda de la inserción. Se están realizando los estudios de haplotipos con el objetivo de dilucidar si esta inusual prevalencia se debería a un efecto fundador. La identificación de la mutación en el gen de la PPOX permite la detección segura de los portadores asintomáticos en las familias afectadas y su asesoramiento con el fin de evitar el contacto con los agentes desencadenantes de la porfiria.

52. (12669) DETECCIÓN DE DOS NUEVOS POLIMORFISMOS EN EL GEN HFE. AFONSO, SUSANA GRACIELA; ATENCIA, GABRIELA; GEREZ, ESTHER; ROSSETTI, MARÍA VICTORIA; BATLLE, ALCIRA; PARERA, VICTORIA.

CIPYP-CONICET-HOSPITAL DE CLINICAS DEPTO QUIMICA BIOLOGICA-FCEN-UBA

La hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad metabólica heredada en forma autosómica recesiva, muy común en la población caucásica. En la HH se producen depósitos de hierro en distintos órganos, la cirrosis hepática es la manifestación más importante. Hay 5 tipos de HH, la más común es la tipo I; las mutaciones responsables son: H63D y C282Y en los exones 2 y 4 del gen HFE. La mutación S65C, se ha asociado a una forma leve de HH. Se han descrito 6 polimorfismos en el exón 2, y 3 en el exón 4. Se analizó la prevalencia de polimorfismos en pacientes con alteraciones en el metabolismo del hierro derivados a nuestro Centro para el estudio genético de HH. Se amplificaron y secuenciaron manualmente los exones 2 y 4 del gen a partir de sangre periférica. De 107 pacientes (81 hombres y 26 mujeres) el 57,7% era portador de alguna de las mutaciones HH. En el exón 4 sólo se encontró el polimorfismo E277K en un paciente. En el exón 2 se encontró el polimorfismo V59M en 2 pacientes, que no portaban las mutaciones HH, y 2 polimorfismos nuevos: E64Q (190G/C) y R78T (233 G/C). El primero se detectó en 24 pacientes, 5 portaban la mutación C282Y (2 homocigotas, 3 heterocigotas) y 6 la H63D en heterocigosis. El otro se encontró en 9 pacientes, 2 portaban la mutación H63D (1 homocigota, 1 heterocigota), 1 la C282Y (en heterocigosis) y 1 era doble heterocigota H63D/S65C. Dos pacientes no portaban mutaciones HH pero presentaban simultáneamente el polimorfismo E64Q. Teniendo en cuenta que sólo la mutación C282Y en homocigosis o en forma de doble heterocigota junto a la H63D diagnostican una HH tipo I, solamente en 3 de los 31 pacientes con

polimorfismos analizados, el estudio molecular justificaría las alteraciones halladas en el metabolismo del hierro. Es llamativo que 11 pacientes heterocigotas para alguna de las mutaciones en el gen HFE presenten también uno de estos nuevos polimorfismos los que podrían estar potenciando el efecto de un solo alelo mutado y explicar así el diagnóstico clínico de HH tipo I.

53. (12708) ANÁLISIS GENÉTICO DEL CRECIMIENTO DE LOS TUMORES EN UN MODELO MURINO DE CARCINOGENESIS ESPONTÁNEA DE MAMA. SUAREZ, CRISTIAN (1); HINRICHSEN, LUCILA (1,2)

Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, U.N.R. CIC-UNR.

Los modelos animales, espontáneos o inducidos, resultan de utilidad en el estudio de cáncer de mama para identificar genes de susceptibilidad. Para analizar el modo de herencia de caracteres de crecimiento tumoral se estudiaron hembras vírgenes de las líneas CBI+ (susceptible) y CBI/C (resistente), de la colonia CBI-IGE, y de sus cruces F1. El desarrollo de tumores de mama se detectó por palpación y su tamaño se midió semanalmente. El estado general de salud se controló semanalmente. Los animales se sacrificaron cuando el tumor alcanzó el tamaño máximo permitido, se observaron signos de deterioro físico, o la pérdida de peso llegó a 30%. Los tumores se procesaron para su tipificación histológica. El resto de los ratones se sacrificó al finalizar el estudio, a los 600 días de edad. La edad de detección del tumor se analizó con el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en la proporción de animales que desarrollaron tumor se analizaron con la prueba de ji(2). Los valores de la tabla con distinto superíndice difieren al 1%. La tasa de aumento de volumen tumoral fue menor en CBI/C ($p < 0.05$).

	CBI+	F1 (+ x C)	F1 (C x +)	CBI/C
Edad de detección del tumor (mediana, días)	243(a)	311(a)	401(b)	504(c)
Porcentaje de ratones con tumor	100(a)	96(a)	77(b)	17(c)
n	39	24	22	36

Las diferencias en la susceptibilidad a la carcinogénesis espontánea entre las líneas serían de naturaleza genética, ya que la F1 mostró un comportamiento distinto de las líneas parentales. Se observó efecto materno en las variables analizadas. La F1(+ x C) fue similar a la línea materna CBI+, mientras que (C x +) mostró un comportamiento intermedio y difirió de ambas líneas progenitoras. Este comportamiento diferencial en la susceptibilidad podría deberse a la interacción de factores virales y/o hormonales con los distintos genotipos.

HEMATOLOGIA

54. (11976) EFECTO DEL ARSENIATO (ASV) SOBRE LA DEFORMABILIDAD ERITROCITARIA Y LA FLUIDEZ DE MEMBRANA. HERNÁNDEZ, GLADIS; HUARTE, MÓNICA (1); BAZZONI, GRACIELA; PIEHL, LIDIA (1); CIMATO, ALEJANDRA (1); BOLLINI, ADRIANA; CHIAROTTO, MARCELO; RUBIN DE CELIS, EMILIO (1); RASIA, MARTA

Cát. Biofísica. Fac. Cs. Médicas. UNR (1) Cát. De Física. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA.

La contaminación con arsénico del agua de bebida aumenta el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares. Los glóbulos rojos (GRs) son el primer blanco de ataque, por lo tanto la interacción entre los compuestos de As y la membrana eritrocitaria podría reflejarse en sus propiedades reológicas. Se estudió la deformabilidad (DE) y la fluidez de membrana (FM) de GRs humanos incubados en presencia de arseniato (Asv). GRs de dadores sanos lavados se suspendieron en PBS (control) y con Asv 100 y 200 microg/l. Después de 30 min. de incubación a 37°C,

se midió: a) viscosidad (v) de la suspensión y del medio con viscosímetro cono-plato, calculándose v relativa (vr) (medida indirecta de la DE); b) índice de rigidez (IR: mayor IR, menor DE) por filtración. c) FM: midiendo el parámetro S por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica utilizando un radical nítróxido (ácido 5-doxil esteárico) inmovilizado en la membrana. Se presenta Media \pm SEM. a t de Student (grupos apareados) y b test de Student-Newman-Keule. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

n=12	vr (a)	IR (%) (a)	S (b)
control	2.59 \pm 0.06	6.94 \pm 0.65	0,68 \pm 0,004
+100 μ g/l As v	2.78 \pm 0.07***	7.86 \pm 0.34**	0,698 \pm 0,005*
+ 200 μ g/l As v	2.85 \pm 0.08***	8.44 \pm 0.42**	0,707 \pm 0,005*

Los resultados indican que la deformabilidad eritrocitaria disminuye por la presencia de As en el medio de incubación. Por otro lado, el incremento del parámetro S indica una disminución de la movilidad de los lípidos en la bicapa. Se postula que el Asv interacciona con los grupos sulfhidrilos de las proteínas y en consecuencia, podría modificar las interacciones proteicas en el citoesqueleto e indirectamente la movilidad de los lípidos de la bicapa y la DE.

55. (12074) AGREGABILIDAD ERITROCITARIA EN PRESENCIA DE ARSENIATO (ASV). BOLLINI, ADRIANA N; HERNÁNDEZ, GLADIS; BAZZONI, GRACIELA; RASIA, MARTA

Cát. Biofísica. Fac. Cs. Médicas. UNR.

El problema del Asv en el agua de bebida se viene tratando en Argentina desde hace varios años por su presencia natural en altas concentraciones en aguas subterráneas. La intoxicación con este ion produce, entre otros, desórdenes circulatorios con oclusión vascular, isquemia, y muerte tisular. Objetivo: Considerando que la agregabilidad eritrocitaria (AE) constituye uno de los factores reológicos preponderantes en la microcirculación, se estudió la influencia de la presencia de Asv sobre este proceso. Metodología: GRs de dadores sanos (n = 12) lavados se resuspendieron al 40% en PBS (control) y con Asv (arseniato de Na) a una concentración de 100 μ g/l en PBS. Después de 30 minutos de incubación a 37°C se midió AE en Dextrán 500 al 2% por método óptico y se determinaron 2 parámetros: 2k2n0 (estima la velocidad inicial) y s0/n0 (estima el tamaño de los agregados). Estadística: t de Student (grupos apareados) Media \pm SEM **** $p < 0.0001$.

	s0/n0	2k2n0
Control	1,89 \pm 0,004	1,15 \pm 0,04
+ 100 μ g/l Asv	1,90 \pm 0,003****	1,64 \pm 0,06****

De acuerdo con los resultados obtenidos, la AE aumenta en presencia de Asv (tanto el tamaño de los agregados como la velocidad inicial del proceso) respecto del control. Estos resultados aportan evidencia a la posible acción de este mecanismo reológico en los disturbios de la microcirculación producidos por la intoxicación con Asv debido a que el aumento de la AE disminuye la liberación de O₂ a los tejidos y, según han propuesto distintos autores, favorece la producción de radicales libres.

56. (12117) EFECTO DEL MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO (MFP) SOBRE LA FLUIDEZ SANGUÍNEA EN RATAS. CINARA, LUIS; MENOYO, INÉS (1); BOLLINI, ADRIANA; RIGALLI, ALFREDO (1); DI LORETO, VERÓNICA (1); HERNÁNDEZ, GLADIS

Cat. Biofísica Fac. Cs. Médicas, UNR (1) Lab Biología Osea, Fac Cs. Médicas, UNR.

El MFP es un compuesto utilizado en el tratamiento de la osteoporosis que se liga a la alfa2macroglobulina (a2M). Esta

unión produce pérdida de la actividad antiproteásica de la proteína, fenómeno similar al que se observa por unión a la tripsina. La inactivación de la globulina se acompaña de cambios de su actividad y concentración en ratas y seres humanos. La viscosidad plasmática está determinada por proteínas de elevada masa molecular y relación longitud/ancho, entre las que se halla la a2M. En este trabajo se estudió la influencia de la a2M sobre la viscosidad plasmática (VP) y sobre la viscosidad sanguínea (VS) por cambios inducidos después de la administración de una dosis de MFP. Se utilizaron ratas IIM/FcM sublínea "m" en las que se determinó hematocrito (Hto), VS a Hto nativo, VP y concentración de a2M luego de una dosis de 80 mmoles de MFP por sonda gástrica (n=5). El grupo control recibió 1 ml de solución fisiológica sin MFP (n=5). Además, se calculó la viscosidad relativa a Hto 40% (VR). Los resultados (media±SD) se muestran en la tabla. Los datos se analizaron con test "t" de Student para datos no apareados y se consideraron diferencias significativa si $p < 0,05$ (*).

	a2M (μmol/l)	VP (mPa.s)	Hto (%)	VS (mPa.s)	VR
control	19,65 ± 0,85	1,39 ± 0,013	33 ± 4	3,83 ± 0,66	3,92 ± 0,34
MFP	22,88 ± 0,75 *	1,76 ± 0,14*	38 ± 3 *	4,90 ± 0,92 *	3,00 ± 0,31

Se concluye que el aumento de la VP observado en el grupo tratado con MFP se debería al incremento de la a2M. La mayor VS en las ratas tratadas se explica por el aumento de la VP y del Hto. Por otra parte, se observa una disminución, aunque no estadísticamente significativa, de la VR lo cual estaría indicando una probable disminución de la deformabilidad eritrocitaria por efecto del MFP. Estas observaciones nos llevan a proponer el estudio de estas variables en ratas tratadas en forma crónica con MFP.

57. (12129) ESTUDIO DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA EN PRESENCIA DE ALUMINIO: DETERMINACIÓN MEDIANTE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA. HUARTE, MÓNICA (1); PIEHL, LIDIA (1); CIMATO, ALEJANDRA (1); BAZZONI, GRACIELA (2); BOLLINI, ADRIANA (2); CHIAROTTO, MARCELO (2); HERNÁNDEZ, GLADIS (2); RASIA, MARTA (2); RUBÍN DE CELIS, EMILIO (1)

Cát. Física. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA (1) Cát. Física. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA. (2) Cát. Biofísica. Fac. Cs. Médicas. UNR

En años anteriores hemos presentado estudios realizados tanto in vivo como in vitro que demuestran que el Al(3+), carente de función biológica y altamente tóxico, interacciona con la membrana eritrocitaria alterando sus propiedades físicas: disminuye la deformabilidad y agregabilidad eritrocitaria, aumenta la fragilidad osmótica y modifica la curvatura de la membrana. En el presente trabajo se estudió el efecto del Al(3+) sobre la fluidez de la membrana (FM) de glóbulos rojos (GRs) humanos a fin de relacionarlo con los estudios previos realizados. GRs de individuos sanos previamente lavados con PBS se incubaron 30 minutos a 37°C en ausencia y presencia de soluciones de AlCl₃ (1 y 10 μM). Los GRs fueron lavados con PBS y marcados con ácido 5-doxilestéarico por incubación 10 minutos a temperatura ambiente y posterior lavado. El espectro de resonancia paramagnética electrónica de dicho radical incorporado a la membrana fue obtenido en un espectrómetro Bruker ECS 106. A partir de los datos del espectro se calculó el parámetro de orden (S). Para ambas concentraciones, el tratamiento con Al(3+) produjo un aumento significativo ($p < 0,05$, test de Student-Newman-Keule) en el orden de la membrana con respecto a los controles, siendo los valores de $S \pm SEM$: en ausencia de Al(3+): $0,734 \pm 0,005$, en presencia de Al(3+) 1 μM: $0,754 \pm 0,005$, en presencia de Al(3+) 10 μM: $0,755 \pm 0,006$. El aumento en S indica una disminución en la fluidez de la membrana, o sea un aumento de la rigidez de la membrana del eritrocito. Los resultados obtenidos indicarían que el Al(3+) es capaz de producir alteraciones a nivel de los componentes lipídicos de la membrana del GR, que conducirían a la

disminución observada en la fluidez de membrana. Esto explicaría los cambios observados en las propiedades físicas estudiadas anteriormente.

58. (12131) EFECTO IN VITRO DEL ÁCIDO HIALURÓNICO SOBRE LA AGREGACION ERITROCITARIA. GIORGETTI, MARIA EDITH; URLI, LEDA (1); SVETAZ, MARIA JOSE (4); FERNANDEZ, MARIA DEL CARMEN (2); VOLPINTESTA, RICARDO (3); PALATNIK, SIMON (3); LUQUITA, ALEJANDRA (1); RASIA, MARTA (1)

Facultad Cs. Médicas: 1 Cátedra de Biofísica. Facultad Cs. Médicas: 1 Cátedra de Biofísica, 2 Cátedra de Bioquímica, 3Cátedra de Reumatología. 4 Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

El ácido hialurónico (AH) sérico está aumentado en los artríticos conforme a la actividad del proceso. Nuestra hipótesis es que AH, similar a albúmina, se adsorbe en la superficie del eritrocito y produce el deterioro de la deformabilidad y de la fluidez eritrocitaria, que hemos observado en sangre de artríticos. Por otra parte, la agregación de los eritrocitos es producida por las proteínas plasmáticas (aumentadas en los artríticos), pero depende primordialmente de las propiedades superficiales de estas células que podrían estar alteradas por el AH. A ese fin, se estudió el efecto del AH purificado adicionado in vitro a sangre normal, sobre la agregación eritrocitaria. Se utilizaron muestras de sangre de donadores normales. Cada muestra se fraccionó en dos partes, a una se le adicionó 200 mg/ml de AH purificado por cromatografía en ecteola celulosa (grupo AH) y a la otra igual volumen de la solución de elución neutralizada (control), se incubaron 30 minutos a 37° C, los eritrocitos se lavaron y se les determinó la agregabilidad en Dextrán 500 al 2%. El instrumento óptico empleado produce dos parámetros que estiman: la velocidad inicial del proceso $2k[2]n[0]$ y el tamaño de los agregados $s[0]n[0]$. Los resultados se analizaron con la t de student para datos apareados. Significación de la diferencia entre grupos: ** $p < 0,01$. NS: no significativo.

	2k[2]n[0] Media	EEM	s[0]n[0] Media	EEM
Control (n=16)	1,98	0,14	1,867	0,015
Grupo AH (n=16)	1,29**	0,21	1,866 (NS)	0,004

La agregación aumentada de los eritrocitos en la artritis reumatoidea es producida por el incremento de las proteínas plasmáticas y no por el AH adsorbido en su superficie.

59. (12184) EFECTO DEL MONOFLUOROFOSFATO (MFP) SOBRE LA AGREGACIÓN ERITROCITARIA (AE) EN RATAS. ASENAUER, ELIANA; MENOYO, INÉS (1); HERNÁNDEZ, GLADIS; RIGALLI, ALFREDO (1); DI LORETO, VERÓNICA (1); BOLLINI, ADRIANA.

Cátedra de Biofísica. Fac. de Cs. Médicas. UNR (1) Laboratorio de Biología Osea. Fac. de Cs. Médicas. UNR.

El monofluorofosfato es un compuesto utilizado en el tratamiento de la osteoporosis. En el organismo se transforma en fluoruro (F) y ortofosfato y modifica la actividad y concentración de la alfa2macroglobulina (a2M). Esta proteína plasmática presenta acción inhibitoria de proteasas y ha sido identificada como responsable de la hiperagregabilidad en ciertos procesos patológicos en humanos y modelos animales. En este trabajo se estudió el efecto de la ingestión de 80 micromoles de MFP via orogástrica sobre la AE en un grupo de ratas IIM/FcM sublínea "m" (n=5) y un grupo control (n=5) sin MFP. Se midió AE en Dextran 500 y plasma por método óptico y se determinaron 2 parámetros: $s0/n0$ (que estima el tamaño de los agregados) y $2k2n0$ (que estima la velocidad inicial del proceso) La concentración de a2M en plasma se determinó por Dot Blot. Los resultados se expresan como media±SD. Los datos se analizaron con test "t" de Student para datos no apareados. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$

	a2M ($\mu\text{mol/l}$)	s0/n0 (En Dx 500)	2k2n0 (En Dx 500)
Grupo Control	19.65 \pm 0.85	1.83 \pm 0.06	1.49 \pm 0.48
Grupo Tratado	22.88 \pm 0.75*	1.55 \pm 0.29 ****	0.63 \pm 0.10 ****

A pesar del aumento de la concentración de a2M plasmática, no se observó agregación en plasma mientras que en Dextran los dos parámetros disminuyeron con el tratamiento. La AE eritrocitaria es un proceso que depende de las características de la superficie celular y su interacción con la macromoléculas del medio. Estos resultados indicarían que se han producido modificaciones en la superficie del glóbulo que disminuyeron su capacidad agregante. Se propone continuar el trabajo tratando de identificar el/los responsable/s de este efecto. Para ello se estudiará la agregación eritrocitaria in vitro, en presencia de F, MFP y a2M purificada.

60. (12263) CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEÍNAS SENSIBLES A LA FOSFORILACIÓN EN TIROSINA DETECTADAS POR INCUBACIÓN DE HUVEC CON PLASMAS DE EMBARAZADAS. POWAZNIAK, YANINA; SANCHEZ LUCEROS, ANALIA; FARIAS, CRISTINA; GROSSO, NOELIA; DOMÍNGUEZ, MARÍA DE LA PAZ; KELLER, LETICIA; KEMPFER, ANA CATALINA; LAZZARI, MARÍA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. CONICET. FONCYT.

ADAMTS-13 y factor von Willebrand (VWF) sufren variaciones máximas en el tercer trimestre del embarazo. El VWF ha sido usado como marcador de daño endotelial. Su relación con apoptosis y angiogénesis en el embarazo normal no ha sido explorada. En la placenta la apoptosis aumenta progresivamente en el embarazo. El aumento de VWF y/o disminución de ADAMTS-13, podrían actuar como factores proapoptóticos responsables del incremento del índice apoptótico endotelial en el embarazo normal. La familia de las MAPquinasas (MAPK) participa en señales de sobrevida o muerte celular y muchas de ellas se activan a partir de la fosforilación en tirosina. En este trabajo, evaluamos la cinética de activación de las fosfatasa y los perfiles de fosforilación en tirosina de HUVEC incubadas con plasma (P) de embarazadas de tercer trimestre (PE). Los cultivos de HUVEC fueron incubados 5, 15, 30 y 60 min con PE y P normales (PN). Los estudios de caracterización se llevaron a cabo mediante electroforesis en 6, 10 y 15% SDS-PAGE, transferencia a nitrocelulosa y detección inmunoenzimática utilizando como primer anticuerpo antifosfotirosina. Con el agregado de P se observa la aparición de una banda de 49 \pm 3 kDa (n=3) ausente en las células sin tratamiento. A los 30 y 60 min de tratamiento aparece una banda de 43 \pm 3 kDa en la incubación con PE (ausente con PN) y una de 53 \pm 1 kDa en la incubación con PN (ausente con PE), n=3. La cantidad de fosfotirosina en los perfiles varía desde tiempo 0 hasta los 60 min. La incubación con PE indujo la aparición de una banda a los 30 y 60 min, que podría corresponder a la activación de MAPK, que no fue observada con la incubación con PN. La identificación de las bandas requerirá el uso de anticuerpos específicos para las proteínas de la familia de las MAPK y una vez identificadas se evaluará su rol en la fisiología placentaria.

61. (12277) RESPUESTA PLAQUETARIA AL ÓXIDO NÍTRICO (ON) EXÓGENO EN PACIENTES CON TROMBOSIS ARTERIAL (TA) Y TROMBOSIS VENOSA (TV). KELLER, LETICIA; ALBERTO, MARIA FABIANA; BERMEJO, EMILSE; LAZZARI, MARÍA A

IIHema, Academia Nacional de Medicina IIHema, Academia Nacional de Medicina

El óxido nítrico (ON) tanto endotelial como plaquetario modula la activación, adhesión y formación de agregados plaquetarios.

El déficit de ON, que se asocia a TA, puede originarse por una menor producción endotelial o por alteración en la biodisponibilidad, hecho descrito en pacientes con deficiencia de la enzima glutatión peroxidasa plasmática. Objetivo: estudiar la biodisponibilidad de ON exógeno medida por inhibición de la agregación plaquetaria en pacientes con TA y TV. Métodos: se estudiaron 20 pacientes con TA, 22 con TV y 26 normales (N). Se evaluó la inhibición de agregación inducida por ADP 5 μM o colágeno (Col) 1 $\mu\text{g/ml}$ en presencia de S-nitrosoacetilcisteína (SNAC) un dador de ON. Los resultados se expresaron como % de inhibición respecto de la agregación con el agonista en ausencia de SNAC. Para ADP con:

-SNAC 0.5 μM : TA:35 \pm 16*, TV:31 \pm 15**, N:50 \pm 17 (*TA-N p<0.004, **TV-N p<0.001, TA-TV ns)

-SNAC 1 μM : TA:58 \pm 15, TV 51 \pm 15*, N:65 \pm 14 (TA-N p=0.09, *TV-N p<0.002)

-SNAC 2 μM : TA:70 \pm 15, TV 63 \pm 16*, N:78 \pm 15 (TA-N p=0.08, *TV-N p<0.002)

Para Col con:

-SNAC 1 μM TA:29 \pm 20, TV:41 \pm 12, N:33 \pm 20

-SNAC 2 μM TA:63 \pm 25, TV:79 \pm 12, N:73 \pm 23

-SNAC 4 μM TA:86 \pm 7, TV:89 \pm 5, N:90 \pm 7

Con Col no hubo diferencias significativas entre los tres grupos estudiados. La inhibición de la agregación inducida por SNAC 0.5 μM en plaquetas estimuladas con ADP es menor en pacientes con TA y TV respecto al N. Concentraciones mayores de SNAC en TA tienden a una menor inhibición que no alcanza significación estadística, mientras que en TV sí. En TV esto podría relacionarse a una predisposición a la generación de trombina que es función también de las superficies plaquetarias activadas. Si el agonista es Col, no hay diferencias en la respuesta de inhibición. Dadas las condiciones experimentales la mayor resistencia a la inhibición tanto en TA como en TV, sólo es evidente cuando se emplea ADP, sugiriendo una diferente reactividad funcional de los receptores de ADP y no una menor biodisponibilidad de ON.

62. (12340) DISMINUCIÓN EN LA FUNCIONALIDAD DE LA TRANSFERRINA POR TRATAMIENTO CON PEROXINITRITO CARDOSO, NANCY; ALCALDE, MYRIAM; GALLEANO, MÓNICA

Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Las situaciones de inflamación y sepsis están asociadas a incrementos en la producción de peroxinitrito (ONOO-) y a modificaciones en los parámetros de hierro (Fe) plasmático. El objetivo de este trabajo fue estudiar las alteraciones funcionales en la transferrina (Tf) por efecto del tratamiento in vitro con ONOO-. Muestras de plasma proveniente de individuos normales fueron tratadas con ONOO- (0-200 μM) y se determinaron contenido de Fe y capacidad total para unir Fe (TIBC) utilizando un equipo comercialmente disponible. La determinación de Fe se fundamenta en la capacidad de la Tf de liberar Fe(III) en medio ácido, que luego es luego reducido y complejo con ferrocina para ser determinado espectrofotométricamente. El contenido de Fe fue de 56 \pm 11, 30 \pm 11, 16 \pm 12*, 13 \pm 7* y 7 \pm 4* $\mu\text{g/dl}$ (*p menor a 0,05) para 0, 25, 50, 100 y 200 μM ONOO- respectivamente. El procedimiento utilizado para la determinación de TIBC tiene como paso limitante la capacidad de la Tf para captar el Fe. TIBC resultó de 324 \pm 27, 311 \pm 3, 298 \pm 35, 166 \pm 20* y 53 \pm 7* μg (*p menor a 0,05) para 0, 25, 50, 100 y 200 μM ONOO- respectivamente. El complejo Fe (III): transferrina puede ser directamente estudiado a través de resonancia paramagnética electrónica (EPR) a 77 K. El tratamiento con ONOO- disminuyó significativamente la magnitud de la señal obtenida en concordancia con las determinaciones bioquímicas. Se realizaron ensayos para estudiar modificaciones a aminoácidos en apoTf purificada expuesta a ONOO- bajo similares condiciones experimentales y se detectaron disminuciones significativas, tanto en la fluorescencia adscripta al triptofano como en el contenido de grupos tioles. Podemos concluir que la

transferrina resulta susceptible a modificaciones en ciertos residuos de aminoácidos por tratamiento con peroxinitrito. Estas modificaciones alterarían la funcionalidad de la proteína, tanto en el proceso de captación como en el de liberación de Fe. Estudios posteriores serán necesarios para determinar la importancia fisiológica del fenómeno estudiado.

Financiado por CONICET.

63. (12384) RESPUESTA AL SINERGISMO ADENOSINA DIFOSFATO (ADP) - ADRENALINA (ADR) EN PACIENTES CON DEFECTOS PRIMARIOS DE LA SECRECIÓN PLAQUETARIA (DPS). DOMÍNGUEZ, MP; ALBERTO, MF; BERMEJO, EI; MESCHENGIESER, S; SÁNCHEZ LUCEROS, A; LAZZARI, MA

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Introducción: el DPS identifica un grupo heterógeno de pacientes con secreción plaquetaria disminuida, siendo normales, la agregación primaria, el contenido de gránulos densos y el metabolismo del ácido araquidónico (AA). Este grupo representaría la expresión heterocigota para la deficiencia del receptor de ADP P2Y12. En plaquetas deficientes en P2Y12, el ADP no inhibe adecuadamente la adenilato ciclasa (AC), efecto que es corregido por ADR. Objetivo: estudiar la respuesta plaquetaria al sinergismo ADP-ADR, medida a partir de la liberación de ATP en pacientes con DPS y sangrado cutáneo mucoso. Determinaciones: tiempo de sangría, TTPA, FVIII, VWFag, VWRCo, agregación y liberación plaquetaria con ADP, ADR, Colágeno (Col) y AA; además ADP-ADR en concentraciones crecientes. Resultados: según la agregación se definieron tres fenotipos: A) ausencia de respuesta secundaria con ADP y ADR, B) ausencia de respuesta secundaria sólo con ADP, C) normal. La agregación y liberación con AA 0.5 mM, Col 1 y 8 mg/ml de A, B y C fueron normales. Las medias de liberación de ATP (μM) para los sinergismos fueron:

-ADP 0.625-ADR 3.0 (μM): A) $0.5^* \pm 1.2$; B) $2.5^{**} \pm 1.6$; C) 3.9 ± 1.7
 -ADP1.25-ADR 3.0 (μM): A) $1.2^{***} \pm 1.7$; B) 3.8 ± 2.0 ; C) 4.3 ± 1.3
 -ADP 2.5-ADR 10 (μM): A) 3.4 ± 2.0 ; B) 3.6 ± 1.7 ; C) 4.6 ± 1.5
 *A-B $p < 0.006$, **B-C $p < 0.03$, ***A-B $p < 0.01$

Los fenotipos A y B tienen una respuesta diferente al sinergismo ADP-ADR (entre sí y con respecto al normal) en concentraciones subnormales. La diferencia se pierde al utilizar la combinación en concentraciones estándares. No hubo correlación entre los fenotipos y la severidad de sangrado ($p > 0.3$), ni con los parámetros del VWF ($p > 0.3$). Conclusión: la agregación secundaria en A y B se corrige por inhibición de la AC, indicando alteración funcional del P2Y12. Sin embargo, la distinta respuesta al sinergismo sugeriría diferencias a nivel molecular entre los fenotipos A y B.

64. (12468) DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA S FUNCIONAL (PSF) EN PORTADORES DE FACTOR V LEIDEN (FVL) GENNARI, LAURA C; BLANCO, ALICIA; NADAL, MARÍA VICTORIA; LAZZARI, MARÍA A

División Hemostasia, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

El déficit de PS se asocia a eventos trombóticos. La determinación de PSf puede estar influenciada por variables como sexo, FVL, FVIII, anticuerpos antifosfolípidos, etc., que podrían llevar a una inadecuada interpretación de los resultados (pseudodéficit de PS). Nos propusimos evaluar el comportamiento de PS en pacientes FVL utilizando equipos comerciales con diferentes principios (A=IL Test Protein S, IL; TP; B=Bioclot PS, Biopool; APTT; C=Acticlot PS, American Diagnostica; APTT). También se determinó PS antigénica (PSAg) (D=libre y E=total) por Laurell y resistencia a la proteína C activada (RPCA, Chromogenix). Se analizaron 18 pacientes FVL (16 heterocigotas; 2 homocigotas) y 20 normales (10 hombres; 10 mujeres) para estimar el valor de corte (media \pm 2DS) para: A=60-120%, B=57-116%, C=69-149%. Tres

pacientes mostraron valores límites o disminuidos de PSAg (D y/o E) y fueron excluidos del análisis. Las medias (\pm DS) de PS fueron: A=58 \pm 15,9; B=74 \pm 17,7; C=76 \pm 15,1; D=88 \pm 11,0; E=96 \pm 13,4. Todas las muestras dieron valores de PSf menores que PSAg (D: $p_A < 0,001$; $p_B = 0,003$; $p_C = 0,018$ / E: $p_A < 0,001$; $p_B < 0,001$; $p_C = 0,002$). Los valores de A fueron menores a los obtenidos con B ($p = 0,038$) y C ($p = 0,016$) y no correlacionaron con PSAg libre (D $r_{\text{Spearman}} = 0,36$; $p = 0,188$) ni con los otros ensayos funcionales (B $r_{\text{Spearman}} = -0,11$; $p = 0,688$ / C $r_{\text{Spearman}} = 0,26$; $p = 0,350$) que sí correlacionaron entre sí ($r_{\text{Spearman}} = 0,64$; $p < 0,005$). No observamos correlación de ninguno de los tests funcionales (A, B, C) con los valores de RPCA (A $r_{\text{Spearman}} = 0,43$; $p = 0,112$ / B $r_{\text{Spearman}} = -0,33$; $p = 0,230$ / C $r_{\text{Spearman}} = -0,15$; $p = 0,593$). De las 15 muestras, 8 tuvieron valores disminuidos de PS con A; 2 con B y 5 con C. Dada la baja prevalencia del déficit tipo II, lo primero a considerar sería la posible interferencia del FVL, que llevaría a una clasificación errónea (déficit trombofílico combinado) con el consiguiente efecto en la conducta clínica; destacándose la importancia de conocer las posibles interferencias para una adecuada interpretación de los resultados.

65. (12589) VALIDACIÓN DEL CONFORMATION SENSITIVE GEL ELECTROPHORESIS (CSGE) COMO MÉTODO DE SCREENING DEL EXÓN 22 DEL FACTOR VON WILLEBRAND EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND (VWD) 2N. KELLER, LETICIA; WOODS, ADRIANA I; KEMFER, ANA C; FARÍAS, CRISTINA E; GROSSO, NOELIA; LAZZARI, MARÍA A.

Dto de Hemostasia y Trombosis, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Para el diagnóstico molecular de VWD 2N se usan métodos de screening para evaluar rápida y económicamente gran número de muestras. Se eligió el CSGE por ser el que ofrece menos falsos negativos. En otros trabajos hemos descrito la confiabilidad del mismo en el análisis de los exones 18 al 21 del gen del factor von Willebrand (VWF). En este trabajo comparamos este método con la secuenciación para evaluar su sensibilidad en el screening del exón 22. En 30 pacientes (P) con FVIII y FVW:VIII B disminuido y 20 normales (N) se amplificó el exón 22 por técnicas habituales de PCR y se estudió por secuenciación y CSGE. Por secuenciación (ABI PRISM 310) no encontramos mutaciones, pero detectamos 6 homocigotas A, 14 heterocigotas y 30 homocigotas G para el polimorfismo normal G2880A (frecuencia alélica: 0,74/0,26) en P y N. Por CSGE, se hicieron heterodúplex de P+N homocigota G. En el gel se sembraron los productos de PCR del P y del P+N. En todos los casos se observó una sola banda. La presencia de dos bandas sugiere polimorfismo normal o mutación. Deberían existir dobles bandas en las mezclas P+N de los P homocigota A y en las muestras P y P+N de los heterocigotas, dando un 40% de falsos negativos. Como en los exones 20 y 21 los resultados no generan falsos negativos, comparamos las características de los 3 exones. Exón 22: ubicación de la sustitución dentro del producto de PCR: 125 pb (total: 254 pb); contenido GC: 55,5%. Exón 21: ubicación de la sustitución G2771A: 147 pb (total: 268 pb); contenido GC: 54,5%. Exón 20: ubicación de la sustitución G2555A: 66 pb (total: 202 pb). Debido a que el tamaño del producto de PCR, la ubicación de sustituciones y el contenido de GC son similares en los 3 exones, no hallamos justificación para la ausencia de dobles bandas en el exón 22. Por ello no sería aconsejable la técnica de CSGE como screening para el análisis del exón 22.

66. (12688) EL RECEPTOR DE TRANSFERRINA SOLUBLE EN LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA. PENNACCHIOTTI, GRACIELA; LOPEZ, GUSTAVO; GARCIA, BETTINA; AGGIO, MARIO; ROQUE, MARTA

Fisiología Humana, Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca Argentina.

Los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) desarrollan anemia por causas multifactoriales. El incremento de la eritro-

poyesis que causa la eritropoyetina (EPO) no siempre puede ser sostenido por la disponibilidad de Fe, situación definida como deficiencia funcional del nutriente. Esta eritropoyesis ferropriva necesita ser rápidamente identificada para modificar la dosis de EPO o para administrar Fe que facilite la óptima respuesta. El objetivo fue evaluar la utilidad clínica del receptor de transferrina soluble (RTfs) como indicador de deficiencia funcional de hierro y correlacionarlo con la respuesta a la EPO para el grado de anemia en la IRC. Se estudió un grupo de pacientes con IRC (n=22) bajo un programa continuo de hemodiálisis, el 77 % recibía terapia con rHuEPO. Los resultados se compararon con los obtenidos en una población de referencia: adultos sanos (n=51). La sensibilidad (S) y especificidad (E) del RTfs se determinaron con curvas de las características operativas del receptor (COR). EPO y RTfs se determinaron por ELISA. En los pacientes con IRC se observó una disminución del HCT y la Hb. Los niveles de Ferritina sérica fueron variables y se encontraron por encima del límite superior de referencia; este aumento fue más notable en el grupo no tratado con rHuEpo. La mayoría de los pacientes con IRC tratados con rHuEpo presentaron valores del RTfs dentro del intervalo de referencia. El índice de eficacia de EPO como Hb/dosis rHuEPO fluctuó entre 0.055-0.785 (Hb:66-119gr/L). La relación RTfs/log Ferritina tendió a disminuir, indicando una disminución de RTfs y/o un aumento del Fe de depósito. Se puede concluir que el diagnóstico de deficiencia de Fe (funcional o no), es esencial en pacientes dializados para el tratamiento adecuado con rHuEPO. Los niveles del RTfs dentro del rango normal observados en nuestro estudio sugieren que la magnitud de la eritropoyesis no fue adecuada para las dosis de rHuEpo recibidas.

INFECTOLOGIA

67. (12160) INFLUENCIA DE LOS GRUPOS DE AGR EN LA INFECCIÓN PERSISTENTE POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS. ALVAREZ, LUCIA; BARBAGELATA, MARÍA SOL; TUCHSCHERR, LORENA; LATTAR, SANTIAGO; SORDELLI, DANIEL; BUZZOLA, FERNANDA.

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA.

Staphylococcus aureus infecta la glándula mamaria bovina causando diferentes tipos de mastitis. La expresión coordinada de los factores de virulencia de *S. aureus* es alcanzada mediante la autoinducción del regulador global agr. El objetivo de este trabajo fue analizar el polimorfismo del locus agr y su relación con la invasión de *S. aureus* en células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T). Por medio del análisis polimórfico del locus agr, se determinó que el 80,6 % de los aislamientos analizados por PCR con múltiples cebadores específicos fueron del grupo I de agr, siguiéndole en orden de frecuencia los grupos III (9,7 %), II (4,8 %), y IV (4,8 %). Los grupos II, III y IV presentaron además mayor diversidad clonal cuando se los analizó mediante PCR y posterior restricción con AluI y RsaI. La expresión de polisacárido capsular (PC) se encuentra regulada positivamente por agr. Por medio del ensayo de invasión protegido con gentamicina se estableció una capacidad significativamente mayor de las mutantes agr-deficientes de los aislamientos capsulados RA5 (Mediana T2h: 104500 UFC/ml) y RA8 (Med. T2h: 29120 UFC/ml) cuando se lo comparó con las cepas salvajes (Med. T2h: 784 UFC/ml y 112 UFC/ml, respectivamente, $p < 0,0001$, Mann-Whitney). El grado de internalización de la mutante agr-deficiente de un aislamiento no capsulado (Med. T2h: 104400 UFC/ml) fue significativamente mayor cuando se lo comparó con la bacteria salvaje (Med. T2h: 3142 UFC/ml; $p < 0,0001$; M-W test). Se determinó mediante el modelo murino de infección intramamaria que los aislamientos pertenecientes al grupo I de agr (Med. Día 4: 122500 UFC totales) persistieron en mayor medida en la glándula mamaria murina comparados con aquellos pertenecientes a los grupos II (Med. Día 4: 60 UFC totales) o IV (Med. Día 4: 240 UFC totales; $p < 0,01$; M-W test). El conjunto de los resultados sugieren que los aislamien-

tos del grupo I de agr tendrían cierta ventaja para persistir en la glándula mamaria bovina.

68. (12163) PÉRDIDA DE LA EXPRESIÓN DE CÁPSULA EN STAPHYLOCOCCUS AUREUS MEDIADA POR IS257. TUCHSCHERR, LORENA; ALVAREZ, LUCÍA; BARBAGELATA, MARÍA SOL; BUZZOLA, FERNANDA; LATTAR, SANTIAGO; SORDELLI, DANIEL

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina, UBA.

Si bien el polisacárido capsular aumenta la virulencia de *S. aureus*, en diferentes patologías se ha detectado un incremento de la cantidad de aislamientos que no expresan cápsula (no tipificables-NT), especialmente en bovinos. Muchos de estos *S. aureus* NT carecían de los genes cap, encontrándose en su lugar una secuencia de inserción que presentó una homología del 84% con IS257. Este estudio fue diseñado para evaluar si la pérdida de los genes cap y su reemplazo por una IS puede ocurrir durante la infección. Se evaluó si existía algún agente de selección que explicara la pérdida de los genes cap y se verificó que la presencia de IS257 no estaba asociada a la presencia de mecA ni de los genes de resistencia a amonios cuaternarios qacA, qacB y qacC, evaluados por PCR. Se diseñó un protocolo para estudiar si selección de cepas no capsuladas por el sistema inmune del huésped era factible. En estos experimentos se utilizaron cepas que expresaban cápsula y que en otro sector del genoma contenían la IS257. La selección se realizó por cultivos sucesivos y precipitación con anticuerpos específicos contra la cápsula de serotipo 5 (CP5). El estudio se realizó por diez ciclos consecutivos y la pérdida de expresión de cápsula fue investigada por "immunoblot" de colonias. Al cabo del décimo ciclo de selección se hallaron colonias de *S. aureus* que no producían cápsula. La evaluación fenotípica y genotípica de los genes cap resultó negativa, lo que demostró la pérdida de los genes cap. Al mismo tiempo se detectó la presencia en la cepa investigada de la IS257. Al realizar la amplificación por PCR del segmento entre los genes ("housekeeping") adhE y aldA se encontró un segmento de 1,3 kb, en lugar del "cluster" cap (17 kb). Los resultados sugieren que la presión selectiva ejercida por anticuerpo contra el polisacárido capsular permitirían seleccionar cepas no capsuladas por un mecanismo en el que intervendría la IS257.

69. (12180) EXPRESIÓN DE CÁPSULA SEROTIPOS 5 (CP5) Y 8(CP8) EN AISLAMIENTOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DE PACIENTES CON INFECCIÓN OSTEOARTICULAR. LATTAR, SANTIAGO; TUCHSCHERR, LORENA; BARBAGELATA, MARIA SOL; ALVAREZ, LUCÍA; BUZZOLA, FERNANDA; SORDELLI, DANIEL

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina, UBA.

S. aureus es un patógeno que puede invadir el tejido óseo y causar osteomielitis. La mayoría de los aislamientos clínicamente relevantes expresan cápsula de serotipo 5 u 8 (CP5 o CP8). En bovinos de Argentina con infección crónica mamaria, una abultada proporción de los aislamientos no expresaban cápsula y muchos habían perdido los genes cap, necesarios para su expresión. En este trabajo se evaluó la expresión de cápsula en aislamientos provenientes de pacientes con infección osteoarticular y la expresión de alfa-hemolisina, β -hemolisina y biofilm. Las pruebas se realizaron sobre 37 cepas clínicas pertenecientes a pacientes humanos con diagnóstico de osteomielitis y artritis séptica. La confirmación específica de especie de *S. aureus* se realizó por medio de una PCR descrita por Martineau. La clonalidad se determinó por el método de STAR-PCR. La presencia de cápsulas CP5 y CP8 se estableció por la técnica de "colony immunoblot" (tamizaje) y Ouchterlony (prueba definitiva). La producción de biofilm se determinó por cultivo en agar rojo-congo. La producción de alfa y β -hemolisinas se realizó por cultivo sobre agar sangre de conejo y de carnero, respectivamente. Los resultados mos-

traron que de las 37 cepas analizadas, 20 no expresaban cápsula, 13 eran CP5 y 4 CP8. A las 20 cepas NT que no expresaban cápsula se las sometió a una PCR de los genes *cap5* y *cap8* obteniéndose los siguientes resultados: 10 portaban *cap5*, 8 *cap8* y 2 carecían de dichos genes. La producción de alfa y beta-hemólisis y biofilm por las cepas NT, CP5 y CP8 no fue significativamente diferente. El estudio retrospectivo de cepas de un mismo paciente con enfermedad osteoarticular crónica sugirió que *S. aureus* podría perder la cápsula durante la infección crónica. Se concluye que a diferencia de lo publicado anteriormente, en la población bajo estudio se registra un número inusualmente elevado de aislamientos de *S. aureus* que no expresan cápsula.

70. (12251) CARACTERIZACIÓN DE UNA MUTANTE DEFICIENTE DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS. BARBAGELATA, MARIA SOL; BUZZOLA, FERNANDA; LATTAR, SANTIAGO; TUCHSCHERR, LORENA; ALVAREZ, LUCÍA; SORDELLI, DANIEL

Depto Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina, UBA

Las infecciones intramamarias (ima) causadas por *Staphylococcus aureus* tienden a volverse crónicas y las posibilidades de cura luego de una terapia con antibióticos es limitada. Diferentes tipos de vacunas han fracasado en prevenir y reducir la severidad de las mastitis por *S. aureus*. El uso de bacterias atenuadas por auxotrofia es una alternativa al desarrollo de vacunas que prevengan este tipo de infecciones. En el presente trabajo se caracterizó genética y molecularmente la mutante auxótrofa de *S. aureus* (Sa306) obtenida por transposición y se evaluó la capacidad protectora e inmunogénica en el modelo murino de mastitis. Mediante transducción con el fago phi-11, se traspasó a la cepa salvaje RN6390 de *S. aureus* la resistencia a eritromicina (EmR) que porta el transposón Tn917. Más de 100 transductantes mostraron ser EmR y presentaron el mismo fenotipo dependiente de los aminoácidos aromáticos (aa aro) observado en la mutante Sa306. La secuenciación de un fragmento del ADN flanqueante al transposón insertado reveló que el gen afectado fue *aroA*. Mediante el ensayo de complementación con el plásmido pALC1743 que porta el gen *aroA* salvaje, la mutante Sa306 recuperó la capacidad de crecer en medio mínimo carentes de los aa aro confirmando que la lesión en *aroA* es responsable del fenotipo auxótrofo observado. Luego del desafío ima con la cepa salvaje RN6390, las UFC recuperadas de glándula mamaria de los ratones *aroA*-inmunizados (1052 ± 538 UFC totales) fue significativamente menor comparado con el grupo control ($1,6 \times 10(5) \pm 9,5 \times 10(4)$ UFC totales, $p=0,02$) y con el grupo inmunizado con RN6390-muerto por calor ($2,5 \times 10(5) \pm 1,5 \times 10(5)$ UFC totales, $p=0,01$; Test Mann-Whitney). La inmunización ima con la mutante *aroA* indujo altos niveles de los transcriptos IL-4 e IFN- γ en las glándulas mamarias murina. Los resultados sustentan la factibilidad de inducir inmunidad protectora mediante una vacuna viva atenuada *aroA* de *S. aureus* para prevenir la mastitis estafilocócica.

71. (12331) ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS EN AISLAMIENTOS DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS ASOCIADOS A CATÉTERES: IMPORTANCIA DE LOS SISTEMAS DE EFLUJO. AZPIROZ, AGUSTINA (1); DE PAULIS, ADRIANA (2); PREDARI, SILVIA(2); SORDELLI, DANIEL (1); JERIC, PAOLA (1)

Departamento de Microbiología, Parasitología e inmunología, Facultad de Medicina, UBA Instituto de Investigaciones Medicas Alfredo Lanari

Analizamos uno de los mecanismos de resistencia a quinolonas (eflujo del antibiótico) en aislamientos clínicos de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de catéteres endovasculares y hemocultivos y su relación con la virulencia. Reco-

lectamos 24 aislamientos de *S. epidermidis* resistentes a ciprofloxacina provenientes de pacientes con infecciones asociadas a catéteres endovasculares, bacteremias e infecciones urinarias. Determinamos la CIM en ug/ml a norfloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina mediante el método de dilución según las normas de la NCCLS y a ciprofloxacina y a bromuro de etidio en presencia de un inhibidor de sistemas de eflujo: CCCP. Evaluamos la presencia de los genes *mecA*, *qacA*, *qacB* y *qacC* mediante PCR utilizando los respectivos controles positivos y la producción de biopelícula mediante una modificación de la técnica de Christensen y col. De los 24 aislamientos analizados, 23 resultaron resistentes a norfloxacina (16-128 ug/ml), ciprofloxacina (4-256 ug/ml) y levofloxacina (1-8 ug/ml) pero sensibles a moxifloxacina (0,5-2 ug/ml). Veintidós formaron biopelícula y 11 mostraron la presencia del gen *mecA*. De estos 23 aislamientos, 5 ($p<0,0001$) mostraron una disminución entre 2 y 10 veces el valor de la CIM a ciprofloxacina y a bromuro de etidio en presencia de CCCP y no detectamos en ellos la presencia de los genes de origen plasmídico *qacA*, *qacB* y *qacC*. Concluimos que: 1) La presencia del mecanismo de eflujo es muy significativa en esta población de *S. epidermidis* aunque no es aparentemente el mecanismo de resistencia bacteriana a quinolonas más frecuente y es muy probable que acompañe a mutaciones de la ADN girasa y/o la Topoisomerasa IV. 2) Todos los aislamientos que manifestaron poseer un mecanismo de eflujo fueron virulentos ya que formaron biopelícula in vitro y albergaron el gen *mecA*. 3) El sistema de eflujo estaría localizado a nivel cromosomal.

72. (12333) MODIFICACIONES FUNCIONALES EN LA FERRITINA POR DAÑO NITROSATIVO. ALCALDE, MYRIAM; PUNTARULO, SUSANA; GALLEANO, MONICA

Flsicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento in vitro con peroxinitrito (ONOO-) sobre la proteína ferritina. La principal función de la ferritina a nivel celular es almacenar hierro (Fe) y constituye una forma potencialmente segura de prevenir la generación de radicales oxidativos en reacciones catalizadas por Fe lábil. De esta forma las alteraciones funcionales consecuentes a la exposición con ONOO- podrían afectar la condición oxidativa celular. Se expuso apoferritina de bazo de caballo a ONOO- (ferritina 1 μ M en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4, bicarbonato 25 mM a 37°C, en concentraciones 0-1000 μ M ONOO-, 3 min). Se estudiaron las modificaciones producidas en un grupo de aminoácidos susceptibles al daño por ONOO- (triptofano -Trp-, fenilalanina -Phe- y tirosina -Tyr-) empleando espectroscopía de fluorescencia (FI). La FI asociada a los distintos aminoácidos disminuyó en forma dosis dependiente, resultando de $72 \pm 7^*$, $69 \pm 7^*$ y $71 \pm 6^*$ ($*p<0,05$) los valores de FI remanente después del tratamiento con 500 μ M ONOO- para Trp, Phe y Tyr respectivamente. La funcionalidad de la proteína fue estudiada a través de la determinación de la actividad ferroxidasa ensayada por una técnica discontinua, analizando el Fe(II) remanente en el medio de reacción utilizando la formación de un complejo con ferrocina detectado espectrofotométricamente. Esta actividad disminuyó a $59 \pm 7^*$ y $37 \pm 3^*$ ($*p<0,05$) de su valor control como resultado del tratamiento con ONOO- 500 y 1000 μ M respectivamente. Estudios preliminares fueron realizados empleando linsidomina (SIN-1) como generador de ONOO- ($3,8 \pm 0,2$ μ M ONOO-/min para una concentración 500 μ M SIN-1). Como consecuencia de la exposición al agente oxidante se detectó una disminución del 56% y 24% en los contenidos de los residuos cisteína y metionina, respectivamente. Los resultados indican que el tratamiento con peroxinitrito produce modificaciones en ciertos aminoácidos de la ferritina que conducen a alteraciones funcionales, evidenciadas como una disminución de la actividad ferroxidasa.

Financiado por CONICET, UBA y ANPCyT.

73. (12354) MACRÓFAGOS DE RATAS "L" CULTIVADOS EN PRESENCIA DE TRYPANOSOMA CRUZI: SU CAPACIDAD DE SINTETIZAR ESTEROIDES A PARTIR DE

PROGESTERONA. (1)VACCHINA, PAOLA; (2)VALDEZ, RICARDO A.; (1)PEZZOTTO, STELLA; (1)REVELLI, SILVIA; (2)ROMANO, MARTA C.

(1) *Instituto de Inmunología-Facultad de Ciencias Médicas-UNR-Argentina. Dpto. Fisiología, Biofísica y Neurociencia. Cinvestav, México*

La progesterona (P4), dehidroepiandrosterona (DHEA) y derivados, poseen diferentes efectos inmunomoduladores, aunque su mecanismo de acción no ha sido esclarecido totalmente. Los macrófagos, una vez infectados por el *Trypanosoma cruzi* (Tc) actúan simultáneamente como células huésped, y como células efectoras participando en el control de la infección. Anteriormente hemos demostrado que los macrófagos peritoneales (Mf) de ratas "I" adultas macho metabolizan DHEA y que esto es aumentado por el proceso infeccioso (Medicina: 64 Supl. II, 274, 2004). En continuidad con ello, ahora estudiamos la capacidad de metabolizar P4 y el efecto de la infección. Los Mf se cultivaron con INF-gamma-r-rata. Posteriormente se adicionó (3)H-P4 en presencia o ausencia de Tc y a las 24, 48 y 72 horas, se extrajeron del sobrenadante los esteroides, que se procesaron por cromatografía en capa fina (TLC). Se observó la transformación de (3)H-P4 a androstenediona (A4) y estrona (E1). Los valores a las 24 horas para los Mf normales fueron (% promedio, rango): A4 3.16%, (4.91-1.99) y E1 4.69%, (4.93-4.25). Este patrón se modificó en los Mf infectados, observándose a las 24 horas para A4 0.1%, (0.32-0), y para E1 7.39%, (7.95-7.1). Estos datos nos permiten sugerir que en los Mf existen las enzimas esteroideogénicas necesarias para metabolizar DHEA y P4. Los resultados demuestran que la infección modifica el patrón de transformación del precursor esteroide, sesgando la vía metabólica hacia la formación de E1.

74. (12355) CÉLULAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON HIV-1: PROPIEDADES RELACIONADAS CON LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO. RIVA, DIEGO (1); GERHARDT, ELIZABETH (1); RIOS DE MOLINA, MARÍA DEL CARMEN(1); DOS RAMOS FARIAS, MARÍA SOL (1); MARTINEZ PERALTA, LILIANA (2); COULOMBIÉ, FÉLIX (1); MERSICH, SUSANA (1)

(1) *Lab Virología. Depto Qca Biológica. FCEyN. UBA.* (2) *CNRS, Facultad de Medicina, UBA.*

La infección por HIV puede causar la acumulación de proteínas oxidadas responsables de la inducción de estrés oxidativo en distintas células de animales infectados. Una de las primeras enzimas en la cadena de respuesta celular es la superóxido dismutasa (SOD). El objetivo de este trabajo fue estudiar los niveles de SOD total en dos líneas celulares T, H9 (sin infectar) y H9+ (persistentemente infectadas con HIV-1) y evaluar la respuesta de dichas células a un fitoquímico no tóxico: Curcumina (Cur). Este compuesto diferuloilmetano, de propiedades antioxidantes, inhibe la activación del factor de transcripción NF-kB. La actividad de SOD se midió a través de la inhibición de la autooxidación de la epinefrina, cuya cinética se siguió por absorbancia a 480 nm. La viabilidad celular se determinó por un ensayo colorimétrico que midió las enzimas dehidrogenasas presentes en las mitocondrias y el antígeno p24 presente en los sobrenadantes, se evaluó con un ensayo de ELISA. A las células H9+ sin tratamiento se les asignó un valor de 100% para (a) el ensayo de viabilidad y (b) la cantidad de antígeno liberado al sobrenadante. El nivel de unidades SOD (U) que exhibieron las células H9+ (2,8 U) resultó significativamente menor ($p < 0,05$) respecto de H9 (5,2 U). El tratamiento con un inhibidor de proteasa retroviral, Indinavir (IDV), restauró la expresión de SOD (4,8 U) a los valores de H9. Por otra parte, el tratamiento combinado de IDV con Cur no alteró la viabilidad celular (IDV=83%; IDV+Cur=82%) y disminuyó en un 50% la liberación de p24 (IDV=30%; IDV+Cur=16%). Los resultados sugieren que es posible restaurar la expresión de la enzima antioxidante y la viabilidad celular, a los valores normales, en la célula infectada con HIV-1. Asimismo, el antioxidante elegi-

do contribuye a disminuir la expresión génica viral, probablemente a través de la inhibición de NF-kB.

75. (12431) ACTIVIDAD DE ADENOSINA DEAMINASA(ADA) EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS (TBC) PLEURAL Y MENÍNGEA. CARACCILO, BEATRIZ; KEMPF, NORA; MUZIETTI, SANDRA; HOFFMAN, MARTA(1); NEGRI, GUSTAVO

Departamento de Bioquímica Clínica-Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA-Hospital de Clínicas (1) Hospital Tornú

La ADA es una enzima clave en el metabolismo de los nucleótidos purínicos. Participa principalmente en la proliferación y diferenciación de los linfocitos, sobre todo en los de estirpe T y en la maduración de monocito a macrófago. La actividad de ADA está aumentada en TBC y en enfermedades donde está involucrada la inmunidad celular. Nuestro objetivo fue determinar el valor clínico de la medición de ADA en pacientes con TBC pleural y meníngea, establecer los valores de corte (VC) y evaluar sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (vpp) y valor predictivo negativo (vpn). El estudio se realizó a doble ciego que consistió en medir ADA por el método Giusti y Galanti y el cultivo para el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis* (MT) según Borda Bossana y/o anatomía patológica característica de TBC; considerando a éstos últimos como métodos de referencia. Se analizaron 83 líquidos pleurales (LP) y 46 líquidos cefalorraquídeos (LCR). Los valores de S, E, vpp y vpn fueron evaluados por la prueba de McNemar y los VC fueron calculados por curvas ROC, el VC fue definido como el punto donde se obtiene máxima eficiencia. De los 83 LP, 73 tuvieron cultivo negativo para MT, 9 fueron positivos y en un caso se diagnosticó por anatomía patológica. El VC fue 52 UI/l, la S fue del 80 % con un intervalo de confianza (IC) de 44-98, la E fue del 100% con un IC 95-100 y vpp, vpn y eficiencia fueron de 100%, 97% y 98% respectivamente. El vpn fue de 97% ya que de los 9 cultivos positivos, 2 tuvieron valores de ADA inferiores a 52 UI/l. De los 46 LCR 5 tuvieron cultivo positivo para MT. El VC fue de 8,5 UI/l con una S del 100%, el IC fue de 48-100, con una E de 100%, el IC 91-100; el vpp, vpn y eficiencia fueron del 100% en todos los casos. El presente estudio muestra que la medición de ADA en LP y en LCR resulta útil como screening para descartar TBC pleural y meníngea por su elevada E con un IC estrecho, es una determinación simple, no invasiva y de bajo costo, cuyo resultado debe ser evaluado en el contexto clínico.

76. (12592) ACTIVIDAD BIOLÓGICA DIFERENCIAL DE VARIANTES DE LACTOFERRINA DE LECHE Y CALOSTRO BOVINO. CHANETON, LUCIANO (1); PÉREZ SÁEZ, JUAN M (1); CHÁVEZ, JAVIER (2); BUSSMANN, LEONARDO (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)- CONICET, CONICET 2: Laboratorio de Mastitis y Calidad de la Leche

La lactoferrina (LF) es una proteína de 80 KD presente en leche y otros fluidos biológicos de los mamíferos. Posee actividad bacteriostática, que depende de su capacidad de secuestrar Fe y bactericida al parecer independiente de este metal. Se cree que la LF bovina (LFB) participa en la respuesta innata contra infecciones mamarias pese a que la susceptibilidad a esta proteína varía altamente entre especies bacterianas. Se conocen dos variantes de LFB, LFBa y LFBb. En este trabajo se analizó la acción antimicrobiana de LFBa y LFBb obtenidas de calostro y leche sobre un aislamiento bacteriano causante de mastitis en nuestro país. Para esto se purificaron fracciones de LFBa y LFBb de leche y calostro bovino y se analizó su actividad antibacteriana sobre una cepa local de *Staphylococcus aureus* productora de mastitis. Los análisis de inhibición de crecimiento demostraron una mayor actividad antibacteriana de LFBa proveniente de calostro ($98,4 \pm 0,3\%$ de inhibición) que de LFBb del mismo origen ($84 \pm 5\%$ de inhibición) $p < 0,05$. Además LFBa de calostro fue

significativamente más potente como antibacteriana que las variantes aisladas de leche, que inhibieron $34 \pm 13\%$ (LFBa) y $33 \pm 11\%$ (LFBb); $p < 0.05$. Posteriores ensayos de recuento demuestran una marcada acción bactericida de LFBa de calostro (90% de actividad) por lo que las diferencias entre la efectividad antibacteriana de las distintas fracciones analizadas no deberían atribuirse a variaciones en los niveles de saturación de Fe. Esta hipótesis fue confirmada al determinarse que las LFBas, tanto de calostro como de leche, poseen idéntico grado de saturación de Fe (15,2% y 15,8%). Estos resultados muestran diferente actividad biológica de las variantes a y b de LFB de calostro. Además, se observa una mayor actividad en las LFBs provenientes de calostro que de leche. Dado que esta diferencia no se debe a distinto grado de saturación de Fe, es posible que diversos arreglos estructurales sean los responsables de la variabilidad observada.

77. (12611) DIVERSIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, GENOTIPO 1B EN ARGENTINA. POSIBLE VALOR PRONÓSTICO DE LA REGIÓN ISDR. DI LELLO, FEDERICO; BOUZAS, BELÉN (1); FERNANDEZ, SILVINA (1); FAINBOIM, HUGO (1); GARCIA, GABRIEL; CAMPOS, RODOLFO.

Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A. (1) Hospital Muñiz.

El virus de la hepatitis C infecta a más de 170 millones de personas en el mundo. El 85% de las infecciones se tornan crónicas y de éstas un 20-30% progresan a cirrosis y hepatocarcinoma. Para el genotipo 1b, que es el de mayor prevalencia en Argentina, la respuesta al tratamiento, interferón (IFN) o su combinación con Ribavirina, es de tan solo el 40-50%. Existen varias regiones relacionadas con la respuesta al tratamiento de las cuales, la más estudiada es una región dentro de NS5A, conocida como región determinante de la sensibilidad al IFN (ISDR). En nuestro estudio se analizó la secuencia de NS5A de 10 pacientes genotipo 1b respondedores (R) y de 8 no respondedores (NR) para analizar la presencia de marcadores de respuesta al tratamiento y su distribución filogenética. De los 10 pacientes R, 9 presentaron cambios en los amino ácidos TH2217-8; 7 de ellos por AC, 1 por AR y 1 por AY. Por otro lado la sustitución, TH2217-8AC, solo se encontró en 2 de los 8 NR. El cálculo del odd ratio indicó que la dupla AC confiere al paciente portador una probabilidad 7 veces mayor de responder al tratamiento respecto del que no la posee. Cuando se consideró la presencia de A2217 la probabilidad de responder resultó 27 veces mayor. En el análisis filogenético 15 de las 18 secuencias analizadas se agruparon en tres clusters. El más numeroso incluyó 9 genomas, de los cuales 7 eran R (6 AC y 1 AR) y 2 NR (AC). Los dos clusters restantes estaban compuestos por 6 genomas de pacientes NR con las duplas TK, TN, TS y 3 TR. Las 3 muestras R no agrupadas contenían AC, AY y TH. Estos resultados sugieren que la presencia de la dupla AC en las posiciones 2217-8 de NS5A del genotipo 1b, tendría un importante valor pronóstico de respuesta al tratamiento. Además, la distribución filogenética de la presencia de AC y su elevada prevalencia en nuestras muestras sugieren una importante participación en el efecto fundador de la infección por genotipo 1b en Argentina.

78. (12748) PREVALENCIA DE STEC (SHIGA TOXIN ESCHERICHIA COLI) EN AISLMIENTOS OBTENIDOS DE BOVINOS DESTINADOS AL CONSUMO DE CARNE EN MENDOZA. OROZCO GARRIDO, JUAN HÉCTOR ADOLFO; PIZARRO, MARCELA; DEGARBO, ESTELA (1); ORTIZ, A M; RÜTTLER, MARIA ELENA

Área de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de (1)Área de Microbiología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo.

Existen cepas patógenas de E. coli que causan diarrea entre ellas se encuentra EHEC (E. coli enterohemorrágica) que además

se asocia con Síndrome Urémico Hemolítico. Entre los factores de virulencia de EHEC se destacan las toxinas Shiga (Stx) y el gen eaeA. Objetivos: Investigar la prevalencia de STEC (shiga-toxin producing -E. coli) en bovinos sanos recién faenados y determinar su transmisión a la carne durante el faenamiento. Metodología: Se tomó una muestra con hisopo del colon de cada animal y además se obtuvieron muestras de las carcasas. Los hisopos se introdujeron en medio de transporte siendo procesados inmediatamente. Las colonias bacterianas crecieron en agar Mac Conkey 24 h a 37°C. Una alícuota fue inoculada en caldo Casoy, incubada 18h a 37°C y procesada para la extracción de DNA. Los aislamientos con sospecha de ser E.coli fueron investigados por PCR para detectar las secuencias genéticas de stx1, stx2 y eae. A partir de los resultados obtenidos por PCR se realizó el reislamiento de colonias y las pruebas bioquímicas. Resultados: El 22% de los animales fueron portadores de cepas STEC. El gen eae se encontró en el 19% de los animales estudiados. Muestras de carcasas: en el 9% de los animales se presentó algún gen de virulencia: 2% Stx2, 2% eae y 5% Stx1/Stx2. Conclusiones: El 20% de los animales resultaron portadores de algún gen de virulencia de STEC. Este hallazgo coincide con el de otras regiones de nuestro país. El gen eae se encontró en 16 muestras, de las cuales cuatro presentaron además los genes de una o ambas toxinas. El 9% de las muestras obtenidas de las carcasas presentaron algún gen de virulencia. Esto demuestra que existe contaminación en alguna instancia del proceso de faenamiento y que las bacterias se mantienen viables en la cámara frigorífica. Se elaboraron recomendaciones sobre medidas preventivas tendientes a disminuir el riesgo de transmisión de estos agentes patógenos.

INMUNOLOGIA

79. (12138) LA BILIRRUBINA NO CONJUGADA (BNC) INHIBE LA UNIÓN DEL C1Q A ANTICUERPOS (AC) DIRIGIDOS CONTRA LA MEMBRANA DEL HEPATOCITO. BASIGLIO, CECILIA (1,2); PELUSA, FABIÁN (2); ARRIAGA, SANDRA (2); ALMARÁ, ADRIANA (2,3); ROMA, MARCELO (1); MOTTINO, ALDO (1).

(1) IFISE-CONICET, Area Bioquímica Clínica, Fac. Cs. Bioq. y Farm., UNR. (2) Área Bioquímica Clínica (3) CIUNR. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

En un estudio previo se demostró que BNC inhibe la lisis hepatocelular inducida por Ac y mediada por complemento (C), utilizando un antisuero obtenido por inoculación de conejos con membranas de hepatocitos de rata (MHR) y suero de rata como fuente de C. El objetivo del presente trabajo fue establecer si la acción inhibitoria del pigmento se ejerce sobre el subcomponente C1q. En una primera etapa, se purificó el Ac por precipitación salina con sulfato de amonio y posterior cromatografía de afinidad en proteína A-sefarosa. La especificidad del Ac purificado se determinó por: a) inmunofluorescencia indirecta sobre improntas de hepatocitos de rata utilizando como revelador un antisuero anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína y b) ELISA en tiras de poliestireno sensibilizadas con MHR, utilizando como Ac secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. El efecto inhibitorio de BNC sobre C1q se comprobó mediante un ELISA, evaluando la capacidad del pigmento para inhibir la fijación de C1q al Ac purificado inmovilizado en tiras de poliestireno. Los % de inhibición obtenidos para BNC 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0 mg/dl (n=6) fueron respectivamente: 27 ± 6 ; 34 ± 5 ; 30 ± 2 ; $52 \pm 9^*$ y $67 \pm 3^*$ ($p < 0,05$ vs. BNC 1,0; 2,5 y 5,0 mg/dl. Para verificar la unión de BNC a C1q, se realizó un ensayo de dot-blot sobre membranas de polivinilidfluoruro, sembrando cantidades equimolares de C1q, albúmina sérica humana (ASH, control positivo) e IgG (control negativo). Después de la incubación con $[(^{14}C)]$ -BNC, las d.p.m. obtenidas (n=3) fueron respectivamente: $6828 \pm 323^*$; $5016 \pm 274^*$; $668 \pm 29^*$ ($p < 0,05$ vs. IgG. Se concluye que el pigmento interfiere, en forma dosis dependiente, con la interacción entre C1q y el Ac purificado. Este efecto se debería a la unión de BNC a dicho subcomponente del sistema del C.

80. (12143) EL BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DEL IGF-IR INDUCE UN FENOTIPO INMUNOGÉNICO MEDIADO POR LA INDUCCIÓN DE LA CHAPERONA HSP70 Y LA MOLÉCULA COESTIMULADORA CD86 EN CÁNCER DE MAMA. SALATINO, MARIANA; SCHILLACI, ROXANA; RIVAS, MARTÍN; PROIETTI, CECILIA; BÉGUELIN, WENDY; CARNEVALE, ROMINA; ROSEMBLIT, CINTHIA; CHARREAU, EDUARDO; ELIZALDE, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Previamente demostramos que la inmunización de ratones con células tumorales C4HD tratadas con el oligodeoxinucleótido fosfotiolado antisentido (AS[S]ODN) al IGF-IR inhibe el crecimiento del tumor mamario murino C4HD induciendo una respuesta T CD8(+) y la activación de la vía citolítica de Fas/FasL. En el presente trabajo estudiamos el mecanismo por el cual el bloqueo de la expresión del IGF-IR por el AS[S]ODN induce un fenotipo inmunogénico que activa al sistema inmune y promueve el rechazo tumoral. Nuestros resultados indicaron el tratamiento de células C4HD con 2µM del AS[S]ODN indujo la expresión (western blot) de la proteína chaperona de péptidos Hsp70 (54±9%); y de la molécula coestimuladora CD86 (citometría de flujo) con respecto al control (células C4HD + [S]ODN sentido, p<0.01). Estos resultados fueron confirmados utilizando el anticuerpo bloqueante del IGF-IR alfaiR3, demostrando que el efecto es independiente de la estrategia usada. Más aun, se observó una significativa inducción de Hsp70 y de CD86 por el tratamiento con el AS[S]ODN en células de cáncer de mama humanas T47D validando los resultados. Para confirmar que el aumento de inmunogenicidad inducido por el bloqueo del IGF-IR involucra a la Hsp70 y a CD86, se inmunizó a los ratones con células tratadas con el AS[S]ODN al IGF-IR pero inhibiendo la inducción de la expresión de Hsp70 y de CD86 utilizando ASODNs. Se observó una inhibición en el crecimiento del tumor C4HD del 60±9% en los ratones que habían sido inmunizados con células tratadas con el AS[S]ODN al IGF-IR (vs. control PBS). Sin embargo, el bloqueo simultáneo de la expresión de CD86, de Hsp70 y del IGF-IR anuló este efecto antitumoral. Estos resultados demuestran que tanto el CD86 como la Hsp70 son indispensables para la adquisición del fenotipo inmunogénico de las células C4HD que no expresan al IGF-IR.

81. (12222) MENOR RESPUESTA AL VIP EN EL ÚTERO DE RATONES NOD DURANTE UNA RESPUESTA TH1. ROCA, VALERIA; LAROCCA, LUCIANA; CALAFAT, MARIO; AISEMBERG, JULIETA; FRANCHI, ANA; PEREZ LEIROS, CLAUDIA

Depto Química Biológica FCEN-UBA CEFyBO-CONICET

Los ratones diabéticos no obesos (NOD) son un modelo espontáneo de respuesta Th1 similar al síndrome de Sjögren que permite estudiar eventos tempranos de la respuesta autoinmune y la disfunción secretoria. El VIP (péptido intestinal vasoactivo) participa en el cross-talk entre los sistemas nervioso e inmune, promueve la secreción exócrina, disminuye la contractilidad uterina y favorece un perfil Th2, factores necesarios para la implantación embrionaria. También fue descrito como un regulador del crecimiento fetal y el desarrollo embrionario. En trabajos previos describimos una disminución de la síntesis de óxido nítrico y la producción de PGE2 (dos mediadores importantes en procesos relacionados con la preñez) en el útero de ratones NOD durante el ciclo estral. El objetivo de este trabajo fue investigar la respuesta al VIP en el útero y el perfil de citoquinas producidas localmente, en el suero y en esplenocitos de ratones NOD. Se utilizaron hembras NOD de 16 semanas y BALB/c o NOD de 8 semanas como controles. Se determinó la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) en respuesta al VIP 100 nM en el útero usando L(U14C)arginina como sustrato, nitritos por Griess y ciclo-oxigenasa (COX) por RIA. La medición de citoquinas en extractos de útero, suero y sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, por ELISA. En ratones NOD el VIP no tuvo efecto sobre la NOS en útero (en proestro

NOS fmol/mg/30 min X±ES: BALB/c 283±25, NOD 55±10, P<0.05) y tampoco inhibió la síntesis de PGE2 como en los controles (en proestro COX % de inhibición X±ES: BALB/c 52±4, NOD 6±3, P<0.05). Se observó un aumento de citoquinas Th1 en suero (IL-12) y en esplenocitos (IFN gamma) con respecto a los ratones controles pero no en extractos del tejido uterino donde los valores de IL-10, IL-12 e IFN gamma fueron similares a los controles. La pérdida de la respuesta al VIP en el útero de ratones NOD coincide con un aumento de citoquinas Th1 en suero y esplenocitos que no se refleja localmente en extractos de tejido uterino.

82. (12225) EFECTO DIFERENCIAL DE VIP EN MACROFAGOS DE HEMBRAS NOD PREÑADAS Y NO PREÑADAS. LAROCCA, LUCIANA; ROCA, VALERIA; CALAFAT, MARIO; MESTRE, ANA; FRANCHI, ANA; PEREZ LEIROS, CLAUDIA

Depto Qca Biológica FCEN-UBA CEFyBO, CONICET.

El éxito de la gestación se asocia al establecimiento de una respuesta dominante de anticuerpos Th2 y una respuesta atenuada celular Th1. La progesterona (P) tiene un papel fundamental en el desarrollo de la preñez e induce la producción de sustancias inmunomoduladoras y citoquinas Th2. El VIP (péptido intestinal vasoactivo) es un neuro-inmunopéptido que por acción sobre macrófagos y linfocitos T polariza la respuesta hacia Th2 y reduce la producción de óxido nítrico. Se ha observado que los macrófagos presentes en sitios implantatorios reabsorbidos están preactivados para la producción de óxido nítrico. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) desarrollan una respuesta Th1 espontánea con características similares al síndrome de Sjögren. El objetivo del trabajo fue estudiar la producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratones NOD activados con LPS en presencia de dos agentes que promueven respuestas Th2 como la progesterona y el VIP. Se midió la producción de nitritos por Griess y citoquinas por ELISA. Los macrófagos de ratones NOD estimulados con LPS+IFN-gamma aumentaron la producción de nitritos y este efecto fue inhibido por VIP 100 nM (nitritos µM X±ES: LPS 9,4 ±1,8 LPS+VIP 2,5±1,1 P < 0,01). El efecto de VIP fue similar en ratones controles BALB/c, sin embargo en los NOD se observó una mayor producción de nitritos y una menor producción de IL-10 en respuesta al LPS que no varió con el estadio del ciclo estral. En contraste, en macrófagos de hembras NOD preñadas en el octavo día de gestación el aumento en la producción de nitritos estimulados con LPS+IFN-gamma no fue inhibido por VIP que tampoco tuvo efecto en presencia de P. Sin embargo la P sola redujo parcialmente la estimulación (nitritos µM X±ES: LPS 16,0 ±0,9; LPS+VIP 18,0±2,1 LPS+VIP+P 12,1 ± 2,7; LPS+P 4,8±1,6 P<0,05 vs LPS) Los resultados indican que los macrófagos de ratones NOD responden al VIP con inhibición de la producción de nitritos estimulada por LPS y que este efecto no se observa en células de hembras preñadas.

83. (12230) RESPUESTA DE LA CÉLULA BRONQUIOLAR DE CLARA EN UN PROCESO ALÉRGICO CRÓNICO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON BUDESONIDE. ROTH, FÉLIX; QUINTAR, AMADO; URIBE, ELISA; AOKI, AGUSTIN; MALDONADO, CRISTINA

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Las células bronquiolares de Clara (CC) están relacionadas con la defensa del epitelio en la inflamación alérgica a través de su producto secretorio, la proteína CC16, con actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria. En estudios previos determinamos que una exposición corta a un aeroalergeno produce hipersecreción de CC16 en un fenotipo mucosecretor. En este trabajo intentamos reproducir las condiciones del paciente asmático a fin de evaluar las consecuencias de exponer crónicamente las CC a una injuria alérgica. Ratones BALB/c se sensibilizaron con ovoalbúmina (OVA) por vía i.p. (días 0 y 14) y fueron expuestos por vía inhalatoria a OVA (días 24 al 54) (grupo alérgico); el grupo bode consistió en el tratamiento de

un grupo alérgico con aerosol de budesonida por 7 días; en el grupo control se reemplazó OVA por solución salina. Se tomaron muestras de pulmón para el análisis morfológico en bronquiolos, y detección de FGF-2, CC16 y Muc5Ac por western blot e inmunocitoquímica. En el grupo alérgico, se observó heterogeneidad morfológica, ya que coexistieron células hipertrofiadas de gránulos secretorios claros con CC de aspecto normal, pero signos de sufrimiento celular. Los gránulos de las células hipertrofiadas fueron positivos para mucina y negativos para CC16. Los niveles de la proteína CC16 descendieron respecto al control ($p < 0.05$); FGF-2, un marcador de remodelación, y el número de eosinófilos en LBA incrementaron significativamente. En el tratamiento con budesonida sólo se detectaron CC de aspecto semejante al control, con niveles de CC16 similares a los normales. Los marcadores de inflamación evaluados, FGF-2 y el número de eosinófilos, disminuyeron respecto al grupo alérgico. La persistencia de la inflamación en las vías aéreas produce severos cambios en las CC que le impiden aportar CC16. El tratamiento con budesonide permite a las CC recuperar su funcionalidad y además logra contrarrestar los cambios morfológicos, al disminuir los niveles de FGF-2.

84. (12342) EFECTO DEL METOTREXATO SOBRE CÉLULAS B INFECTADAS CON EL VIRUS EPSTEIN-BARR. PEREZ, GR(1); LUQUITA, A(2,4); SVETAZ, MJ(3); VOLPINTESTA, R(2); URLI, L(2); PALATNIK, S(2); TABORDA, M(1); GIRI, AA(1); RASIA, M(2,4)

(1) *Area Virología FCByF UNR*; (2) *Cat. Biofísica. FCs Med UNR*; (3) *Area Inmunidad Celular FCByF UNR*; (4) *CIUNR*.

El Metotrexate (MTX) es un antimetabolito usado a bajas concentraciones séricas ($[MTX]_s = 0-1 \mu M$) en el tratamiento de la Artritis Reumatoidea (AR). Desde hace años, se sospecha del Virus Epstein-Barr (VEB) como factor desencadenante de la AR y de contribuir en su patogénesis. Anteriormente reportamos que los títulos de Anticuerpos (Acs) a-VEB se asocian al grado de actividad (GA) de AR, sugiriendo la contribución del VEB en los mecanismos de autoinmunidad asociados a AR. OBJETIVOS: Evaluar si MTX provoca inducción del VEB latente en células B in vitro. Relacionar los títulos de Acs a-VEB con el GA de AR en pacientes tratados con MTX. MATERIALES Y MÉTODOS: En los estudios in vitro, se usaron células P3HR1 (células B infectadas con VEB en latencia), y $[MTX]_s = 0-1 \mu M$. Se realizaron ensayos de citotoxicidad con colorantes de exclusión, apoptosis por tinción con Hoechst 33258 e inducción viral (detección de proteínas del ciclo replicativo viral) por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Se determinaron en 14 pacientes con AR los títulos de Acs a-VEB por IFI y el GA por DAS28-4. RESULTADOS: En los estudios in vitro, se observó un %citotoxicidad específica $< 30\%$, un % apoptosis específica $< 30\%$ y un %inducción viral específica $< 8\%$. Estos resultados indican que MTX no induciría reactivación del VEB por acción directa. En estudios in vivo (mediana/IC95%) DAS28-4[[sinMTX]]: 7,11/4,60-8,08; DAS28-4[[conMTX]]: 5,40/4,21-7,10 ($p < 0,0000$ vs controles); Acs a-VEB[[sinMTX]]: 960/196-1280; Acs a-VEB[[conMTX]]: 400/80-975 ($p < 0,0000$ vs controles); Coeficiente de Spearman (CS) ($r[[s]]$) entre DAS28-4[[sinMTX]] y Acs a-VEB[[sinMTX]]: 0,30 ($p > 0,05$); CS entre DAS28-4[[conMTX]] y Acs a-VEB[[conMTX]]: 0,45 ($p > 0,05$). Los valores obtenidos con el CS indicarían que no existiría relación entre el título de Acs a-VEB y la dosis de tratamiento de MTX en pacientes AR. Estos hallazgos permitirían sugerir que el aumento del título de Acs a-VEB en pacientes con AR es independiente del uso de MTX.

85. (12388) MARCADOR PLASMÁTICO TEMPRANO DE EFERMEDAD REUMÁTICA Y SU POSIBLE TRATAMIENTO. CAMPANA, VILMA; MOYA, MÓNICA; SIMES, JUAN; REINOSO, CLAUDIA; GAVOTTO, ANTONIO; PALMA, JOSÉ.

Cátedra de Física Biomédica - Facultad de Ciencias Médicas - UNC

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto terapéutico del láser de baja potencia en un modelo de artritis ex-

perimental en ratas, a través de un marcador inflamatorio temprano, L-citulina (coproducto del óxido nítrico). En un grupo I se inyectaron 2 mg/día/rata de hidroxipatita en ambas articulaciones de los miembros posteriores durante 3 días consecutivos y en otro grupo II, 8 inducciones durante 3 semanas en días alternados. Otros dos grupos con artritis inducida (como el I y el II) fueron tratados con láser de He-Ne de 7 mW diariamente sobre las articulaciones afectadas a las 24, 48 y 72 hs en el grupo III y en el IV se aplicó durante una semana diariamente 8J/cm(2). La determinación de citulina se realizó por espectrofotometría. Se analizaron los resultados según el Test de Fisher y consideró diferencia significativa $p < 0.05$. Existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre los niveles de L-citulina (mM) de los grupos con artritis inducida en 3 días (5.76 ± 0.10) y en 3 semanas (5.72 ± 0.20) comparándolos con el control (3.58 ± 0.17), con el de artritis inducida en 3 días y tratado con láser (3.76 ± 0.20) y con el grupo con artritis inducida en 3 semanas y tratado con láser (3.44 ± 0.14). No existe diferencia entre el grupo control y los dos grupos con artritis y tratados. Se incrementaron los niveles de L-citulina en el modelo de artritis experimental y desciende a valores normales luego del tratamiento con láser. En la artritis se produce una activación de mecanismos inflamatorios, la búsqueda de parámetros inflamatorios precoces como L-citulina, ayudaría por un lado a la detección precoz del episodio agudo y por otro lado como método de valoración para estrategias terapéuticas como el láser de baja potencia, utilizado por su efecto antiinflamatorio y su acción analgésica, sin provocar los conocidos efectos adversos que generan los antiinflamatorios no esteroideos.

86. (12480) RESPUESTA INMUNOLÓGICA DURANTE LA PROGRESIÓN DEL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO LP07. DIAMANT, MIRIAM; STILLITANI, ISABEL; RODRIGUEZ, LORENA; KLEIN, SLOBODANKA

Dpto. Bioterrio y Cáncer Experimental. Área Investigación, IOAH Roffo, UBA.

Durante el desarrollo tumoral las respuestas del sistema inmune son moduladas por el tumor, y las interacciones con el medio ambiente en que se encuentra. En este trabajo evaluamos algunas respuestas inmunes específicas e inespecíficas durante el desarrollo del tumor LP07 de ratones BALB/c a los 20 días de portación. Determinamos: a) La respuesta de proliferación a Con A ($4 \mu g/mL$), medida por MTS, de esplenocitos de portadores de tumor LP07 (PLP07), cuyo índice fue 1.35 ± 0.02 , similar al de LE de ratón normal: 1.18 ± 0.03 . b) La citotoxicidad específica in vitro de linfocitos esplénicos (LE) a células LP07 (100:1), medida por MTS, fue $63 \pm 5\%$ y LE normales $33.5 \pm 5\%$ ($p = 0.0001$). c) Los linfocitos T circulantes de PLP07 rechazaron un tumor de vejiga alogeico MB49 de C57/Bl6, en el 100% de los animales; mientras que el tumor creció en el 100% de los ratones C57/Bl6. d) La activación in vivo de macrófagos (Mfg) por LPS ($100 \mu g$ ip) en PLP07, provocó un descenso del 9% del peso corporal y el 50% de los animales normales murieron a las 48 hs. Solo el 11% de los PLP07 murieron y con igual descenso del peso corporal, que recuperaron en los 6 ds posteriores y se observó una detención del crecimiento tumoral ($p = 0.03$ vs control). e) La producción in vitro de ON por Mfg peritoneales de PLP07, medido por reactivo de Griess, fue 50% menor con respecto a los Mfg normales. El agregado de LPS ($50 \mu g/ml$) e IFN γ ($10 U/ul$) indujo una mayor producción de ON ($78 \mu M \pm 1.3$) por los Mfg de PLP07. Los linfocitos y Mfg del PLP07, pueden desarrollar respuestas específicas e inespecíficas durante la portación del tumor. Es posible que los Mfg de PLP07 estén inhibidos en su producción de ON y en su capacidad de detener el crecimiento del tumor. El desarrollo tumoral podría inducir un desbalance en la activación de los Mfg y la consiguiente falta de activación de los linfocitos T in situ. Las respuestas sistémicas pueden verse anuladas en el microambiente tumoral que debe ser considerado como blanco para nuevas inmunoterapias.

87. (12490) PARTICIPACIÓN DE IL-6 EN LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES INDUCIDAS POR ESTRÉS CRÓNICO. SILBERMAN, DAFNE M (1); CREMASCHI, GRACIELA A (1); BOSCA, LISARDO (2); GENARO, ANA M (1)

CEFYBO-CONICET (2) Instituto de Bioquímica, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid.

El estrés ha sido clásicamente asociado con la alteración de del estado homeostático del organismo incluyendo cambios en el comportamiento y en las funciones endocrinas e inmunes. Estados psicopatológicos pueden estar acompañados de una producción alteradas de citoquinas. En particular IFN-gamma, IL-6 e IL-2 han sido involucradas en desórdenes psiquiátricos. Hemos demostrado previamente una alteración de la respuesta inmune en un modelo de depresión inducido por exposición a estrés crónico moderado (CMS). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la correlación entre la alteración conductual y la producción de citoquinas en este modelo. Evaluamos el consumo de sucrosa, la actividad motora por el test de campo abierto y la capacidad de aprendizaje y memoria por el test de evitación pasiva. Además, se determinó por radioinmunoensayo la producción de IL-2, IL-6 e IFN-gamma en sobrenadantes de linfocitos y macrófagos cultivados en condiciones basales (B) y estimulados mitógenicamente (E). Observamos que en ratones de la cepa BALB/c expuestos a CMS por 6 semanas disminuyó el consumo de sucrosa, aumentaron la actividad ambulatoria y los movimiento rápidos (n=5, p<0.05). También se observó una disminución en la capacidad de aprendizaje y memoria (testeo, tiempo (seg) N=312, CMS= 82; p<0.05). Los niveles de IL-6 fueron significativamente mayores en sobrenadantes de linfocitos provenientes de animales CMS respecto de los controles (N) (pg/ml; B, N= 72±28; CMS= 2015±33, E, N= 148±13; CMS= 3035±251, p<0.05). No se encontraron diferencias en la producción de IL-2 e IFN-gamma en sobrenadantes de linfocitos o macrófagos. Finalmente, la administración periférica de IL-6 (200 ng/ul) en ratones no expuestos a CMS indujo una alteración del comportamiento similar a la observada en ratones CMS. Estos resultados sugieren que el estrés crónico induce una alteración de la respuesta inmune que resulta en la sobreproducción de IL-6 que a su vez participaría en los trastornos de comportamiento inducidos por estrés.

88. (12530) INMUNIDAD INNATA EN LA GLÁNDULA PROSTÁTICA: EVIDENCIAS DE UN TRASCENDENTE ROL EPITELIAL EN LA RESPUESTA FRENTE A BACTERIAS. QUINTAR, AMADO; DOLL, ANDREAS; ROTH, FELIX; AOKI, AGUSTÍN; MALDONADO, CRISTINA

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad Cs Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. ARGENTINA. Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg. GERMANY

Los epitelios expuestos a patógenos comparten con el sistema inmune innato la síntesis de moléculas cuya expresión es modulada por injurias. Entre ellas, los receptores Toll-like (TLRs), reconocen bacterias y estimulan la síntesis de citoquinas inflamatorias; los péptidos catiónicos actúan como antimicrobianos, mientras que galectinas y secretoglobinas tienen funciones inmunomoduladoras y anti-inflamatorias. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de moléculas del sistema inmune innato en la próstata, principal blanco de infecciones genito-urinarias. A tal fin se investigó la presencia de TLR4, TNF α , IL1 β , IL6, galectina1(gal1), Prostatic Binding Protein(PBP) y Uteroglobina, ambas de la familia de las secretoglobinas, en próstata humana y su modulación por la inflamación en un modelo de prostatitis en rata. Muestras de prostatas humanas hiperplásicas, obtenidas en cirugías, fueron incluidas en parafina para el análisis inmunocitoquímico (ICQ) de las moléculas en estudio. Además, ratas Wistar fueron desafiadas con una solución de E. coli (10⁸) (UFC) inoculada directamente en la próstata ventral. Se obtuvieron muestras de próstata a 24, 48 y 72 horas posteriores al de-

safío y se procesaron para su análisis morfológico y determinar la expresión de proteínas mediante ICQ y western blot. Mediante ICQ se determinó que el epitelio prostático de la rata expresa en condiciones normales TLR4 y PBP y que ambas se up-regulan en condiciones inflamatorias (ANOVA p<0.05). Además, la inflamación induce síntesis de novo de TNF α , IL6 y gal1. En correlación con estos hallazgos, en biopsias humanas, se halló intensa inmunomarcación a nivel epitelial para TLR4, TNF α , gal-1 y uteroglobina. En condiciones normales, el epitelio prostático está preparado para reconocer bacterias; asimismo, es capaz de activarse por patógenos, sintetizando citoquinas e iniciar la respuesta inmune. La expresión de proteínas antiinflamatorias sería un intento de controlar la inflamación.

89. (12668) EFECTO DE LA AMINOGUANIDINA (AG) SOBRE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN ANIMALES TOLERIZADOS CON OVA POR VIA ORAL FRANCO, L.; FELEDI, C.; BENEDETTI, R.; MASSOUH, E.

Lab. Inmunoquímica. Dpto. Qca. Biol. FCEyN. UBA

La AG es un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa NOS-2. En nuestro laboratorio hemos estudiado la evolución de distintos parámetros del sistema inmune, luego de que la administración oral de un antígeno (Ag) proteico produjera un estado de tolerancia inmunológica. En este trabajo estudiamos si la AG afectaba los niveles de anticuerpo (Ac) específico de ratas tolerizadas, analizando así la acción del óxido nítrico (NO) sobre este efecto. Ratas Wistar tolerizadas con OVA por vía oral fueron desafiadas 7 días después por vía subcutánea (sc) (grupo 1). A otro grupo tolerizado igual, se le administró por vía ip 40 mg de AG en 5 dosis consecutivas durante la tolerización (grupo 2). Los controles recibieron sólo el desafío sc (grupo 3). A distintos tiempos posdesafío se dosaron Ac IgG anti OVA por ELISA. El título de Ac específicos 42 días post-desafío fue: para el grupo 1: 17600± 8700; para el grupo 2: 40000± 24000 y para el grupo 3: 115000± 28600, siendo 3 vs 1 p=0.0000846 y 3 vs 2 p=0.00199. No se encontraron diferencias significativas a nivel 0.05 entre los grupos 1 y 2 pero sí las hubo a nivel 0.1, (1 vs 2 p=0.085). Se midió el efecto de distintas dosis ip de AG sobre la respuesta de Ac específicos anti-OVA en una inmunización sc. Se usaron 5 dosis de AG de 10, 20 y 40 mg por dosis (grupos b, c y d). Las ratas control (grupo a) recibieron solución salina en la misma forma y periodicidad. Los títulos de Ac anti-OVA a 31 días post-desafío fueron: grupo a, 41600± 21400; grupo b, 35200± 17500; grupo c, 29600± 22500 y grupo d, 10400± 5300; siendo a vs d, p=0.013 y b vs d, p=0.016. Estos resultados preliminares nos dicen que la AG así administrada, a dosis mayores de 20 mg tendría efecto depresor sobre la respuesta sistémica de Ac séricos. Además la AG posiblemente actuaría inhibiendo la tolerancia inducida por vía oral, lo que indicaría una acción del NO sobre la misma.

90. (12806) NUEVOS ROLES DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL MAESTRO SPO0A EN LA ADHERENCIA DE LA BACTERIA PROBIÓTICA BACILLUS SUBTILIS NATTO VERSUS STAPHYLOCOCCUS AUREUS PATÓGENO. ROVETTO, ADRIAN; SALVARREY, MARCELA; SABALL, ESTER; GRAU, ROBERTO

Departamento de Microbiología, FCByF, UNR-IBR-CONICET.

Bacillus subtilis es una bacteria formadora de endoesporas que es capaz de ensamblar comunidades multicelulares (biofilms, discos de swarming y cuerpos fructíferos) que despliegan un alto grado de organización espaciotemporal. Estas propiedades fenotípicas se encuentran ampliamente relacionadas con el efecto probiótico que la bacteria ejerce sobre sus hospedadores, y están presentes principalmente en cepas salvajes y no en cepas domesticadas manipuladas diariamente en el laboratorio. En este trabajo se estudiaron las propiedades de multicelularidad y adhesión de Bacillus subtilis natto, una cepa utilizada para la fabricación de "natto", una popular comida oriental de alto valor nutri-

tivo. Una cepa mutante de natto en el gen *spo0A* (el cual codifica para un factor transcripcional (FT) maestro de inicio de esporulación) fue deficiente en el desarrollo de multicelularidad, mientras que un mutante en el gen *sigF* (el cual no es apto para esporular pero produce *Spo0A*) se asemejó al fenotipo salvaje. También se estudiaron otros dos mutantes en los genes *abrB* y *sinR*, cuyos productos se encuentran relacionados con el mecanismo regulatorio del FT *Spo0A*. Formas vegetativas y esporuladas de la cepa salvaje y cepas mutantes en los genes *sigF*, *abrB* y *sinR* pero no en *spo0A* se adhirieron fuertemente a proteínas de matriz extracelular como fibronectina y colágeno, con una constante de disociación aparente (K_d) de $(2,9 \pm 0,2) \times 10^{-10}$ M para la cepa salvaje. Por otra parte, natto fue capaz de inhibir competitivamente la adherencia a fibronectina de *Staphylococcus aureus*, un microorganismo patógeno que utiliza la adherencia a fibronectina como principal mecanismo de colonización, el cual mostró adherirse a fibronectina con una afinidad menor que natto: $K_d = (1,0 \pm 0,1) \times 10^{-9}$ M. Estos resultados ponen en evidencia novedosos roles atribuibles a *Spo0A* y fortalecen la idea de la utilización de esporas y formas vegetativas de natto como probióticos.

NEUROCIENCIAS A

91. (11958) AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN UN MODELO DE DEPRESIÓN EN RATAS. CASSANO, PAOLA; BURGOS, VALERIA; HIDALGO, ALEJANDRA; FARES TAIE, LUCAS; ADRIS, SORAYA; ARGIBAY, PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires

Los desórdenes depresivos son consecuencia de factores ambientales, principalmente el estrés y una predisposición genética. Entre otros mecanismos se ha relacionado a los procesos inflamatorios con la enfermedad depresiva, observándose activación del sistema inmune. Pero no se ha descrito el rol que la síntesis de prostaglandinas podría tener en la misma. Nuestro objetivo fue investigar la expresión de COX-2 en el cerebro de ratas adultas sometidas a un modelo farmacológico de depresión. Se inyectó Clomipramina en ratas neonatos Wistar desde el día 2 al 17. Se realizaron los siguientes tests conductuales para validar el modelo de depresión: Porsolt Forced Swim Test, Elevated Plus Maze, Water Morris Test, consumo de sacarosa y apareamiento. Como validación fisiológica del modelo se midieron niveles de BDNF, el cual se encuentra disminuido en procesos depresivos (asociado esto claramente a una disminución de la neurogénesis). Se realizó la cuantificación del gen y de la proteína COX-2 a través de Real Time PCR e inmunohistoquímica respectivamente. Los animales tratados mostraron cambios significativos relacionados al estado de depresión. Los niveles de COX-2 fueron mayores en los animales tratados. A través de métodos de inmunohistoquímica se observaron diferencias significativas en hipocampo ($Z = 5.29$, $p < 0.05$) y en corteza entorrinal ($Z = 9.67$, $p < 0.05$) de los animales tratados. Por RT-PCR se observaron niveles mayores del gen en los hipocampos ($Z = 5.29$, $p < 0.05$) y corteza entorrinal ($Z = 9.67$, $p < 0.05$) de los animales tratados. Los niveles de BDNF fueron menores en los animales tratados (0.854 ± 0.071) que en los controles (0.979 ± 0.071). Los resultados obtenidos que relacionan COX-2 con un modelo de depresión ofrecen una interesante línea de investigación en relación a los procesos inflamatorios inespecíficos y la enfermedad depresiva. La fácil modulación de la síntesis de prostaglandinas a través de diversos fármacos podría ser de interés para el tratamiento de la depresión.

92. (12031) IMPLEMENTACIÓN DE UN MODELO FORMAL DE MEMORIA EPISODICA BASADO EN REDES NEURALES ARTIFICIALES. WEISZ, VICTORIA; ARGIBAY, PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental. Hospital Italiano de Buenos Aires.

Introducción: El rol que tendrían el hipocampo y demás estructuras del lóbulo temporal medial en la formación de memoria

episódica ha sido extensamente discutido en la literatura. Esta función implica la codificación y recuperación de eventos, conjugando información de índole multimodal. La simulación computacional de la función hipocampal permitiría explorar a futuro algunos de los mecanismos implicados en diversas alteraciones. Objetivos: Investigar el modelado de procesos cognitivos con redes neuronales artificiales. Implementar un modelo de formación de memoria episódica a partir de una teoría computacional. Materiales y Métodos: Se implementó sobre Object Pascal-Delphi una red neuronal artificial basada en un modelo teórico de circuitos hipocampales de plausibilidad biológica (E. T. Rolls, 1995). Se modelizaron la corteza entorrinal (CE), el giro dentado y las áreas CA3 y CA1. La red lleva a cabo asociación de patrones, y aprendizajes competitivo y autoasociativo. Resultados: A partir de la presentación de los distintos patrones o memorias, la red logró su codificación y posterior recuperación con eficacias variables, dependiendo del estímulo clave presentado y del número de patrones almacenados. Esta recuperación, medida en distintos grupos de neuronas, fue evaluada mediante la correlación (C) entre el estímulo de salida (evocado) y el almacenado. Se observó un menor desempeño con grados de carga mayores, encontrándose un límite crítico alrededor de los 60 patrones ($\alpha = 0.3$, según capacidad teórica), a partir del cual la información recuperada no es mayor a la presentada en el estímulo clave. Para cargas bajas ($\alpha < 0.15$), la recuperación fue máxima ($C[\text{salida}] = 0.92$) a partir de estímulos claves del 50% ($C[\text{entrada}] > 0.5$). Además, se encontró que el nº de sinapsis en CE-CA3 y CA1-CE limitan la capacidad de recuperación y la recuperación máxima, respectivamente. En conclusión, el modelo presentado logró la codificación y recuperación de eventos no asociados, representados como patrones binarios aleatorios en la corteza entorrinal.

93. (12055) VARIACIONES LINEALES Y DE SUPERFICIE RELACIONADAS CON LA EDAD EN IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA DEL CEREBRO. MERLO, ALICIA; GOMEZ, ELENA; ALBANESE, ALFONSO M.; MASCITTI, TOMAS; MIÑO, JORGE; SAUBIDET, GUSTAVO; CANCELA, MARCIAL; ALBANESE, EDUARDO

Facultad de Medicina. USAL Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Hospital Francés.

Es de interés disponer de valores normales por rango de edad de dimensiones de parámetros cerebrales para su comparación con los obtenidos de casos patológicos. El objetivo fue determinar en imágenes parasagitales de resonancia magnética (ipRM) del cerebro de sujetos femeninos, probables variaciones significativas de valores lineales y de superficie en función de la edad. Las mediciones se realizaron por tres investigadores simultáneamente mediante el programa Scion Image for Windows, en ipRM digitalizadas de ambos hemisferios equidistantes del plano sagital medio, de 64 sujetos femeninos diestros, sin enfermedades neurológicas ni psiquiátricas, de edad entre 17 y 84 años. Se trazaron las líneas *c* entre las comisuras blancas anterior y posterior, *h* resultante de la prolongación de *c* hasta su intersección con la imagen de los bordes anterior y posterior del cerebro. En el punto medio de *h* se trazó la perpendicular a hasta la imagen del borde superior de cerebro. Se midieron *c*, *h*, *a* y los bordes de la corteza cerebral entre el punto más anterior de *h* y el extremo superior de *a* (*c1*) y entre el extremo superior de *a* y el punto más posterior de *h* (*c2*) y las superficies (*s1* y *s2*) limitadas por dichas líneas. Los valores correlacionan (*r* de Pearson) negativamente con la edad. Son estadísticamente significativas en el hemisferio derecho las *r* entre edad y *a* (-0.38 $p < 0.01$), *c1* (-0.37 $p < 0.01$), *c2* (-0.31 $p < 0.02$) y *s2* (-0.30 $p < 0.05$) y en el izquierdo las *r* entre edad y *a* (-0.51 $p < 0.01$), *c1* (-0.46 $p < 0.01$), *s1* (-0.37 $p < 0.02$) y *s2* (-0.31 $p < 0.02$). Los valores, que también se agruparon por rangos de edad ($\text{media} \pm \text{ES}$), se procesaron por análisis de varianza. En ambos hemisferios cerebrales de sujetos femeninos, imágenes planas de resonancia magnética muestran, con el avance de la edad, variaciones lineales y de superficie que aportan recursos al estudio de modificaciones cuantitativas cerebrales con el envejecimiento.

- 94. (12060) DIFERENCIAS DE VARIACIONES RELACIONADAS CON LA EDAD DE LOS LOBULOS FRONTAL Y PARIETOOCIPITAL EN IMÁGENES DE RUTINA DE RESONANCIA MAGNETICA.** ALBANESE, ALFONSO M.; MERLO, ALICIA; GOMEZ, ELENA; MIÑO, JORGE; INGRATTA, ADRIANA; MASCITTI, TOMAS; SAUBIDET, GUSTAVO; CANCELA, MARCIAL; ALBANESE, EDUARDO

Facultad de Medicina. USAL Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Hospital Frances

Diferencias cuantitativas relacionadas con la edad en estudios de rutina de imágenes de resonancia magnética del cerebro son de interés para el diagnóstico clínico. El objetivo fue cuantificar probables cambios morfológicos con la edad en porciones dorsales de los lóbulos frontal (LF) y parietooccipital (LPO). En IRM de cada hemisferio cerebral de 56 casos femeninos diestros sin enfermedades neurológicas o psiquiátricas, de edades entre 19 y 84 años, se consideró la zona del cerebro dorsal a la línea que une la comisura blanca anterior con la posterior. Con vértice en la comisura blanca anterior se dividió la región en 18 ángulos de 10° cada uno. Se midieron simultáneamente por tres investigadores mediante el programa Scion Image for Windows las longitudes de los 19 segmentos correspondientes a los lados de los ángulos hasta sus intersecciones con el borde de la imagen del cerebro. Los primeros 14 segmentos corresponden al LF y los restantes al LPO. Los datos de cada hemisferio se procesaron estadísticamente (ANOVA) por rangos de edades: 19-40, 41-60 y 61-84 años. En el LF el grupo de 61-84 años muestra valores menores que el de 19-40 años. En el LF la suma (media ± ES en cm) de los valores de los segmentos para el grupo de 19-40, 41-60 y 61-84 años es para el hemisferio derecho de 94.51±0.78; 92.79±0.86; 90.06±0.92 y para el izquierdo 94.86±0.61; 92.26±0.91 y 89.96±0.86. La diferencia en ambos hemisferios entre el grupo de 19-40 y 61-84 años es significativa ($p < 0.01$ ANOVA). En el LPO no se observaron diferencias con el avance de la edad. Porciones dorsales del lóbulo frontal pero no del parietooccipital sufren cambios morfológicos cuantitativos estadísticamente significativos en sujetos femeninos con el avance de la edad. Estos hallazgos pueden ser de utilidad en relación con las funciones propias de cada región y de referencia en estudios clínicos.

- 95. (12066) MODIFICACIONES CON LA EDAD DE LA LOCALIZACION DE LAS CISURAS DE ROLANDO Y PARIETOOCIPITAL EN ESTUDIOS DE RUTINA DE RESONANCIA MAGNETICA.** ALBANESE, EDUARDO; MERLO, ALICIA; MIÑO, JORGE; GOMEZ, ELENA; INGRATTA, ADRIANA; MASCITTI, TOMAS; SAUBIDET, GUSTAVO; CANCELA, MARCIAL; ALBANESE, ALFONSO M.

Facultad de Medicina. USAL Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Hospital Francés.

Las cisuras de Rolando (sulcus centralis) y parietooccipital (sulcus parietooccipitalis), que limitan los lóbulos frontal, parietal y occipital, son referencias para localizar lesiones cerebrales. El objetivo fue demostrar posibles cambios de situación en función de la edad en estudios de rutina de resonancia magnética. En imágenes parasagitales de resonancia magnética (iPRM) de cada hemisferio cerebral de 56 casos femeninos diestros sin enfermedades neurológicas o psiquiátricas, de edades entre 19 y 84 años, mediante el programa Scion Image for Windows, se midieron simultáneamente por tres investigadores dos ángulos con vértice en la comisura blanca anterior y un lado compartido que pasaba por la comisura blanca posterior. El lado no compartido pasaba en uno de los ángulos (acR) por el borde dorsal de la cisura de Rolando y en el otro (acPO) por el borde dorsal de la cisura parietooccipital. En el hemisferio izquierdo ambos ángulos se modifican significativamente con la edad. Los valores en el grupo de 19-40 años y del grupo de 61-84 años son (media±ES) para el acR de 58.75±1.02° y 52.84±1.65° y para el acPO de

20.85±0.97° y 17.19±1.06°. Estas diferencias con la edad son significativas (respectivamente $p < 0.01$ y $p < 0.05$, ANOVA). En el hemisferio derecho ambos ángulos disminuyen aunque no significativamente. El grupo de 19-40 años y el grupo de 61-84 años muestran (media±ES) para el acR el valor de 56.65±1.84° y 54.83±1.01° y para el acPO 20.96±0.88° y 17.58±0.75°. Imágenes de resonancia magnética de rutina muestran que en el hemisferio izquierdo femenino las cisuras de Rolando y parietooccipital, que limitan los lóbulos frontal, parietal y occipital, por el avance de la edad modifican significativamente su relación con la línea que une a la comisura blanca anterior con la posterior indicando un cambio de posiciones relativas de estructuras cerebrales.

- 96. (12080) LA ALFA-MSH ATENUA LOS EFECTOS INFLAMATORIOS INDUCIDOS POR LPS Y CITOQUINAS EN ASTROSITOS.** CARUSO, CARLA MARIANA; DURAND, DANIELA; REY, RODOLFO; SEILICOVICH, ADRIANA; LASAGA, MERCEDES

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA

La hormona melanocito estimulante alfa (alfa-MSH) es un neuropéptido que posee acciones antiinflamatorias. Estudios previos de nuestro laboratorio indican que la administración i.c.v. de alfa-MSH disminuye la expresión hipotalámica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de la ciclooxigenasa inducible (COX-2) luego de la administración sistémica del lipopolisacárido bacteriano (LPS), a través de los receptores MC4. (Caruso y col, Neuroendocrinology 2004;79(5):278-86). Dado que los astrocitos hipotalámicos son productores de óxido nítrico (NO), es posible que la alfa-MSH esté actuando en forma directa sobre los astrocitos y que estas células gliales expresen el receptor MC4. En este trabajo examinamos el efecto de la alfa-MSH sobre la expresión génica de iNOS y la producción de NO inducidas por el tratamiento con LPS (1 µg/ml) + INF-g (50 ng/ml) durante 24 h en cultivos de astrocitos de rata. La combinación LPS + INF-g aumentó 3 veces la expresión génica de la iNOS en astrocitos. La alfa-MSH (5 µM) atenuó en un 50% este incremento. Además el tratamiento LPS + INF-g aumentó los niveles de nitritos (NO₂) liberados por los astrocitos, mientras que la alfa-MSH también disminuyó este efecto (Control: 5.18± 0.43, LPS+INF-g: 7.09± 0.37 $p < 0.001$, LPS+INF-g+alfa-MSH: 5.65± 0.34 µM NO₂). La alfa-MSH per se no produjo ningún efecto. Siendo los receptores MC3 y MC4 los más abundantes en el sistema nervioso central, investigamos la expresión de estos receptores en los astrocitos. Detectamos por RT-PCR expresión del receptor MC4 pero no del MC3 en estas células gliales. El tratamiento con LPS o con INF-g disminuyó la expresión del receptor MC4 respecto del control. Estos resultados muestran que la alfa-MSH ejerce una acción antiinflamatoria en astrocitos, atenuando los efectos del LPS y citoquinas. Además la presencia del receptor MC4 en estas células sugiere que este tipo de receptor estaría involucrado en este efecto de la alfa-MSH.

- 97. (12116) PARTICIPACIÓN DE CITOQUINAS NEUROPOYÉTICAS SOBRE LA LIBERACIÓN NEURONAL DE NORADRENALINA EN EL HIPOTÁLAMO DE RATA.** RODRIGUEZ FERMEPIN, MARTIN; BELTRÁN, ANDREA; GARBINI, PABLO; MINETTO, JULIA; TRINCHERO, MARIELA; FERNÁNDEZ, BELISARIO

Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

La familia de las citoquinas neuropoyéticas (CN) está formada por el Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF), el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), la Interleuquina 6 (IL-6) y la Cardiotrofina 1 (CT-1). Anteriormente demostramos la acción de estas CN sobre la captación neuronal de noradrenalina (NA). En el presente trabajo estudiamos los efectos de dichas CN sobre la liberación neuronal de NA en el hipotálamo anterior (HA) y posterior (HP)

de ratas Sprague Dawley macho de 250-300 g. Se estudió la liberación neuronal de $^3\text{H-NA}$ basal y estimulada por KCl. Ninguna de las CN estudiadas modificó la liberación basal de NA. Los resultados (expresados como la relación estímulo/basal) indican que la IL-6 100ng/ml aumentó la liberación estimulada de $^3\text{H-NA}$ solo en el HP a los 5 y a los 10 minutos ($2.46 \pm 0.28^*$ vs 2.35 ± 0.21 ; $2.99 \pm 0.28^*$ vs 2.44 ± 0.19 respectivamente * $p < 0.05$ vs control). Por otro lado, la CT-1 100ng/ml disminuyó la liberación de $^3\text{H-NA}$ en HP a los 5 y 10 minutos ($3.25^* \pm 0.27$ vs 4.47 ± 0.48 ; $3.48^* \pm 0.23$ vs 5.27 ± 0.52 respectivamente * $p < 0.05$ vs control) sin modificarla en el HA. Ni el LIF ni el CNTF modificaron la liberación de NA en las zonas estudiadas. Estos resultados demuestran que el efecto de estas CN sobre la liberación neuronal de NA se restringe al HP. Si bien los receptores para las CN comparten varios componentes del complejo receptor, la presencia de una cadena alfa en dicho complejo le confiere especificidad por una determinada CN. Por lo tanto, los efectos opuestos de la IL-6 y la CT-1 se explicarían por la activación de los receptores específicos para cada CN. Considerando resultados anteriores en los que comprobamos que IL-6 aumenta la captación de NA y CT-1 la disminuye, podemos concluir que estas CN modularían en forma aguda el metabolismo de la NA y la neurotransmisión noradrenérgica a nivel hipotalámico pero no así su disponibilidad sináptica para ejercer los efectos biológicos regulados por el hipotálamo.

98. (12127) OBTENCIÓN DE STEM CELLS MESENQUIMALES PARA DIFERENCIACIÓN NEURONAL A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA Y TEJIDO ADIPOSO. CARDOZO, JOHANA; CALLERO, FLORENCIA; DI RISIO, CATALINA; HIDALGO, ALEJANDRA; ARGIBAY, PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME) Hospital Italiano de Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN: El tejido adiposo (TA) y la médula ósea (MO) son derivados del mesodermo embrionario y contienen una población heterogénea de células, entre las que se encuentran las stem cells mesenquimales (MSCs), las cuales son multipotentes y presentan alta proliferación in vitro. Al ser consideradas posible fuente de varias estirpes celulares, podrían ser utilizadas para reparar daños funcionales. **Objetivo:** Aislar MSCs de MO y TA, inducir su diferenciación a células de fenotipo neuronal y comparar la eficacia de diferenciación. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se cultivaron muestras de MO y TA humanas en medio basal + SFB + EGF. Entre el 3° al 10° pasaje, se indujo su diferenciación hacia fenotipos neuronales con los siguientes factores: β -mercaptoetanol (BME), DMSO, butilato de hidroxianisola (BHA), ácido retinoico (RA), EGF y bFGF, en ausencia de SFB. La diferenciación se analizó por conteo de células con cambios morfológicos y por inmunocitoquímica. Anticuerpos utilizados: anti-*nestina* (progenitores neurales), anti-*NeuN* (neuronas maduras), anti-GFAP (glía), anti- β III tubulina (neuronas inmaduras), anti-CD90 (células mesenquimales) y anti-CD34 (progenitores hematopoyéticos). **RESULTADOS:** Previo a la diferenciación, las MSCs fueron CD34(-) y CD90(+) (61%). Las células diferenciadas a partir de MO fueron positivas para: *NeuN* (23%) y GFAP (20%); mientras que las diferenciadas a partir de TA: GFAP (24%) y β III tubulina (27%). En ambos casos, antes y después de la diferenciación, los cultivos fueron *nestina*(+) (100%). Se observaron evidentes cambios morfológicos consistentes con fenotipos neuronales. **CONCLUSIONES:** La diferenciación obtenida difiere en el tipo de marcación observada: a partir de MO las células tienen características de neuronas maduras, mientras que a partir de TA, presentan rasgos de neuronas inmaduras. Si esto se debe a una cronología distinta en la diferenciación o a características específicas de cada fuente de MSCs, será elucidado en futuros experimentos.

99. (12146) MEJORÍA DE LA CALIDAD DE VIDA Y DE LOS SÍNTOMAS NEGATIVOS EN PACIENTES ESQUIZOFRÉNICOS TRATADOS CON ANTIPICÓTICOS Y

REHABILITACIÓN PSICOSOCIAL. PALACIOS VALLEJOS, MARIA EUGENIA; RODRÍGUEZ (1) (2), JUANA; ZELASCHI (1) (2), NORBERTO; GAITÁN (1) (2), SERGIO; SILVESTRINI (3), PÍA; ZIEHER (4), LUIS MARÍA

(1) Facultad de Cs. Médicas UNLP (2) HIGAYC Dr. "A Korn" (3) Facultad de Veterinaria UNLP (4) Facultad de Medicina UBA

Hemos sugerido que la Rehabilitación psicosocial y cognitiva (RP) podría mejorar algunos parámetros clínicos como la Calidad de vida (CV) cuando se agrega al tratamiento antipsicótico (AP) en la esquizofrenia. **MÉTODO:** Se diseñó un estudio de 104 semanas; participaron 20 pacientes con esquizofrenia (DSM IV) tratados con antipsicóticos convencionales (APT)-ej: haloperidol (2-10 mg/d)- (n=10) y con antipsicóticos atípicos (APA)-ej: clozapina (200-600 mg/d)- (n=10). Cinco pacientes en cada grupo recibieron tratamiento combinado (RP + AP). Se formaron 4 grupos: grupo I: APT +RP; grupo II APA + RP; grupo III APT sin RP y grupo IV APA sin RP. Se realizaron dos evaluaciones: T0 (inicio del estudio) y T104s (final del estudio). Escalas: PANSS (síntomas positivos y negativos) y QLS (Calidad de Vida). Estadística: Se usó un test de Anova no paramétrico (Kruskall-Wallis) para detectar diferencias entre los grupos en T0 y T104 y un test de Wilcoxon para evaluar mejoría en T104. **RESULTADOS:** NO existió diferencia significativa de edades entre los grupos (H= 2.37; P=0.49) Calidad de vida: T0= los grupos II y IV APA muestran una mejor CV con relación a los grupos I y III APT (p=0.02). T104= los grupos II y IV APA mantuvieron la mejoría observada, además el grupo I (APT + RP) mostró una mejor performance (p=0.01). Síntomas negativos. El grupo I APT + RP mostró una mejoría similar que en la calidad de vida luego del tratamiento (Wilcoxon p=0.05). Los pacientes tratados con antipsicóticos atípicos muestran una mejor calidad de vida independientemente del agregado de otras intervenciones terapéuticas. Sugerimos que el agregado de un tratamiento no farmacológico podría también introducir una mejoría similar a la observada con los antipsicóticos atípicos, tanto sobre la CV como sobre los síntomas negativos en los pacientes tratados con antipsicóticos convencionales.

100. (12172) FALTA DE MEJORÍA EN EL FUNCIONAMIENTO NEUROCOGNITIVO EN PACIENTES ESQUIZOFRÉNICOS TRATADOS DURANTE 104 SEMANAS CON Y SIN REHABILITACIÓN PSICOSOCIAL. PALACIOS VALLEJOS, MARIA EUGENIA; RODRÍGUEZ (1) (2), JUANA; ZELASCHI (1) (2), NORBERTO; GAITÁN (1) (2), SERGIO; SILVESTRINI (3), PIA; ZIEHER (4), LUIS MARÍA

(1) Facultad de Cs. Médicas UNLP (2) Hospital Neuropsiquiátrico Dr. "A. Korn" (3) Facultad de Veterinaria UNLP (4) Facultad de Medicina UBA

Los programas de tratamiento que combinan drogas antipsicóticas con rehabilitación psicosocial y cognitiva (RP) son mas efectivos para reducir el porcentaje de recaídas que la utilización sólo de terapia farmacológica para el tratamiento de la esquizofrenia. Se investiga si esto ocurre con respecto al funcionamiento neurocognitivo. **MÉTODO:** Se diseñó un estudio de 104 semanas con 20 pacientes con esquizofrenia (DSM IV) tratados con antipsicóticos convencionales (APT)-ej: haloperidol (2-10 mg/d)- (n=10) y con antipsicóticos atípicos (APA)-ej: clozapina (200-600 mg/d)- (n=10). Cinco en cada grupo recibieron tratamiento combinado (RP + AP). Se formaron 4 grupos: grupo I: APT +RP; grupo II APA + RP; grupo III APT sin RP y grupo IV APA sin RP. Se realizaron dos evaluaciones: T0 (inicio) y T104s (final del estudio) con la Escala WAIS III (memoria de trabajo MT) y el WCST (funciones ejecutivas). Estadística: Anova no paramétrico (Kruskall-Wallis) para detectar diferencias entre los grupos en T0 y T104 y un test de Wilcoxon para evaluar mejoría en T104s. No existió diferencia significativa de edades entre los grupos (H= 2.37; P=0.49). El tratamiento con RP no introduce ninguna modificación (T0 =T104s). T0 MT p=0.19, WCST p=0.08; T104s MT

$p=0.72$, WCST $p=0.13$. No se hallaron diferencias en ninguno de los cuatro grupos por efecto del tratamiento (Tabla)

Wilcoxon	Grupo I APT	Grupo II APA + RP	Grupo III APT + RP	Grupo IV APA
MT $p=$	0.92	1.00	1.00	0.09
WCST $p=$	0.74	0.39	0.83	0.23

(1) La RP no mejora la neurocognición. (2) El déficit en el neurodesarrollo en la esquizofrenia podría explicar este hallazgo. (3) Las limitaciones metodológicas (n) y la duración del tratamiento podrían ser otra explicación.

101. (12787) ALLOPREGNANOLONA MODIFICA LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MODULANDO EL RECEPTOR GABA A. GIULIANI, FERNANDO; ROBY, LUCAS; CABREIRA, RICARDO

LINCE-IMBECU-CONICET. FCM. UNCuyo

Es conocido que ciertas moléculas esteroideas son metabolizadas o bien sintetizadas de novo en el Sistema Nervioso Central, recibiendo el nombre de neuroesteroides. Allopregnanolona (All) es un neuroesteroide sintetizado por los astrocitos y modula receptores ionotrópicos como NMDA y GABA[A]. En trabajos previos demostramos que All $6\mu\text{M}$ estimula la liberación de LHRH de cortes de hipotálamo medio basal (HMB) y que ésta liberación es dependiente de la acción moduladora directa de All sobre el sistema excitatorio/NMDA. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de All sobre la liberación de ácido glutámico (Glu) y su interacción con el sistema GABAérgico a nivel de HMB. Se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley ovariectomizadas, impregnadas con estrógeno ($25\ \mu\text{g}/\text{rata}$) y progesterona ($1\ \text{mg}/\text{rata}$). El efecto de All fue evaluado por medio de la liberación de (3)H-Glutámico (3H-Glu) inducida por K^+ 28mM en cortes de HMB utilizando la técnica de superfusión de tejidos aislados. Las diferentes drogas específicas utilizadas fueron: All $6\mu\text{M}$, bicuculina $9.8\mu\text{M}$ (antagonista GABAA) (Bic) sola o combinada con All $6\mu\text{M}$, y KRBG libre de Mg^2+ (control). La liberación de (3)H-Glu se expresó como porcentaje de liberación de (3)H-Glu respecto de la liberación basal y analizada mediante test de t. All $6\mu\text{M}$ estimuló la liberación de (3)H-Glu respecto del grupo control (110 ± 15 vs 29 ± 4 ; $P<0.0003$). La adición al medio de superfusión de Bic inhibió el efecto de All (51 ± 5 vs 110 ± 15 ; $P<0.0024$) mientras que la combinación de Bic + All revirtió el efecto estimulador de All (59 ± 10 vs 110 ± 15 ; $P<0.02$) Por lo tanto concluimos que All $6\mu\text{M}$ estimula la liberación de (3)H-Glu. Este efecto sería mediado entre otros, por receptores GABA[A] presentes en los terminales presinápticos glutamatergicos del HMB de manera no tradicional, presentando así un nuevo mecanismo de acción de los neuroesteroides a nivel hipotalámico en la rata hembra.

NEUROCIENCIAS B

102. (12174) INACTIVACIÓN SELECTIVA DE LOS CIRCUITOS NEURONALES DE LA AMÍGDALA BASO-LATERAL (ABL) DE LA RATA DURANTE LA EXPLORACIÓN DE AMBIENTES CON DIFERENTES GRADOS DE CONFLICTO. ÁLVAREZ, EDGARDO O.; BANZAN, ARTURO M.

Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo

La exploración de ambientes "conflictivos" en la rata, es decir, en presencia de peligros potenciales, está regulada por varios circuitos nerviosos. Anteriormente, este laboratorio señaló la participación de al menos la ABL. El objetivo de este trabajo fue re-evaluar si la inactivación neuronal transitoria graduada de la ABL de los animales afecta la exploración conflictiva. Se trabajó con ratas machos adultas, implantadas bilateralmente en ABL con cánulas de microinyección. 48 horas después, los animales se

dividieron en diferentes grupos y fueron microinyectados con 0,2, 2 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Lidocaina o salina como control. 5 min después las ratas fueron expuestas a un laberinto en cruz elevado asimétrico (ambiente conflictivo, "C") o a una caja de registro de actividad conductual (ambiente no conflictivo, "NC") por 5 min. Los resultados mostraron que en el ambiente "C", la Lidocaina aumentó significativamente el tiempo de exploración de uno de los brazos conflictivos (32.3 ± 6.5 seg Vs 48.3 ± 5.1 seg; Sal Vs $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Lidocaina, brazo "Una Pared", $p<0.05$) sin modificar la exploración de los demás. En el ambiente "NC", las conductas motoras actividad horizontal y ambulatoria fueron significativamente inhibidas por la Lidocaina a la dosis de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (4715 ± 533.2 Cuentas/5 min Vs 3995 ± 364 Cuentas/5min; Sal Vs Lidocaina, $p<0.05$, actividad horizontal; 3654 ± 295 Cuentas/5 min Vs 2541 ± 245 Cuentas/5 min; Sal Vs Lidocaina, $p<0.01$, actividad ambulatoria). En las conductas exploratorias, se observó que mientras la exploración subterránea fue inhibida por la dosis más baja de Lidocaina (11 ± 0.8 veces Vs 7 ± 0.9 veces; Sal Vs Lidocaina, $p<0.01$), la exploración focalizada aumentó significativamente (12.1 ± 2.4 seg Vs 34.8 ± 4.5 seg; Sal Vs Lidocaina, $p<0.01$). En conclusión: Los resultados respaldan la participación de la ABL en la exploración de ambientes novedosos, sugiriendo una acción facilitatoria o inhibitoria, dependiendo del estímulo ambiental y del tipo de conducta.

103. (12226) NIVELES NOCTURNOS Y DIURNOS DE MELATONINA PLASMÁTICA EN PACIENTES CON CEFALEA EN RACIMOS DURANTE EL PERIODO DOLOROSO Y DE REMISIÓN. FIGUEROLA, MARIA DE LOURDES; BRUERA, OSVALDO; LEVIN, GLORIA; MEDINA, CARLOS; BARONTINI, MARTA; LESTON, JORGE

CEDIE-CONICET; Unidad de Cefaleas, Servicio de Neurología, Hospital de Clínicas. Servicio de Neurofisiología, Hospital Garrahan.

Pese a la amplia información clínica y los estudios complementarios que relacionan los dolores de cabeza primarios y el sueño, no existe al presente una conclusión definitiva acerca de los mecanismos por los cuales interactúan. La cefalea en racimos ha sido clásicamente relacionada con el sueño debido al predominio de ataques nocturnos particularmente durante la etapa REM. Se presume que los dolores relacionados con el sueño responden a una alteración del ritmo circadiano pineal, lo cual implicaría una alteración de la secreción de melatonina por dicha glándula. A raíz de esta especulación se ha comenzado a utilizar melatonina como tratamiento de algunos tipos de cefaleas. Con la idea de relacionar el sueño y la cefalea en racimos estudiamos los niveles de melatonina plasmáticos en 5 pacientes con cefalea en racimos dentro y fuera del período doloroso y en 6 controles. Las extracciones se realizaron en el primer ciclo de sueño durante las etapas de sueño no REM 1, 2 y 4, la etapa REM y al despertar. El grupo control mostró la patente normal descrita en la literatura con un incremento nocturno (80 ± 18 pg/ml) y niveles bajos a la mañana (13 ± 3 pg/ml). Los pacientes con cefalea en racimo durante el período doloroso estuvieron dentro de los valores diurnos durante todo el estudio sin observarse ningún pico (noche: 11 ± 3 pg/ml y día: 14 ± 5 pg/ml). Durante el período de remisión obtuvimos una curva con pico nocturno (88 ± 15 pg/ml) aunque los valores diurnos (34 ± 25 pg/ml) ($p<0.05$) nunca alcanzaron los valores del grupo control. Estos resultados señalan un compromiso a nivel de los ritmos biológicos de los pacientes con cefalea en racimos en estricta relación con el período doloroso.

104. (12239) ESTUDIO TEMPORAL DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA MÉDULA ESPINAL DE RATAS SOMETIDAS A ASFIXIA PERINATAL. DORFMAN, VERÓNICA B.; BAYONA, JULIO C.; REY FUNES, MANUEL E.; COIRINI, HECTOR; LOIDL, C. FABIÁN

Facultad de Medicina – UBA. Instituto de Biología y Medicina Experimental, Instituto de Biología Celular y Neuro-

ciencias, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina-UBA

La asfixia perinatal (AP) es la causa más frecuente de espasticidad cerebro-espinal. Previamente hemos determinado que la AP induce un aumento en la producción de óxido nítrico en el SNC. Cuando éste se une con el radical superóxido, promueve nitración proteica (Np), afectando así la naturaleza fisicoquímica de las proteínas. Con el objetivo de estudiar la evolución temporal del sistema nitrérgico, evaluamos la expresión de NADPH-diaforasa y la Np por Western-Blot en médula espinal (ME) cervical y lumbar de ratas macho Sprague-Dawley a los 21, 45 y 60 días de edad (n=5/grupo), sometidos a AP durante 20 min en normotermia. A los 21 días el grupo AP no presentó alteraciones respecto al grupo control (CTL). Sin embargo, a los 45 días se observó diferencias significativas con NADPH-diaforasa en la ME cervical del AP respecto al CTL, con un aumento en el número de neuronas reactivas (CTL: 7 ± 2 , AP: 11 ± 1), en el área celular reactiva (ACR; CTL: $647 \pm 68 \mu\text{m}^2$, AP: $804 \pm 59 \mu\text{m}^2$) y en la densidad óptica relativa (DOR, CTL: $0,055 \pm 0,007$, AP: $0,101 \pm 0,019$). Estas diferencias se mantuvieron en los animales de 60 días de edad. En esta región se observó además un aumento creciente en la Np a los 45 y 60 días de edad, tanto en AP como en CTL, aunque con una DOR 25% mayor en los AP. La región lumbar de la ME del grupo AP presentó diferencias respecto al grupo CTL recién a los 60 días, con un aumento del 30% en el ACR para NADPH-diaforasa. La Np en esta región mostró un aumento del 50% en la DOR de AP respecto a CTL también a los 60 días. Además, en esta región, los CTL presentaron una disminución significativa de la DOR de las especies nitradas con el aumento de la edad (70% 45 días vs. 21 días). La AP induce aumento en la Np en forma creciente de acuerdo a la edad de evaluación. Esto indicaría un incremento temporal en la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, lo que podría explicar la evolución progresiva de los signos y síntomas de aquellos que padecen espasticidad.

105. (12240) NEUROESTEROIDES SINTÉTICOS. ESTUDIO DE SU AFINIDAD AL RECEPTOR PARA GABA[A]. COIRINI, HECTOR (1,3); DURÁN, FERNANDO J.(2); GHINI, ALBERTO A.(2); BURTON, GERARDO(2)

(1)Instituto de Biología y Medicina Experimental. (2)Departamento de Química Orgánica UMYMFOR - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA. (3)Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina - UBA

Los esteroides neuroactivos endógenos como 3alfa-hidroxi-5alfa-pregnano-20-ona (ALLO) y su isómero 5β modulan positivamente la acción de GABA. La rápida biotransformación que estos sufren cuando son administrados en forma exógena los hace poco eficientes para tratamientos a largo plazo. El desarrollo de análogos sintéticos más estables y con una interacción similar con este receptor, sería de alto interés. Esta comunicación presenta estudios preliminares sobre la afinidad de tres esteroides sintéticos que poseen un átomo de azufre en posición 6. Para ello se realizaron estudios de desplazamiento de la unión de (35)S-butilbencilo-fosfo-tionato (TBPS) en sinaptosomas purificados de cerebro de rata. Las incubaciones fueron realizadas con 3nM de (35)S-TBPS en presencia y ausencia de 5μM de GABA con el agregado de cantidades crecientes (1-500nM) de ALLO, o bien del 6-tio-esteroide (S-06), su 6-sulfóxido (S-07) o su 6-sulfona (S-08). La unión no específica se determinó con 10μM picrotoxina. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 2hs. La fracción unida se separó por filtración con vacío (Whatman GF/C). Los cuatro esteroides desplazaron el (35)S-TBPS unido en presencia de 5μM de GABA, presentando ALLO y S-06 un comportamiento similar, mientras que los otros dos esteroides resultaron menos potentes ($p < 0.05$). Los valores de IC₅₀ obtenidos fueron: ALLO = $124,5 \pm 4,6 \text{ nM}$; S-06 = $160,1 \pm 6,5 \text{ nM}$; S-07 = $341,2 \pm 8,7 \text{ nM}$ y S-08 = $404,9 \pm 7,8 \text{ nM}$ (n= 4 /esteroide). La mayor capacidad de S-06 para competir por el sitio de unión para neuroesteroides respecto de los otros dos derivados, parecería radicar en que éste presenta un átomo de azufre sin oxígeno/s

asociados, reduciéndose la capacidad de formar puentes de hidrógenos que aparentemente disminuirían la afinidad por el sitio de unión. A pesar de que aún es necesaria una mejor caracterización "in vitro" e "in vivo", la similitud en los valores de IC₅₀ entre ALLO y S-06 señalan a este último como una posible droga de uso terapéutico. (PICT-10962 y UBACYT M-020)

106. (12245) INTERACCIÓN ENTRE LAS ENDOTELINAS (ETS) Y LAS VÍAS DEL AMPc Y FOSFOINOSÍTIDOS EN EL HIPOTÁLAMO ANTERIOR (HA) Y POSTERIOR (HP) DE RATA. DI NUNZIO, ANDREA; HOPE, SANDRA; DAVIO, CARLOS (1); BIANCIOTTI, LILIANA (2); VATTA, MARCELO

Cát de Fisiología (IQUIMEFA- CONICET). FFyB. UBA. Cát de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET), (1) Lab Radioisótopos y (2)Cat de Fisiopatología. FFyB. UBA

Los receptores a ETs (ETA y ETB) están acoplados a múltiples señales de transducción, entre ellas el AMPc y fosfoinosítidos. Sobre esta base el objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de las ET-1 y 3 sobre los niveles intracelulares de AMPc (Davio y col., Biochem. Pharmacol., 50,91,1995) y sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos (Berridge y col., J. Biochem., 206,587,1982) en el HA y HP de rata. Resultados (% vs control, ANOVA y test de Bonferroni, * $p < 0.05$): En HA, la ET-1 disminuyó el AMPc ($39 \pm 2^*$) y la ET-3 lo aumentó ($72 \pm 2^*$). El antagonista ETB (BQ788) y no el ETA (BQ610) bloqueó el efecto de la ET-1. Contrariamente, el aumento del AMPc inducido por ET-3 se inhibió en presencia del BQ610. En HP ambas ETs aumentaron el AMPc ($54 \pm 4^*$ y $60 \pm 3^*$, respectivamente). Por su parte, ambos antagonistas bloquearon el efecto de la ET-1 y solo el BQ788 el de la ET-3. Por otra parte, tanto en el HA como en el HP, ambos péptidos aumentaron la hidrólisis de fosfoinosítidos (HA: ET-1, $34 \pm 4^*$, ET-3, $37 \pm 2^*$; HP: ET-1, $54 \pm 4^*$, ET-3, $51 \pm 3^*$). En el HA, el incremento de la hidrólisis de fosfoinosítidos producido por ET-1 se inhibió cuando se adicionó el BQ-788, mientras que el efecto inductor de la ET-3 se bloqueó en presencia del BQ-610. Contrariamente, en el HP, el aumento de la hidrólisis de fosfoinosítidos inducido por ambos péptidos se inhibió en presencia de ambos antagonistas. En el HA, la ET-1 inhibe la vía del AMPc y estimula la vía de los fosfoinosítidos a través del receptor ETB, mientras que la ET-3 estimula ambas vías en esta región hipotalámica mediante su unión con el receptor ETA. En el HP, ambos péptidos activan tanto la vía del AMPc como la vía de la PLC. La ET-1 a través del receptor ETA y B, mientras que la ET-3 mediante la activación del receptor ETB estimula la vía del AMPc, y a través de ambos subtipos de receptores activa la vía de los fosfoinosítidos.

107. (12250) EVIDENCIAS DE LATERALIZACIÓN FUNCIONAL EN LA AMÍGDALA BASO-LATERAL (ABL) DE LA RATA EN LA EXPLORACIÓN DE AMBIENTES CONFLICTIVOS Y NO CONFLICTIVOS. ALVAREZ, EDGARDO O.; BANZAN, ARTURO M.

Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo

Evidencias previas del laboratorio han mostrado que la amígdala baso-lateral participa modulando la exploración de ambientes novedosos con distintos grados de conflicto en la rata. En este trabajo se investigó si la inactivación unilateral de la ABL en la exploración de estos ambientes puede o no afectar estas conductas diferencialmente. Se usaron ratas machos adultas implantadas bilateralmente en la ABL con cánulas de microinyección. 48 horas después, grupos de animales se microinyectaron con salina (control), lidocaina en la ABL izquierda o lidocaina en la ABL derecha. Después de 5 min, todos los animales fueron expuestos por 5 min al laberinto en cruz elevado asimétrico (ambiente conflictivo, "C") o a una caja de actividad animal (ambiente no conflictivo, "NC"). Los resultados mostraron que en el ambiente "C", en el brazo de mayor conflicto, la administración de 0.2 μg/μl de lidocaina tanto en la ABL izquierda como en la derecha inhibió significativamente la exploración (6.32 ± 2.89 s Vs 1.2 ± 1.7 s, lado izquierdo; o Vs 0 ± 1.8 s, lado derecho, $p < 0.01$; Sal Vs lidocaina).

En el brazo de conflicto intermedio, la lidocaina aumentó selectivamente la exploración solo cuando se inyectó en la ABL derecha (25.61 ± 3.32 s Vs 43.17 ± 8.36 s; Sal Vs lidocaina lado derecho, $p < 0.05$). En el ambiente "NC", la actividad motora ambulatoria fue inhibida significativamente con la misma dosis de lidocaina aplicada en la ABL derecha (3654 ± 310 Cuentas/5 min Vs 2617.5 ± 326 Cuentas/5 min; Sal Vs lidocaina lado derecho, $p < 0.05$). Las actividades exploratorias se afectaron de manera divergente. La aplicación de lidocaina en la ABL izquierda fue efectiva en aumentar significativamente la exploración focalizada (12.08 ± 2.52 s Vs 22.11 ± 2.38 s; Sal Vs lidocaina, $p < 0.05$). En cambio, la exploración subterránea se inhibió significativamente (11 ± 0.9 veces Vs 7.5 ± 0.7 veces; Sal Vs lidocaina, $p < 0.01$). En conclusión: los datos sugieren cierta lateralización funcional compleja de los circuitos neurales de la ABL en la rata.

108. (12261) MECANISMOS QUE REGULAN LA CAPTACIÓN DE NORADRENALINA PRODUCIDO POR LA ENDOTELINA 1 EN EL HIPOTÁLAMO. HOPE, SANDRA; OTERO, GABRIELA; SHMIPP, JOSEFINA; GUIONET, ARIEL; BIANCIOTTI, LILIANA (1); VATTA, MARCELO

Cát de Fisiología (IQUIMEFA- CONICET). FFyB. UBA. Cát de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET) y (1) Fisiopatología. FFyB. UBA

La concentración de noradrenalina (NA) en el espacio sináptico se regula mediante el transportador neuronal de la amina, siendo responsable de la terminación de la acción del transmisor mediante el mecanismo de captación neuronal. En trabajos previos demostramos que la Endotelina 1 (ET1) disminuye la captación neuronal de NA tanto hipotálamo anterior (HA) y como en el posterior (HP). En ambos casos sus efectos son mediados por receptores atípicos y/o ETC. Sobre esta base el objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos intracelulares involucrados en los efectos de la ET1 en el HA e HP. Los estudios se realizaron en HA e HP de ratas SD macho (250-300 g). La captación neuronal de NA se determinó por 5 min. (Vatta y col. Regul. Pept. 65,175,1996) en presencia o ausencia de ET1 y los inhibidores de diferentes vías intracelulares. Los resultados se expresan como $\% \pm ES$ (ANOVA y test de Bonferroni; $*p < 0.05$; $n: 6-8$). En el HA la disminución de la captación de NA producido por la ET1 10nM se bloqueó en presencia del inhibidores general y de la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (L-NAME 10 μ M y 7-Ni 10 μ M, respectivamente; 100.0 ± 9.6 vs 94.3 ± 10.9 y 101.5 ± 7.3). Por otra parte, el inhibidor de la PKA, H-89 500nM inhibió el efecto de ET1 (100.0 ± 9.0 vs 103.4 ± 5.5), mientras que el inhibidor de la PLC, U73122 10 μ M, no modificó la acción de ET1 (100.0 ± 4.6 vs $75.4 \pm 6.6^*$). En el HP la disminución de la captación inducida por la ET1 se bloqueó en presencia de L-NAME y 7NI (100.0 ± 12.0 vs 98.0 ± 15.3 y 94.9 ± 8.4). Además, tanto el H89 como el U73122 no modificaron la disminución de la captación producida por la ET1 (100.0 ± 5.2 vs $67.4 \pm 2.8^*$ y $72.7 \pm 2.5^*$). Estos resultados nos permiten concluir que en ambas regiones hipotalámicas la disminución de la captación neuronal de NA producido por la ET1 está modulado por la vía del óxido nítrico y que en el HA también está involucrada el AMPc/PKA

109. (12265) ALTERACIONES DEL HIPOCAMPO EN LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA (SHR) Y LA RATA HIPERTENSA DOCA-SAL. PIETRANERA, LUCIANA; SARAVIA, FLAVIA; LIMA, ANALÍA; ROIG, PAULINA; DE NICOLA, ALEJANDRO F.

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET y Fac. de Medicina-UBA

Existen evidencias del daño hipocámpal que sufren las SHR, aunque no existen datos sobre ratas hipertensas DOCA-SAL. Nuestro objetivo fue comparar las alteraciones del hipocampo de ratas macho SHR de 16 semanas (PA: 180 mm de Hg) y sus controles Wistar Kyoto (WKY), con las encontradas en ratas macho

Sprague-Dawley que reciben (a) 10 mg de DOCA, día por medio/21 días y solución de NaCl 1% como bebida (DOCA-SAL PA: 160 mm Hg) y sus controles normotensos que reciben: (b) DOCA y agua corriente como bebida (DOCA-H₂O), (c) solo agua como bebida (CTL-H₂O), (d) solo NaCl 1% como bebida (CTL-SAL). En estos grupos experimentales determinamos: I) la proliferación celular en el giro dentado (GD) luego de la administración de BrdU; II) el número de astrocitos activos que expresan la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) en CA1, CA3 y GD; III) el número de astrocitos Apolipoproteína E positivos como medida de neurodegeneración en las mismas áreas, y IV) el número de neuronas en el hilio del GD. En ambos modelos de hipertensión encontramos alteraciones similares: disminución de la proliferación celular en el GD (WKY: 55.56 ± 5.55 , SHR: 31.31 ± 3.28 $p < 0.01$; CTL-H₂O: 26.5 ± 2.29 , DOCA-SAL: 11.62 ± 1.88 $p < 0.01$ cels+/hemiGD), aumento del número de astrocitos GFAP + y Apo E + (GFAP: CA1: WKY: 142.85 ± 12.40 , SHR: 279.54 ± 16.07 $p < 0.001$; CTL-H₂O: 120.6 ± 9.29 , DOCA-SAL: 201.81 ± 14.80 $p < 0.001$ astr+/mm²). El número de neuronas en el hilio es 37% menor en SHR y DOCA-SAL con respecto a sus controles normotensos. Estos resultados sugieren un mecanismo neuroendócrino común, ya que las SHR son hiperrespondientes al tratamiento con mineralocorticoides y los animales DOCA-SAL presentan altos niveles de mineralocorticoides circulantes. El hipocampo alterado de SHR y de la rata DOCA-SAL dejaría de ejercer su regulación negativa sobre el núcleo paraventricular, llevando a la hiperfunción de núcleos hipotalámicos involucrados en el control cardiovascular, la hipertensión y la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

110. (12291) DISTRIBUCIÓN DE LA NAPDH DIAFORASA/NOS EN EL GIRO DENTADO DE RATAS IRRADIADAS. D'ALESSIO, LUCIANA; LOPEZ-COSTA, JUAN JOSÉ; LÓPEZ, ESTHER MARÍA; KOCHEN, SILVIA; ZIEHER, LUIS MARÍA; GUELMAN, LAURA

1ª Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET); Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis", Facultad de Medicina, UBA.

En el Sistema Nervioso el óxido nítrico (NO) participa en el proceso de LTP que subyace a la memoria, y en procesos de plasticidad durante el neurodesarrollo. Su síntesis ha sido reportada en interneuronas del giro dentado del hipocampo. Objetivos: evaluar la distribución de las neuronas nitrérgicas en el giro dentado de las ratas irradiadas. Ratas Wistar fueron irradiadas dentro de las 48 hs del nacimiento, con una dosis única de 5 Gy de rayos gamma (tasa de dosis 1Gy/min). Luego de 30 días, fueron perfundidas con una solución del paraformaldehído al 4%. Las secciones fueron procesadas con la técnica histoquímica de NADPH diaforasa. La irradiación neonatal indujo una alteración de la citoarquitectura del hipocampo. El giro dentado de los animales controles mostró reactividad en el estrato granuloso y en el hilus. Por el contrario, en los animales irradiados se observó la desaparición de la reactividad en la granulosa, y numerosas neuronas reactivas distribuidas en el hilus. La irradiación postnatal provoca una alteración de las neuronas que sintetizan NO posiblemente debido a una alteración de la migración neuronal. Estas alteraciones podrían ser responsables en parte, de los déficits de memoria observadas luego de la irradiación.

111. (12293) PROGESTERONA PROMUEVE LA MIELINIZACIÓN Y PROLONGA LA SUPERVIVENCIA DE RATONES CON ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE). GARAY, LAURA; GONZÁLEZ DENISELLE, M.CLAUDIA; LIMA, ANALÍA; ROIG, PAULINA; DE NICOLA, ALEJANDRO

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Fac. de Medicina. UBA-CONICET

La EAE es una enfermedad autoinmune desmielinizante del sistema nervioso central y modelo experimental de Esclerosis

Múltiple. Teniendo en cuenta que Progesterona (PROG) es neuroprotectora en modelos de neurodegeneración e injuria de la médula espinal, el objetivo de este trabajo fue analizar sus posibles efectos en este modelo de desmielinización primaria. EAE se indujo en ratones C57/BL6 hembras por la inmunización con la glicoproteína oligodendrocitaria de mielina (MOG) péptido 40-54, emulsionada en adyuvante de Freund completo y posterior inyección de toxina de Pertussis. Un grupo recibió un pellet de PROG (20mg) una semana antes de la inducción de la enfermedad mientras que otro grupo permaneció sin tratamiento. Utilizando un analizador de imágenes computarizado, se estudiaron los siguientes parámetros en la médula espinal: 1-% infiltración celular en la sustancia blanca por tinción con hematoxilina-eosina, 2- grado de desmielinización por tinción con luxol fast blue y 3- reactividad astrogliar por inmunohistoquímica para la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Clínicamente, se evaluó si PROG prolongó la supervivencia de los animales. Resultados: Se observó en los animales tratados (EAE+PROG) con respecto a los no tratados (EAE): a- Una reducción del 40% en el área infiltrada por células inflamatorias (EAE+PROG: $1.81 \pm 0.21\%$ vs EAE: $4.56 \pm 1.46\%$; $p=0.018$). b- menor grado de desmielinización en sustancia blanca (EAE+PROG: $8.18 \pm 0.93\%$ vs EAE: $13.10 \pm 1.61\%$; $p=0.021$). c- El nº de astrocitos GFAP+/mm² no fue modificado significativamente por PROG. El % de animales que sobrevivieron al final del tratamiento fue un 45% mayor en el grupo EAE+PROG con respecto al grupo no tratado (EAE+PROG: 100% vs EAE: 55.5% ; $p=0.028$) Conclusión: La Progesterona disminuye las alteraciones neuropatológicas evaluadas en la EAE sugiriéndose como mecanismo/s la depresión de la respuesta inmune y/o la remielinización por acción directa sobre células mielinizantes.

112. (12298) ANÁLISIS DE LAS FUNCIONES COGNITIVAS ANTES Y DESPUÉS DE LA CIRUGÍA EN PACIENTES CON EPILEPSIA TEMPORAL. ODDO, SILVIA; SOLIS, PATRICIA; GIAGANTE, BRENDA; CONSALVO, DAMIAN; SILVA, WALTER; D'ALESSIO, LUCIANA; PAPAYANNIS, CRISTINA; KAUFFMAN, MARCELO; CENTURION, ESTELA; SEOANE, EDUARDO; SAIDON, PATRICIA; KOCHEN, SILVIA

Centro de Epilepsia. Hospital Ramos Mejia. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. Eduardo De Robertis". Facultad de Medicina. UBA. CEFYBO. CONICET.

El objetivo de este estudio es analizar el resultado de la evaluación cognitiva en pacientes con epilepsia temporal mesial refractaria antes y después de la lobectomía temporal anterior. Material y Método: se seleccionaron 35 pacientes (p.) con epilepsia temporal refractaria que concurren al Centro de Epilepsia. Todos los pacientes fueron evaluados con el protocolo de evaluación Neuropsicológica antes, 6 meses y 12 meses después de la cirugía. Incluye: inteligencia, atención, dominancia manual, memoria verbal, memoria visual, lenguaje y función ejecutiva. Los valores obtenidos se compararon con la población normal según sexo, edad y escolaridad. Los resultados se consideraron "normales" cuando se encontraban por encima de Z-2. Para comparar los resultados se aplicó el test de ANOVA, y con los resultados significativos, se utilizó el test de chi cuadrado. Resultados: En 17 p. se realizó lobectomía temporal anterior izquierda (LTAI) y en 18 p. se realizó lobectomía temporal anterior derecha (LTAD). Del total de los pacientes evaluados el 62.8% presentó déficit de memoria. Del análisis realizado con los resultados netos, observamos que, al año de la cirugía, el déficit de memoria visual (recuerdo diferido) ($p=0.03$) y la función ejecutiva ($p=0.03$) mejoraron en forma significativa. La memoria verbal, el lenguaje y la atención no presentaron cambios significativos. Del análisis realizado en cada paciente, luego de la cirugía, encontramos resultados variables con mejor pronóstico en el grupo de p. con LTAD. En el grupo de p. estudiados encontramos un perfil neuropsicológico caracterizado por déficits de memoria material-específica (verbal/visual). Con relación al pronóstico post-quirúrgico de

la memoria, encontramos una leve mejoría en los pacientes con LTAD, con déficit de memoria visual previa, como fue descripto por otros autores.

113. (12300) LA EXPRESIÓN DEL FACTOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF) DISMINUYE EN EL GIRO DENTADO DE RATONES DIABÉTICOS POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ): REVERSIÓN POR TRATAMIENTO CON ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA. BEAUQUIS, JUAN (1); GONZÁLEZ DENISELLE, MARÍA CLAUDIA (1,2); GARAY, LAURA (1,2); PIETRANERA, LUCIANA (1,2); GONZÁLEZ, SUSANA (1,2); ROIG, PAULINA (1); HOMODELARCHE, FRANCOISE (3); DE NICOLA, ALEJANDRO (1,2); SARAVIA, FLAVIA (1,2)

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET-UBA. (2) Fac de Medicina, UBA; (3) CNRS 7059 Université Paris 7, Francia.

La diabetes mellitus tipo 1 en el humano y en modelos experimentales animales, correlaciona con numerosas alteraciones del sistema nervioso central, siendo el hipocampo una de las estructuras más vulnerables. Anteriormente reportamos que los ratones diabéticos por STZ presentaban baja neurogénesis con respecto a los controles y que el tratamiento con fluoxetina (FXT, 10 mg/kg) por 10 días modulaba positivamente la proliferación celular en el giro dentado (GD). En este trabajo nuestro objetivo fue explorar la expresión de BDNF, neurotrofina ligada a plasticidad y funcionalidad neuronal, en el hipocampo de ratones diabéticos y la potencial modulación por FXT. Se trataron ratones C57Bl/6 machos adultos con STZ (195mg/kg) y luego de 10 días se trataron con FXT o vehículo por igual período. Se realizó hibridización in situ con oligosonda marcada con S35, cuantificándose la densidad óptica en la placa autorradiográfica en el GD. El mRNA de BDNF disminuyó en el grupo diabético con respecto al control (CTL: 129 ± 4.3 , STZ: 110.1 ± 2.75 , $p<0.01$) y en los diabéticos tratados con FXT aumentó con respecto a los diabéticos tratados con vehículo (STZ+FXT: 125.4 ± 3.0 , $p<0.05$ vs STZ), llegando a valores controles (CTL+FXT: 123.4 ± 2.07). Por otro lado, en ratones inyectados con bromodesoxiuridina (BrdU, 85 mg/kg) y sacrificados a las 2 h realizamos simultáneamente hibridización in situ no isotópica para mRNA de BDNF y detección de células proliferantes BrdU+ observando que las últimas son positivas para mRNA de BDNF. Nuestros resultados sugieren alteraciones en la expresión de factores tróficos en el cerebro diabético así como un rol importante de BDNF en la acción del antidepresivo FXT en el hipocampo, tanto en el proceso neurogénico como sobre las células granulares adultas del GD.

ONCOLOGIA A

114. (11978) ESTUDIOS IN VITRO DE UN NUEVO FOTOSENSIBILIZADOR DERIVADO DE PORFIRINA-C60 DE UTILIDAD EN TERAPIA FOTODINÁMICA. ALVAREZ, MARÍA GABRIELA (1); PRUCCA, CÉSAR (1); MILANESIO, MARÍA ELISA (2); DURANTINI, EDGARDO NÉSTOR (2); RIVAROLA, VIVIANA (1)

(1) Dpto de Biología Molecular. (2) Dpto de Química. Universidad Nacional de Río Cuarto.

La terapia fotodinámica (TFD) es un método efectivo y selectivo para el tratamiento de tumores. La TFD se basa en el efecto combinado de la luz y un agente fotosensibilizador, el cual puede inducir la muerte celular por apoptosis o necrosis. Dos tipos de mecanismos pueden ocurrir después de la fotoactivación de la porfirina, uno involucra la formación de radicales libres (tipo I) y el otro la generación de oxígeno molecular singlete (1) O (2) (tipo II). El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos fotodinámicos de una diáda (P-C60) con alta capacidad para formar estados de separación de cargas fotoinducido sobre cultivos

de células de laringocarcinoma humano (Hep-2). P-C60 se incorpora rápidamente (<4 h) en las células y alcanza un valor de saturación entre las 4 y 24 h (~1,5nmol/10(6) células). Los estudios de localización demostraron que la droga se ubica en el área perinuclear principalmente en los lisosomas. Los ensayos de índice de supervivencia (por MTT) han permitido comprobar que en oscuridad P-C60 no afecta la viabilidad hasta la concentración 1 mM y 24 horas de incubación. Sin embargo, la acción combinada de P-C60 y luz visible induce una disminución significativa (80%) de la supervivencia celular. Además la diada mantiene una fotoactividad alta aún bajo condiciones de atmósfera de argón, demostrando la implicancia de un mecanismo tipo I en el foto-daño de las células. Por tinciones con Hoechst 33258 y Azul de Toluidina de los cultivos de células tratados con P-C60, se encontró que una irradiación de 54 Jcm⁻² induce el máximo valor de índice apoptótico (75%) con respecto al total de muertes. Estos resultados fueron confirmados a través de la electroforesis en gel de agarosa y el ensayo TUNEL. Con los resultados obtenidos podemos concluir que P-C60 reúne propiedades fotobiológicas adecuadas para su aplicación en tratamientos fotodinámicos mediante TFD.

115. (12004) IMPLICANCIAS DE LA EXPRESIÓN DE SURVIVINA, UNA PROTEÍNA INHIBIDORA DE LA APOPTOSIS (IAP), EN CARCINOMAS MAMARIOS. CROCI RUSSO, D(1); BELLINGERI, R(1); CROCI RUSSO, C(2); RIVAROLA, V(1)

Fac. Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales. UNRC. Ruta 8 Km 601(5800) Río IV Cba. (2) Servicio de patología Htal San Andrés de Giles. Bs As.

Survivina es un particular miembro de la familia de proteínas (IAP) que actúa como mediador entre la muerte y la división celular. Se expresa en la mayoría de los cánceres humanos mientras que no lo hace en tejidos normales adultos. Recientes evidencias asocian la expresión de survivina con tumores de pronóstico desfavorable. Sin embargo, en cáncer de mama no existen resultados concluyentes acerca del rol biológico de esta proteína. Los objetivos de este estudio son: a) Evaluar la expresión de survivina en células de carcinoma mamario MCF-7. b) Determinar la asociación entre la expresión de survivina y los parámetros clínico-patológicos más importantes. A tal fin se analizó la expresión de survivina por Western Blot e Inmunocitoquímica en células MCF-7 y por Inmunohistoquímica en 63 casos de carcinomas mamarios. El análisis de ICQ reveló inmunoreactividad citoplasmática contra survivina en células MCF-7. Esta expresión, fue significativamente mayor en células proliferantes Vs quiescentes ($p < 0.05$) evaluado por WB. En pacientes, la expresión (%) de survivina se asoció al grado tumoral de Bloom y Richardson donde, los casos con Grado Tumoral I(14,5±5,9), presentaron una expresión de survivina significativamente menor que en los casos con GT II(59,1±29,5) ($p < 0.03$) y III(63,8±26,0) ($p < 0.01$). Además, la expresión de survivina se asoció con el índice pronóstico de Nottingham ($p < 0.01$). En cuanto al riesgo de desarrollar metástasis a distancia, una alta expresión de survivina en los tumores primarios se asoció al N° de metástasis axilares ($p < 0.05$); al tamaño tumoral ($p < 0.05$); y al grado histo-lógico ($p < 0.05$). No encontrándose relación con el estado de los receptores hormonales. Los datos aquí presentados muestran que la expresión de survivina estaría asociada con la proliferación celular, el desarrollo de metástasis a distancia, la malignidad y el consecuente peor pronóstico de los tumores. Por ello, survivina puede ser un buen candidato para evaluar el estado de los tumores mamarios.

116. (12040) PKC DELTA (PKCD) REDUCE LA PRODUCCIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS UROQUINASA (UPA) Y METALOPROTEASA-9 (MMP-9) EN CÉLULAS MAMARIAS MURINAS NMUMG. GROSSONI, VALERIA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; URTREGER, ALEJANDRO

Instituto de Oncología "A. H. Roffo"

PKCd es una serino-treonina quinasa que interviene en numerosos procesos de señalización intracelular. Anteriormente demos-

tramos que la sobreexpresión de PKCd en células NMuMG indujo mayor capacidad proliferativa, resistencia a la apoptosis y la adquisición de la capacidad de crecer independientemente del anclaje, propiedad asociada a un fenotipo transformado. En este trabajo nos propusimos estudiar si PKCd es capaz de modular la producción de proteasas, moléculas íntimamente vinculadas con la progresión maligna. Se emplearon dos metodologías: la sobreexpresión de PKCd por transfección y la inhibición de su expresión endógena mediante ensayos de interferencia del ARN (siRNA). La sobreexpresión de PKCd se asoció a una reducción significativa en la secreción de uPA (0,52±0,04 vs. 1,59±0,1 UI/mg prot/24 hs en cél. control) y MMP-9 (2,69±0,47 vs. 0,98±0,27 UI/mg prot. en cél. control). Además, la activación de PKCd, con PMA, resultó en una reducción dosis dependiente en los niveles de proteasas secretadas, mientras que no se observaron cambios en las células control (uPA: PMA (25 nM): 0,16±0,02 UI/mg prot/24 hs; PMA (50 nM): 0,019 ±0,001 UI/mg prot/24 hs; PMA (100 nM): no detectable. $p < 0,05$ vs. cél. control y cél. NMuMG-PKCD sin tratamiento). Similares resultados se observaron para la secreción de MMP-9. La transfección transitoria con un siRNA específico, inhibió la expresión de PKCd e indujo un incremento en la secreción de uPA (4,2±0,8 veces; $p < 0,05$) y de MMP-9 (8,1±0,9 veces; $p < 0,01$). La transfección con un siRNA control no moduló la producción de estas proteasas. Nuestros resultados demuestran que vías de señalización dependientes de PKCd son capaces de inhibir la secreción de uPA y MMP-9 en células mamarias murinas normales. Además sugieren que, a pesar de los cambios compatibles con un fenotipo transformado observados previamente, PKCd limitaría la progresión hacia un fenotipo más maligno regulando en forma negativa la motilidad e invasividad celular.

117. (12167) EXPRESIÓN DE MARCADORES ANGIOGÉNICOS Y LINFOANGIOGÉNICOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL: ROL DE LOS MACRÓFAGOS. DE LA TORRE, EULALIA (1); SACERDOTE DE LUSTIG, EUGENIA (2); SALES, MARIA ELENA (1)

(1) Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA. (2) Instituto de Oncología A.H. Roffo, Facultad de Medicina, UBA.

La generación de vasos sanguíneos y linfáticos es fundamental en el crecimiento tumoral y la metástasis. Investigamos el rol de los macrófagos (Mfs) de portadores del tumor LMM3 (línea celular derivada de una metástasis de un adenocarcinoma mamario murino) en la respuesta angiogénica y linfoangiogénica in vivo. Se obtuvieron Mfs peritoneales de hembras BALB/c luego de 7 y 14 días de inoculación con células LMM3 (4x10⁵) y Mfs normales (MfsT7, MfsT14 y MfsN). Luego se inocularon animales en forma subcutánea con: células LMM3 (2x10⁵ cel./sitio) o con el cocultivo LMM3:Mfs, en una relación 100:1 y se obtuvieron homogenatos de piel del sitio inoculado. Observamos que la neovascularización in vivo (d=número de vasos/mm² de piel) se potenció con el cocultivo de LMM3:MfsT7 (4,9±0,5) (n=6) con respecto al efecto de LMM3:MfsN (2,78±0,40) (n=4); los MfsN no modificaron el efecto positivo de las células LMM3 (2,91±0,38) (n=4). Por Western blot (Wb) (D.O./mm²) estudiamos la expresión de VEGF-A y CD31 como marcadores de angiogénesis. La coinoculación de LMM3:MfsT7 aumentó un 45% la expresión de VEGF-A y un 415% ($p < 0,001$) la expresión de CD31 con respecto a LMM3:MfsN en la piel del sitio inoculado. También estudiamos por Wb la expresión de LYVE-1, como marcador de linfoangiogénesis y observamos que la coinoculación de LMM3:MfsT7 (6,8) aumentó significativamente la expresión de LYVE-1 con respecto a LMM3:MfsN (4,8) ($p < 0,01$). El cocultivo LMM3:MfsT14 modificó la expresión de VEGF-C (80 kDa: 2,44 y 50 kDa: 1,1) con respecto a LMM3:MfsN (80 kDa: 1,55 y 50 kDa: 0,75) ($p < 0,01$) Concluimos que los Mfs peritoneales obtenidos de portadores del tumor LMM3 constituyen un estímulo para potenciar la respuesta angiogénica y linfoangiogénica in vivo.

- 118. (12200) FOTOSENSIBILIZACIÓN DE CÉLULAS MALIGNAS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE UN NUEVO DERIVADO AZUFRAO DE CINC FTALOCIANINAS.** PRUCCA, C (1); RUMIE VITTAR, NB (1); STRASSERT, C (2); AWRUCH, J (2); RIVAROLA, V (1)

Dpto Biología Molecular, FCEFQyN; Universidad Nacional de Río Cuarto. (2) Dpto Qca Orgánica, Ffyb, Universidad de Buenos Aires

La terapia fotodinámica (TFD) consiste en la administración de compuestos fotosensibles que son retenidos por tejidos malignos, los cuales en presencia de O₂ desencadenan la muerte celular. El presente trabajo tiene como objetivo la evaluación de la capacidad fotosensibilizante del derivado azufrado de cinc ftalocianina (SI) sobre células de cáncer mamario humano (MCF-7c3). La cinética de incorporación de la molécula es más rápida cuando SI es incorporada sin vehículo llegando a la saturación a las 8 hs mientras que con liposoma se logra a las 18 hs. En ambos casos la incorporación se ve disminuida en medios con 10 % de suero fetal. Ensayos de viabilidad celular (MTT) demostraron que SI no presenta toxicidad en oscuridad en el rango de concentraciones de 0.1 – 1 µM. Sin embargo en condiciones de irradiación la viabilidad celular se reduce de modo dependiente de la concentración, del tiempo de incorporación y del tiempo de iluminación. Cuando las células fueron sensibilizadas con SI sin vehículo a 1 µM e irradiadas con 27 J/cm(2) la viabilidad celular descendió a un 14,63 ± 0,08%, mientras que se obtuvo un resultado similar cuando las células fueron sensibilizadas con SI vehiculizado en liposoma a 0.6 µM (14,31 ± 0,01%), lo que indica que la molécula presenta mayor citotoxicidad cuando es administrada en liposomas. El tipo de muerte celular (Höesch-33258) es dependiente del tiempo de irradiación. A 27 J/cm(2) predomina la muerte por necrosis, mientras que a 22,2 J/cm(2) prevalece la apoptosis (62,4 % sobre el total de muerte). Los resultados obtenidos indicarían que SI es un interesante fotosensibilizador y permite continuar con los estudios in vitro y comenzar con estudios in vivo.

CONICET, Foncyt PICTO, SeCyT

- 119. (12201) MUERTE CELULAR Y REGRESIÓN TUMORAL INDUCIDA POR ZINC(II) 2,9,16,23-TETRA(METOXI) FTALOCIANINA.** YSLAS, EDITH INES; PRUCCA, C (1); BERTUZZI, M (2); DURANTINI, E (3); RIVAROLA, V (1)

Departamento Biología Molecular, FCEFQYN. Universidad Nacional de Río Cuarto. (2) Fisiología Animal (3) Química

La terapia fotodinámica (TFD) es una prometedora técnica contra el cáncer. Se basa en la generación de oxígeno singlete ((1)O₂) a través de la absorción de la luz por los fotosensibilizadores. La producción de (1)O₂ induce muerte de las células neoplásicas por apoptosis o por necrosis o daño vascular, lo cual provoca regresión tumoral. Los objetivos del trabajo fueron evaluar los efectos fotodinámicos de Zinc(II) 2,9,16,23-tetra (metoxi)ftalocianina (ZnPcOCH₃) en la línea celular de laringo carcinoma humano (Hep-2) y en ratones balb/c. Se observó un alto efecto fotocitotóxico (86%) a una concentración de 0,5µM de ZnPcOCH₃ con una dosis de 29 J/cm(2) mientras que no causó toxicidad a la misma concentración en oscuridad. Los cambios provocados por TFD-ZnPcOCH₃ en la morfología celular fue apoptosis a 12 J/cm(2) y necrosis a 29 J/cm(2) (Hoechst-33258, Naranja de Acridina, Azul de Toluidina y TUNEL); tales resultados fueron corroborados por medio de la fragmentación de ADN. Las células incubadas con ZnPcOCH₃ exhibieron fluorescencia roja sugiriendo una localización lisosomal de la droga. Se observó daño parcial de lisosomas y mitocondrias 2hs y 3 hs post-TFD respectivamente (LysoTracker Green y MitoTracker Red). Los estudios farmacocinéticos en ratones Balb-c se realizaron escogiendo la vía de administración peritoneal e indicaron que ZnPcOCH₃ se acumula preferencialmente en hígado y bazo, mientras que en cerebro y piel los valores alcanzados son insignificantes. Se determinó el volumen de tumores tratados con ZnPcOCH₃ e irradiados con 70 y 140 J/cm(2) observándose una

regresión significativa del 50% y 70% del volumen respectivamente 10 días post-TFD, mientras que a 210 J/cm(2) se logró regresión total del volumen del tumor. En conclusión ZnPcOCH₃ es un eficaz agente fototerapéutico para la TFD, debido a su potencial inactivación celular in vitro y a su capacidad para inducir regresión tumoral in vivo.

- 120. (12247) TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCC) ESPONTÁNEOS EN FELINOS DOMÉSTICOS SIN OTRA OPCIÓN TERAPÉUTICA.** TRIVILLIN, VA (1); RAO, M (2); HEBER, E (1); CANTARELLI, M (2); ITOIZ, ME (1); NIGG, D (3); CALZETTA, O (4); BLAUMANN, H (4); LONGHINO, J (4); SCHWINT, AE (1)

Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica. (1)Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) (2)Centro Oncológico Veterinario (3)Idaho National Laboratory (INL), EE.UU. (4)Departamento de Ingeniería Nuclear, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

El BNCT es una terapia binaria que se basa en la incorporación selectiva de compuestos borados a las células tumorales y la subsiguiente irradiación con neutrones térmicos. La reacción de captura entre el boro (B) y los neutrones genera partículas letales de corto alcance que dañan el tumor sin daño significativo al tejido normal. Previamente demostramos el éxito terapéutico de BNCT mediada por borofenilalanina (BPA) en un modelo experimental de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla de hámster sin daño al tejido normal (Cancer Research 61:8638-8642, 2001). Habiendo demostrado la factibilidad y seguridad de BNCT de tumores espontáneos de cabeza y cuello en 3 felinos domésticos en estadio terminal a baja dosis en el Reactor RA-1 (ARI, 61, 2004), el objetivo del presente trabajo fue realizar BNCT con una fluencia térmica mayor en el RA-6 en el Centro Atómico Bariloche. Se realizó un estudio de biodistribución con BPA (300mg/Kg.) en 3 felinos domésticos con diagnóstico de CCE de larga evolución y sin opción terapéutica. Se determinó la concentración de B por ICP y se demostró que los valores absolutos en tumor, tejido normal y sangre 3 hs post-administración de BPA estaban dentro de rangos terapéuticamente útiles. Se realizó BNCT in vivo en el RA-6 mediante exposición al haz de neutrones 3 hs post-administración de BPA. Las dosis administradas al tumor y al tejido normal fueron de 10.9- 14.5 Gy eq. y de 7.0-7.6 Gy eq. respectivamente. La irradiación fue exitosa en los tres casos. No se observaron efectos radiotóxicos a nivel clínico, de análisis de laboratorio y análisis histopatológico de material de autopsia. Se observó control tumoral parcial, evidenciado por disminución en la tasa de crecimiento y necrosis parcial, y mejora en la calidad de vida durante el tiempo de sobrevida. El BNCT podría ser optimizado para el tratamiento de CCE espontáneos en felinos.

- 121. (12260) EVALUACIÓN DE LA DESMOPRESINA (DDAVP) PERIOPERATORIA EN CANINOS CON TUMORES MAMARIOS ESPONTÁNEOS.** RIPOLL, GISELLE V (1); HERMO, GUILLERMO A (2); TORRES, PERLA (3); GOBELLO, CRISTINA (2); GOMEZ, DANIEL E (1); ALONSO, DANIEL F (1)

(1) Laboratorio Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes; (2) Facultades de Ciencias Veterinarias de Universidad Nacional de La Plata y (3) Universidad Nacional de La Pampa.

DDAVP es un análogo sintético de vasopresina con propiedades hemostáticas y profibrinolíticas, utilizada en cirugías con riesgo de sangrado. Anteriormente demostramos que DDAVP despliega una acción antitumoral en un modelo murino de cáncer de mama al aplicarla durante la manipulación y extirpación de la masa tumoral primaria. En este trabajo, evaluamos la acción de DDAVP en el tratamiento quirúrgico de perras con tumores espontáneos de la glándula mamaria. Las similitudes en los meca-

nismos biológicos y diseminación de los tumores caninos y humanos proveen un sistema atractivo para la exploración de nuevas estrategias terapéuticas. Se incluyeron perras sin castración previa, con cáncer de mama localmente avanzado (estadios III-IV) con confirmación diagnóstica mediante biopsia diferenciada, los cuales fueron removidos mediante cirugía. Los animales tratados recibieron por vía endovenosa 2 dosis de 1 ug/kg de DDAVP 30 min antes y 24 hr después (n= 11), y los controles fueron inyectados sólo con el vehículo salino (n=12). Entre los tumores extirpados en los controles se encontraron 10 carcinomas, 1 osteosarcoma y 1 carcinosarcoma, mientras que entre los animales tratados fueron 9 carcinomas y 2 osteosarcomas. Un 50% (6/12) de animales control mostraron recurrencia locoregional o metástasis dentro de los primeros 3 meses luego de la cirugía, mientras que en los tratados con DDAVP se redujo a un 9% (1/11). La sobrevida libre de recaída fue significativamente mayor en los animales tratados (Control: Md 97 días versus DDAVP: Md >330 días; p=0.01 log-rank test). Estos resultados aportan evidencias acerca de la utilidad de la administración perioperatoria de la DDAVP endovenosa durante la extirpación de tumores localmente avanzados.

122. (12272) LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 SE CORRELACIONA CON LA APOPTOSIS DE LINFOCITOS ASOCIADOS A TUMOR EN BIOPSIAS DE MELANOMA HUMANO. RODRIGUEZ ZUBIETA, MARIANA; FURMAN, DAVID(1); BARRIO, MARCELA(1); BRAVO, ALICIA INÉS(2); DOMENICHINI, ENZO(3); MORDOH, JOSÉ

Fundación Instituto Leloir. Buenos Aires, Argentina. (1)Centro de Investigaciones Oncológicas, FUCA. Buenos Aires, Argentina. (2)Hospital Eva Perón, San Martín. Buenos Aires, Argentina. (3)Departamento de Patología, Instituto Alexander Fleming. Buenos Aires, Argentina.

Existen diversos mecanismos que utilizan los tumores para evadir la respuesta inmune permitiendo su progresión. Se ha demostrado que galectina-1 (gal-1) y galectina-3 (gal-3) pueden inducir la apoptosis de linfocitos T activados. Sin embargo, se ha descrito la sobreexpresión, en la matriz de melanoma, de proteasas que clivan gal-3 provocando la pérdida de su efecto apoptótico. Además, los linfocitos pueden modular la expresión de glicosiltransferasas que modifican los sitios de unión para estas lectinas, regulando la sensibilidad a la apoptosis. A pesar de que gal-1 y gal-3 pueden inducir apoptosis en linfocitos, no se ha analizado este efecto in situ considerando la complejidad del microambiente tumoral. El objetivo del presente trabajo es estudiar en biopsias de melanoma humano la correlación entre expresión de gal-1 y gal-3 y apoptosis de linfocitos asociados a tumor (LATs) mediante inmunohistoquímica e In Situ Nick Translation. Se observó correlación positiva entre la expresión de gal-3 y la apoptosis de LATs mediante el test de Spearman (p=0.001). Sin embargo, no se observó correlación entre la apoptosis de linfocitos y la presencia de gal-1 (p=0.9). Nuestros resultados confirman el efecto pro-apoptótico reportado previamente para gal-3 e indican que podría constituir un mecanismo de escape tumoral. La falta de correlación entre la expresión de gal-1 y la apoptosis de linfocitos podría ser explicada por la presencia de factores en el microambiente tumoral humano que regularían su función apoptótica. La observación de LATs apoptóticos en ausencia de expresión de gal-1 y gal-3 indican la existencia de otros factores pro-apoptóticos. Existe un entorno complejo que podría mediar el diálogo entre células tumorales y sistema inmune que debe ser considerado en futuros estudios.

123. (12286) EFECTO ANTINEOPLÁSICO DE UN COMPLEJO DE VANADILIO(IV) SOBRE CÉLULAS DEL OSTEOSARCOMA UMR106. MOLINUEVO, MARÍA SILVINA; ETCHEVERRY, SUSANA BEATRIZ; CORTIZO, ANA MARÍA

Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

En los procesos tumorales, las células malignas con capacidad metastásica deben ser capaces de migrar desde el tumor para

colonizar áreas alejadas de éste y así diseminar el proceso neoplásico. Es deseable que los fármacos con actividad antitumoral sean capaces de reducir el volumen tumoral, así como también inhibir los procesos metastásicos. El vanadio es un elemento traza, que posee propiedades antineoplásicas tanto in vitro como in vivo. Estudios en animales de experimentación demostraron que este elemento es capaz de prevenir la carcinogénesis inducida por compuestos químicos así como también de inhibir la progresión tumoral en modelos in vitro e in vivo. Previamente, nuestro grupo demostró que el complejo vanadilo(IV) / glucosa (GluVO) posee capacidad inhibitoria de la proliferación del osteosarcoma UMR106 e induce apoptosis en el mismo modelo celular. El objetivo del presente estudio es determinar la acción antitumoral de este complejo utilizando para ello ensayos destinados a evaluar la capacidad de adhesión, supervivencia y migración celular. Los resultados obtenidos muestran que 5 µM de GluVO inhibe la adhesión (65 + 6 % del basal), el spreading (60 + 5 % del basal) y la proliferación celular (evaluada como unidades formadoras de colonias, 92 % de inhibición respecto al basal, p<0,01). Por otro lado, utilizando el modelo de los esferoides, se observó que 5 µM de GluVO causa un tiempo de retraso en el crecimiento del esferoide (t [lag]) de 10 días. Además, el complejo inhibió la migración de las células desde el esferoide. En conjunto nuestros resultados indican que GluVO posee actividad antineoplásica sobre el osteosarcoma UMR106.

124. (12290) EFECTO ANTITUMORAL DE FLAVONOIDES NATURALES Y COMPUESTOS SINTÉTICOS EN LÍNEAS TUMORALES MURINAS. CARDENAS, MARIANO; BLANK, VIVIANA; MARDER, MARIEL; ROGUIN, LEONOR

IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina.

En un trabajo previo demostramos la acción antiproliferativa de un conjunto de flavonoides naturales y sintéticos sobre el crecimiento de cinco líneas de células tumorales humanas (HeLa, WISH, KB, MCF-7, SK-MEL) y dos murinas (F3II, B16). Como un primer paso en el estudio del efecto in vivo de flavonoides antitumorales, en el presente trabajo se ensayaron 12 flavonoides naturales y 24 derivados sintéticos en dos líneas tumorales de origen murino (LM3, tumor mamario; LP07, tumor pulmonar) que inducen la formación de tumores al ser transplantadas en ratones. Como control se utilizaron células NMuMG, derivadas de glándula mamaria murina normal. Los compuestos más activos en inhibir el crecimiento de las células LM3 (IC50 < 10mM) fueron el éster butírico del ácido cafeico (IC50 2±1 mM) = éster etílico del ácido cafeico (IC50 3±1 mM) = 2'-nitroflavona (IC50 4±1 mM) > 6,2'-dinitroflavona (IC50 9±3 mM). Por otro lado, en células LP07, solo el éster butírico del ácido cafeico mostró ser el derivado más efectivo (IC50 3±1 mM). Ninguno de los compuestos analizados afectó significativamente el crecimiento de las células no neoplásicas (NMuMG). Con el propósito de explorar el mecanismo de acción de los compuestos activos, evaluamos la capacidad de los mismos de inducir apoptosis. Por ensayos de citometría de flujo demostramos que el porcentaje de células hipodiploides aumenta significativamente luego de incubar las células LM3 y LP07 durante 48 y 72 horas con los correspondientes flavonoides activos. Asimismo, estos compuestos inducen un patrón de fragmentación "en escalera" del ADN cromosomal y un incremento significativo en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax. Los resultados obtenidos indican que los ésteres del ácido cafeico y los derivados nitrados de flavona se comportan como agentes antitumorales efectivos, ejerciendo una acción antimitogénica estrechamente relacionada con la inducción de apoptosis.

125. (12539) TRATAMIENTO DEL CÁNCER INDIFERENCIADO DE TIROIDES (CIT) POR LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT USANDO DOS COMPUESTOS BORADOS. DAGROSA, A; THOMASZ, L; LONGHINO, J; PERONA, M; CALZETTA, O;

BLAUMANN, H; CABRINI, R; KAHL, S; JUVENAL, G; PISAREV, M

CNEA. Deptos de Radiobiología y de Reactores(CNEA) y de Bioquímica Humana (Fac. de Medicina,UBA) y Dept. of Pharmaceutical Chemistry, UCSF, USA.

BNCT combina la captación selectiva de compuestos de boro-10 por el tumor y la irradiación del área tumoral con un haz apropiado de neutrones. El boro-11 se desintegra dando una partícula alfa y un núcleo de litio-7, que matan las células debido su alta transferencia lineal de energía (LET). El CIT es un tumor muy agresivo que no responde a los tratamientos estándares. Nuestros trabajos mostraron que la línea celular humana de CIT(ARO) capta selectivamente borofenilalanina (BPA) y que ratones transplantados con ARO tienen un 50% cura al ser tratados por BNCT. Al combinar BPA con la porfirina borada BOPP la cantidad de boro en el tumor se incrementa al doble (Molecular Pharmaceutics 2(2):151-156, 2005). El objetivo de este estudio fue explorar la respuesta al BNCT utilizando la combinación de compuestos. Ratones NIH nude fueron implantados con ARO y 14-20 días después fueron tratados: 1) controles no tratados; 2) NCT: sólo neutrones; 3) BPA + irradiación 4) BPA+BOPP + irradiación. Tiempo de irradiación: neutrones termalizados (RA-6) durante 83,4 min (fluencia 1.6×10^{12} n/cm²). El volumen tumoral fue medido durante 1 mes después de la irradiación. Resultados: controles: continuo crecimiento del tumor; NCT: parcial retardo del crecimiento; grupos 3 y 4: completa inhibición en el crecimiento en el 100% de los animales. Cuando el volumen tumoral inicial fue menor a 50 mm³ se observó una regresión completa en 1/4 ratones del grupo BPA y 7/7 del grupo BPA+BOPP. El uso simultáneo de dos compuestos borados mejora la eficacia de la terapia, abriendo una nueva posibilidad para el tratamiento del CIT.

ONCOLOGIA B

126. (12411) ASOCIACIÓN DE MASTOCITOS Y DENSIDAD DE MICROVASOS EN CÁNCER DE PULMÓN. BELLIDO, MARIANA; PURICELLI, L(2); DALURZO, L(3); SMITH, D(3); LASTIRI, J(3); VASALLO, B(3); PALLOTA, G(3); LAURIA, L(1)

(1) DBBE, FCEN, UBA (2) Htal. AH Roffo (3) Htal. Italiano

Los mastocitos (MC) se acumulan en tumores sólidos asociados generalmente a zonas de neovascularización y presentan inmunoreactividad a triptasa y quimasa (MCq) o solo a triptasa (MCt). Objetivo: analizar la expresión de MCt, MCq y la densidad de microvasos (MDV) en 29 pacientes con cáncer de pulmón. Las muestras quirúrgicas se inmunomarcaron con Ab monoclonales, se cuantificaron a 100 X en cortes histológicos, y los recuentos se expresaron como la $X \pm DS$ de 5 campos de 0,24mm². Los datos se analizaron en función de los parámetros clínico-patológicos relevantes, incluyendo supervivencia global. Se observó mayor expresión de MCt que de MCq ($X \pm DS$: MCt 23,99 \pm 8,6 vs MCq 6,67 \pm 3,9; MW test $p < 0,001$). Los MCq localizaron especialmente en el conectivo asociado a bronquios y vasos sanguíneos mayores. No se observó asociación entre los distintos marcadores ni entre ellos y el estadio, tipo histológico, T, N y presencia de células tumorales en el lavado pleural. Así, la variación de los MCt en relación al parámetro T es: T1: 23,15 \pm 10,1 (n=11) y T2: 24,5 \pm 7,8 (n=18). El estudio de correlación demostró solamente asociación significativa entre el número de MCt y el estadio (Pearson $p < 0,05$). Para el análisis de supervivencia los pacientes se dividieron en 2 grupos: con valores altos y bajos respecto de la media para cada marcador. El análisis univariado demostró que pacientes con valores bajos de MCt presentaron un mejor pronóstico (Log-rank test, 5,1; $p = 0,02$). Sin embargo, el estudio de Cox indicó que no puede considerarse un marcador pronóstico independiente. Concluimos que los MCq se encontraron escasamente representados en el tejido tumoral de pulmón. Los MCt podrían jugar un rol protagónico en la progresión tumoral y aun-

que un alto número asoció a una marcada disminución de la supervivencia, no pudo considerarse un marcador independiente de pronóstico. Por otro lado, la acción de los MC parecería no estar relacionada con la potenciación de la angiogénesis.

127. (12436) EFECTO DEL YOGURT DE SOJA SUPLEMENTADO CON ISOFLAVONAS (Y), SOBRE: CRECIMIENTO, METÁSTASIS ESPONTÁNEAS Y EXPERIMENTALES DE 4 TUMORES MURINOS: 3 DE MAMA (LM2, LM3, LM38) Y 1 DE PULMÓN (LP07). COLOMBO, LUCAS LUIS; FONT DE VALDEZ, GRACIELA (2); ROSSI, ELIZEU A.(3); ZEPPONE-CARLOS, IRACILDA (4)

Inst. Roffo. 2-CERELA-Tucumán, 3-Dpts Alim. Nutri. y 4-Anal. Clin., FCF-UNESP, Araraquara, Brasil

Introducción: Muchos trabajos encuentran en la soja y sus derivados efectos protectores sobre tumores, sobre todo de mama y próstata, debido principalmente a las Isoflavonas. Material y métodos: Ratones BALB/c de ambos sexos (promedio 10 por grupo), recibieron todas las noches 0,5 (hembras) ó 0,75 (machos) ml del Y, por sonda gástrica rígida, hasta su sacrificio. Los controles (C) se sondaron sin ningún producto. A los 10 días, recibieron e.v. en cola, o sc en flanco, alguna de las líneas tumorales. En los inoculados ev, se registró a los 21 días el N° y tamaño (T) de las metástasis pulmonares experimentales (MtEx). Los tumores sc, fueron extirpados alrededor de los 8 mm de diámetro. Se dejó evolucionar por 21 días más, para evaluar las metástasis espontáneas. Resultados: Con respecto a las MtEx, en la línea LM38, el Y disminuyó significativamente su N°: (Mediana (rango)) C: 92 (70-108) Vs Y: 53 (35-80) $p < 0,001$, y T: % MtEx>1mm: C: 20,4 (0,3-29,3) Vs Y: 12,9 (6,5-20,8) $p < 0,05$. En la línea LM3, aumentó significativamente su N°: C: 62 (14-120), Y: 96 (28-138) $p = 0,05$, y T: % MtEx>1,5mm: C: 0 (0-1,5), Y: 2,1 (0-6,5), $p < 0,01$. En la línea LM2, no produjo variaciones significativas. En el adenocarcinoma de pulmón LP07, no varió su N° pero sí disminuyó su T: ratones con más de 2 MtEx>1,5mm: C: 5 de 10, Y: 0 de 10. $p < 0,05$ (Fisher). Los crecimientos subcutáneos y las metástasis espontáneas, no tuvieron diferencias significativas en ninguna de las 4 líneas tumorales testeadas. Conclusión: Caben destacar los efectos diferentes y hasta opuestos del mismo tratamiento en tumores diferentes, aunque sean de un mismo origen (3 de ellos son de mama), y que el efecto varía si la misma línea celular está creciendo dentro del subcutáneo, como metástasis pulmonar espontánea o como metástasis pulmonar experimental.

128. (12463) CRECIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES MARIARIAS HUMANAS EN RATONES INMUNODEFICIENTES. BRUZZONE, ARIANA; VANZULLI, SILVIA; LUTHY, ISABEL

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Academia Nacional de Medicina

Las líneas epiteliales tumorales mamarias humanas desarrolladas en el laboratorio, IBH-4, IBH-6 e IBH-7 se mantuvieron con medio DMEM-F12 10% SFB. Se trataron con tripsina 0.25%-EDTA 0.02%, se resuspendieron 1×10^7 células y se inyectaron sc en ratones NUDE (N:NIH(S)-nu) hembras vírgenes adultas. Los pasajes sc del tumor se realizaron con trocar. Para evaluar los requerimientos hormonales, se colocaron "pellets" de 0.5 mg estradiol E2 y de MPA depósito. Se calculó el volumen tumoral como $4/3\pi r^3$ radio menor(2)³ radio mayor. IBH-4 forma tumores en presencia y en ausencia de hormonas exógenas. Son tumores altamente indiferenciados, con abundante componente fusocelular y poblaciones poligonales, altamente angiogénicas y con un alto índice mitótico. El tamaño a los 30 días en ausencia de hormonas aumenta paulatinamente con los sucesivos pasajes: 2668 \pm 290 para el 1° vs. 9056 \pm 1035 mm³ para el 2do, $p < 0,001$. La tasa de crecimiento para las células es 0.03, 1° pasaje 0.07 y 2do pasaje 0.1 log mm³/día. Esta línea produce metástasis pulmonar y ganglionar. IBH-6, si bien crece en ausencia de hormonas, su cre-

ALVAREZ, MARIANO; CELI, DANIELA; SERRA, CINTIA; PITOSI, FERNANDO(1); PODHAJECER, OSVALDO(1)

Gentron LLC. Instituto Leloir

El análisis de la transcripción de genes a través del uso de los Microarreglos de ADN es una herramienta fundamental para el estudio de la Genómica Funcional. El uso de esta tecnología requiere la optimización de todos los pasos involucrados en el proceso de la obtención de datos. Existen protocolos alternativos para cada una de estas etapas con gran influencia en el resultado final. El objetivo de este trabajo fue estudiar minuciosamente las diversas alternativas en cada una de estas etapas, para maximizar la calidad de los datos obtenidos. En este trabajo se describen las variables más importantes para, la impresión de los microarreglos, la marcación de las secuencias blanco, la amplificación de ARN y la hibridación. El resultado fue digitalizado mediante un escáner confocal. Los datos obtenidos fueron normalizados mediante distintos métodos incluyendo uno desarrollado en nuestro laboratorio. Los diseños experimentales fueron analizados mediante diferentes métodos estadísticos: prueba de t-student y SAM (Statistical Analysis of Microarrays), ANOVA y limma (Linear models for Microarray Data). Finalmente utilizamos métodos de clasificación supervisada y no supervisada (análisis de clusters jerárquico) para evaluar la presencia de firmas moleculares que serán discutidos en la presentación. La combinación de DMSO 50% como buffer de impresión sobre una superficie de aminosilano a una humedad relativa entre 45-50% fue la que generó spots de mejor calidad. La obtención de secuencias blanco marcadas puede ser realizada tanto a partir de ARN Total como de ARN poly A+, sin que se vea afectada la calidad de las mismas. El rango dinámico es maximizado, al hacer digitalizaciones sucesivas sobre el mismo microarreglo, variando en cada una de ellas la sensibilidad del equipo. El método de normalización más eficiente resultó ser el 3D, desarrollado en nuestro laboratorio. Es indispensable un diseño correcto de "Dye Swap" para garantizar la calidad en el resultado final del experimento.

133. (12538) LOS RECEPTORES ACTIVADORES DE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS DE SUBTIPO GAMMA (PPARG) ESTAN IMPLICADOS EN LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE VEJIGA (CAV) INDUCIDA POR BCG. LODILLINSKY, CATALINA; UMEREZ, MARIA SOL ; ALVAREZ, VALERIA; SANDES, EDUARDO; EIJÁN, ANA MARIA

Área Investigaciones, Instituto de Oncología A. H. Roffo, Av. San Martín 5481, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Introducción: BCG es la inmunoterapia efectiva para el carcinoma in situ y el superficial de alto grado. El mecanismo de acción implica una actividad inmunológica y un efecto directo sobre la célula tumoral que es menos conocido. Anteriormente observamos que BCG induce la inhibición del crecimiento de células de CaV, y la expresión de PPAR g in vitro e in vivo. Objetivo: Evaluar si PPARg media la acción de BCG en CaV in vivo e in vitro. Materiales y Métodos: 1x10⁴ células humanas T24 y murinas MB49 sembradas en placas de 96 hoyos en presencia BCG (2 mg/ml) se tratan durante 48 h con distintas concentraciones de PGJ-2 (0.1, 1, 10 y 50 uM) ligando natural de PPARg con o sin el antagonista BADGE (40 uM). El crecimiento celular se evaluó con MTS (porcentaje del control). In vivo se evaluó el crecimiento de tumores generados por inoculación sc de 5x10⁵ células MB49 en ratones C57BL/J6 bajo tratamiento con BCG (2 mg/ml) combinado o no con BADGE. Significación estadística ANOVA Bonferroni. Resultados: In vitro: La PGJ-2 potencia la muerte celular inducida por BCG en un 40% para T24 y 20% para MB49 (p<0.01) mientras que no tiene efecto en ausencia de BCG. Este efecto es bloqueado en un 50% por BADGE (p<0.05). BADGE en ausencia de PGJ2 disminuye 20% (p<0.05) la muerte celular inducida por BCG. In vivo: El BADGE revirtió parcialmente el efecto inhibitorio de BCG tanto en tamaño promedio como en velocidad de crecimiento. Tamaño : CONTROL: 16 m 7 mm; BCG: 3 m 1 mm; BCG+BADGE:9m 5.7mm; velocidad de crecimiento: CON-

TROL: 1.27m 0.47 mm/día; BCG: 0.09 m 0.09 mm/día; BCG+BADGE: 0.53m 0.3 mm/día. Nuestros resultados muestran que la activación de PPARg es una vía de activación de muerte de células de CaV. Dado que BADGE revierte la inducción de muerte por BCG en ausencia de PGJ2, sugerimos que una de las vías intracelulares utilizadas por BCG sería la activación de los receptores nucleares PPARg.

134. (12654) M1-GPCR UTILIZA VÍAS ALTERNATIVAS PARA INDUCIR LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN C-FOS Y MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES SOBRE LA PROTEÍNA C-FOS. TANOS, TAMARA(1); POBLITI, LUCRECIA(1); GUTKIND, SILVIO(2); MARINISSEN, MARIA JULIA(3); COSO, OMAR(1)

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. FCEN - UBA. Argentina 1) Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. FCEN - UBA. Argentina. 2) Oral and Pharyngeal Cancer Branch. NIDCR - NIH, Bethesda MD 20892, USA. 3) Facultad de Medicina, UAM-CSIC, Madrid 28029, Spain.

El receptor muscarínico de tipo 1 (m1) es un receptor asociado a proteínas G heterotrimericas (GPCR) cuya activación promueve la duplicación de células NIH3T3 que lo expresan establemente (NIH-m1.2). Fos y Jun son proteínas codificadas por genes de respuesta temprana a señales mitogénicas y su actividad transcripcional es finamente regulada por modificaciones post-traduccionales que modulan su capacidad transactivadora. La expresión y posterior transactivación mediante fosforilación de c-Jun, son rápidamente activadas por m1 por medio de la MAPK JNK. La activación de m1 también induce la expresión de c-fos. Sin embargo, el rol de las MAPKs en el control de la regulación de la expresión génica y de las modificaciones post-traduccionales que sufre c-Fos por señales mitogénicas, no están claramente definidos. Utilizando como modelo experimental células NIH-m1.2 estimuladas con el agonista específico carbacol estudiamos la regulación de c-Fos inducida por m1. Los resultados indican que carbacol induce la activación de varias MAPKs (ERK1/2, p38s, ERK5 y JNK), sin embargo, la transcripción de c-fos y el subsecuente aumento de la proteína c-Fos solo dependen de la activación de ERK1/2. Notoriamente, y a pesar de que varios estudios indican la participación de MAPKs en la fosforilación de c-Fos, nuestros ensayos en células tratadas con carbacol en presencia de los inhibidores para MEK/ERK1/2, o para las vías de p38 a/b y JNK muestran que la modificación post-traduccionales de c-Fos inducida por m1 no es dependiente de la actividad de las MAPKs clásicas. En conclusión, los datos sugieren que el receptor m1 utiliza señales alternativas para activar el promotor de c-fos y para inducir modificaciones post-traduccionales sobre la proteína c-Fos.

135. (12558) ESTUDIO DEL EFECTO DE TÓXICOS TIPO DIOXINA SOBRE LÍNEAS CELULARES DE MAMA NORMALES Y NEOPLÁSICAS. GARCÍA, MARÍA ALEJANDRA; COCCA, CLAUDIA (2); KLEIMAN, DIANA L (1); BERGOC, ROSA (2); RANDI, ANDREA (1)

Dto Bioquímica Humana, Fac Medicina. (2) Radioisótopos, Fac Farmacia y Bioquímica, Univ Buenos Aires

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado productor de cáncer tiroideo y hepático. Los estrógenos y Factores de Crecimiento Insulino-símiles (IGFs) estimulan la proliferación celular y sus caminos en células de mama están interrelacionados. Demostramos in vivo que el HCB aumenta el desarrollo de tumores mamarios inducidos en ratas y altera la transducción de señales de receptores de IGFs. Objetivo: estudiar el mecanismo de acción del HCB en líneas celulares de mama normales (HBL-100) y neoplásicas (MCF-7, receptor de estrógenos positivas (RE+) y MDA-MB231, RE negativas -) sobre: 1) proliferación celular y 2) niveles de expresión de RIGF-I y sustrato del receptor de insulina (IRS-1) y su fosforilación. Metodología: las células mantenidas en RPMI con 1% antibiótico-antimicótico, glutamina y 10% SFB se expusieron al HCB disuel-

to en etanol (Control, EtOH, HCB: 0.005, 0.05, 0.5 y 5 μ M). Para proliferación, se sembraron 1200 células, se cultivaron durante 7 días y se contó el N° de colonias; para estudio de receptores se expusieron al HCB durante 24 hs y se analizaron los microsomas por inmunoblot. Resultados: El HCB 0.05 μ M estimuló la proliferación en células MCF-7 (432%, $p < 0.001$) pero no tuvo efecto en células HBL-100 ni MDA-MB231. Los niveles de RIGF-I y IRS-1 mostraron una tendencia a la disminución con el HCB 0.5 μ M vs. EtOH en células HBL-100 (RIGF-I=71.04 \pm 11.7 vs. 103 \pm 1.53; IRS-1=74.65 \pm 12.9 vs. 101 \pm 0.5); en células MCF-7 el HCB 0.5 μ M disminuyó significativamente los niveles de RIGF-I (76.8 \pm 4.82 vs. 100.25 \pm 0.85, $p < 0.01$); así como el IRS-1 con HCB 0.005 μ M (46.75 \pm 17.13 vs. 100 \pm 1.15, $p < 0.05$), mientras que no se observaron cambios en las MDA-MB231. La fosforilación del IRS-1 disminuyó en las HBL-100, aumentó en las MCF-7 y no tuvo cambios en las MDA-MB231. El HCB afecta la proliferación celular y la expresión de los RIGF-I e IRS-1 sólo en células neoplásicas RE +. En células normales modificó los receptores y en células neoplásicas RE- no tuvo efecto.

136. (12584) EL FACTOR INHIBITORIO DE LEUCEMIAS (LIF) ES EL RESPONSABLE DE ACTIVAR A STAT3 EN TUMORES MAMARIOS MURINOS. QUAGLINO, ANA (1,2); SCHERE-LEVY, CAROLINA (1,2); MEISS, ROBERTO (2); KORDON, EDITH (1,2)

(1) LEGMA - IFIBYNE-CONICET, FCEyN - UBA. (2) IHEMA e IEO, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Existen numerosos reportes que indican que el factor de transcripción STAT3 está constitutivamente activado en células de cáncer de mama humano. Por otro lado, hemos mostrado que tumores mamarios inducidos por el virus del tumor mamario del ratón (MMTV) presentan altos niveles de expresión del Factor Inhibitorio de Leucemias (LIF), de su receptor (LIF-R) y de activación constitutiva de STAT3. En cambio, las células tumorales murinas LM3 que expresan bajos niveles de LIF-R, presentan baja activación constitutiva de STAT3 a pesar de exhibir altos niveles de LIF. Nuestros resultados actuales muestran que por inmunohistoquímica los tumores mamarios inducidos por MMTV presentan localización nuclear de STAT3, mientras que tumores LM3 presentan localización fundamentalmente citoplasmática. A partir de estos resultados, nos preguntamos si LIF, actuando de manera autócrina/parácrina, sería el responsable de la activación de STAT3 en tumores mamarios murinos. El presente trabajo muestra que el tratamiento con LIF induce la activación de STAT3 tanto en células normales (HC11) como en cultivos primarios de tumores inducidos por MMTV. Sin embargo, tal efecto no se detecta en células LM3. De manera similar, el sobrenadante del cultivo primario de tumores mamarios induce la fosforilación de STAT3 tanto en células HC11 como en tumores inducidos por MMTV pero no lo hace en células LM3. En los dos primeros casos, dicha activación fue bloqueada por el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-LIF. Concluimos entonces que, de manera similar a lo demostrado en la glándula mamaria normal, el LIF expresado localmente sería responsable de la activación de STAT3 en tumores mamarios murinos.

ONCOLOGIA C

137. (12588) PARTICIPACIÓN DE LA TROMBOSPONDINA-1 EN LA PROGRESIÓN TUMORAL Y EN EL DESARROLLO DE LA MAMA NORMAL DEL RATÓN. ZIMBERLIN, MARIA NOEL; GATTELLI, ALBANA; KORDON, EDITH

IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA.

El virus del tumor mamario del ratón (MMTV) induce tumores por mutagénesis insercional. Anteriormente, habíamos reportado que, por la técnica de I-PCR, pudimos aislar y clonar 10 sitios de

inserción viral en tumores inducidos por MMTV. Una de las mutaciones encontradas correspondía a una inserción 2Kb río arriba del inicio de la secuencia codificante de la trombospodina -1 (TSP-1), en sentido opuesto al sentido de transcripción. El objetivo del presente trabajo fue investigar la relevancia de esta mutación en el desarrollo de los tumores mamarios. En primer lugar confirmamos la presencia de la inserción en el genoma tumoral por análisis de PCR y por ensayos de Southern blot. Además, por RT-PCR en Tiempo Real, hallamos que los tumores que presentaban esta mutación mostraban sobre-expresión de TSP-1, confirmando la actividad de "enhancer" ejercida por las secuencias de MMTV-LTR en la posición indicada. Se sabe que TSP-1 tiene un efecto antiangiogénico, produciendo la apoptosis de células endoteliales. Sin embargo, no se reportó su rol biológico en la glándula mamaria. Para descifrar las consecuencias biológicas de la sobre-expresión de esta proteína, analizamos el perfil de expresión de la TSP-1 durante el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria in vivo. Por análisis de RT-PCR en Tiempo Real hallamos expresión de este gen en mamas de hembras vírgenes y preñadas. Sin embargo, los niveles de TSP-1 descendieron a niveles prácticamente indetectable durante el período de amantamiento. Por otro lado, los máximos niveles de expresión se alcanzaron durante la involución mamaria. Estos resultados sugieren que la TSP-1 podría ser relevante para el desarrollo tumoral mamario y muestra, por primera vez, que su expresión estaría modulada por factores hormonales o funcionales durante el desarrollo mamario. Esta regulación podría estar indicando la relevancia de procesos de neovascularización durante el proceso de desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria.

138. (12596) PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO RETINOICO (ATRA) Y SUS RECEPTORES RAR EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DE LÍNEAS TUMORALES MURINAS. TODARO, L (1); VELOSO, M (1); FARIAS, E (2); CAMPODÓNICO, P (1); MIRA-LÓPEZ, R (2); PURICELLI, L (1); BAL DE KIER JOFFÉ, E (1)

(1) Área Investigación. Instituto de Oncología A. H. Roffo. Bs. As., Argentina. (2) Dpt. of Medicine, Mount Siani School of Medicine, NY, USA.

Previamente demostramos que ATRA inhibe la proliferación de las líneas tumorales mamarias LM38-RB (cél epiteliales y mioepiteliales), LM38-RA (epitelioides) y LM38-D2 (clon mioepitelial), y de pulmón LP07. El objetivo actual fue evaluar la expresión de los RARs y el efecto del ATRA sobre propiedades relevantes en la progresión tumoral. In vivo se estudió si ATRA modula la capacidad metastásica de LM38-RB. Mediante WB e IF determinamos que todas las líneas mamarias expresaron RAR beta, pero no gama. Sólo LM38-D2 expresó RAR alfa y LP07 RAR alfa y beta. En LM38-RB el tratamiento con ATRA (A) (5 días, 1 μ M) disminuyó en 64% ($p < 0,05$) la migración respecto del control (C) (ensayo de wound). ATRA indujo un aumento en la expresión de cadherina-E de membrana en las células luminales y redujo la actividad secretada de MMP-9 (zimografía, C: 1,19 \pm 0,04 vs A: 0,18 \pm 0,08 UA/mg prot, $p < 0,05$), y de uPA (caseinólisis radial, C: 2,08 \pm 0,33 vs A: 0,49 \pm 0,11 UI/mg prot, $p < 0,05$). In vivo, el tratamiento con ATRA disminuyó el número de metástasis experimentales [C: 11 (3-27) vs A: 5 (0-11) Md y rango, $p < 0,05$]. ATRA no moduló la migración de LM38-RA ni de LM38-D2. Sin embargo, en LM38-D2 disminuyó la actividad de MMP-9 (C: 1,79 \pm 0,02 vs A: 0,33 \pm 0,02 UA/mg prot, $p < 0,05$) y de uPA (C: 1,92 \pm 0,75 vs A: 0,03 \pm 0,01 UI/mg prot, $p < 0,05$). Por otro lado, en la línea de adenocarcinoma de pulmón LP07, ATRA indujo un aumento en la expresión de cadherina-E, una disminución de la actividad de uPA (C: 1,59 \pm 0,24 vs A: 0,39 \pm 0,10 UI/mg prot, $p < 0,05$), pero no afectó la migración. Estos resultados sugieren que la respuesta al ATRA dependería en gran medida del tipo tumoral. En LM38 sería necesaria la interacción entre las células epiteliales y mioepiteliales para que ATRA inhiba la migración. Por otro lado, una menor actividad de enzimas claves en invasión podría asociarse a la menor capacidad metastásica de LM38-RB. (FIRCA 1 R03 TW007207-01).

- 139. (12634) TRATAMIENTO DE TUMORES ESTABLECIDOS UTILIZANDO UNA CEPA ATENUADA DE SALMONELLA TYPHI EN FORMA INTRATUMORAL.** BALBOA, LUCIANA (1); GRAVISACO, MARIA JOSE (1); COLOMBO, LUCAS (2); VENDRELL, ALEJANDRINA (1); DE LUCA, PAOLA (1); MONGINI, CLAUDIA (1); WALDNER, CLAUDIA (1)

CEFyBO - CONICET, Facultad de Medicina - UBA. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET), Fac. Med. UBA (1). Instituto Roffo, Buenos Aires (2).

Recientemente, se ha demostrado que es posible incrementar el acceso de células efectoras del sistema inmune al tumor, induciendo un estado inflamatorio dentro del microambiente tumoral. En estudios previos hemos demostrado que una cepa vacunal de *Salmonella typhi* atenuada inoculada por vía de mucosas y en forma intratumoral (i.t), induce un claro efecto antitumoral en ratones portadores de un linfoma T murino (LBC). El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto antitumoral de esta cepa bacteriana inoculada en forma i.t en un modelo de tumor mamario murino (LM3). Lotes de 9 ratones BALB/c portadores de tumores LM3 subcutáneos [0.1- 0.5 cm(3)] fueron inoculados, en forma i.t, con 1×10^8 UFC o PBS. Se midió el tamaño de los tumores de los animales en diferentes días post-inoculación. Se realizaron ensayos in vitro de invasión de las bacterias a las células tumorales y luego se cuantificaron las bacterias intracelulares. Esta cepa vacunal inoculada en forma i.t disminuye significativamente el crecimiento del tumor LM3; por ej. luego de 18 días de inoculada la bacteria, los tumores tratados aumentaron su volumen sólo 7.7 (2.6-15) veces [mediana (rango)] respecto a los controles que lo hicieron 14.0 (10-20) veces, $p < 0.005$ (Mann-Whitney test). Además, determinamos que las bacterias son capaces de infectar in vitro a las células tumorales y que pueden permanecer viables dentro de la masa tumoral luego de 22 días de haber sido inoculadas. Concluimos que la cepa atenuada de *Salmonella typhi* invade a las células tumorales LM3, es capaz de sobrevivir dentro de la masa tumoral en los animales tratados y consecuentemente de inhibir el crecimiento de dicho tumor mamario murino. Estos resultados y los anteriormente descriptos para el linfoma LBC, sugieren que esta cepa vacunal podría ser utilizada en terapias antitumorales aplicables a tumores de diferente histología, al inducir per se una actividad antitumoral.

- 140. (12650) CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR LM05, DERIVADA DE UN TUMOR DE MAMA MURINO ESTRÓGENO DEPENDIENTE.** PONTIGGIA, OSVALDO ; SIMIAN, MARINA; RODRIGUEZ, VANINA; FISZMAN, GABRIEL; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA

Instituto de Oncología Angel H. Roffo

A partir de un pasaje subcutáneo del tumor de mama murino M05, que presenta un comportamiento estrógeno dependiente y es positivo para receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), se generó la línea celular continua LM05-Mix que presenta una población fibroblastoide y otra epitelial. La clonación de las mismas ha llevado a su vez a la generación de las líneas denominadas LM05-F y LM05-E respectivamente. Hemos comenzado la caracterización de los tipos celulares que componen estas líneas celulares con los siguientes resultados: la población que forma islotes de células de aspecto cuboide, es positiva para citoqueratinas (CK) y E-cadherina, marcadores característicos de tejidos epiteliales. Un análisis más fino del islote epitelial permite distinguir una subpoblación positiva para CK 14, y escasas células que expresan CK 18. Por otra parte las células de aspecto fibroblastoide son positivas para vimentina, actina de músculo liso y negativas para E-cadherina y CK. Se observa deposición de los componentes de membrana basal colágeno IV, laminina y fibronectina en la interfase que separa ambos tipos celulares Dado que esta línea celular deriva de un tumor estrógeno dependien-

te, se analizó la presencia de RE de tipo alfa y beta y de RP por inmunofluorescencia. Se encontró una marcación nuclear positiva para RE alfa y RP en la población epitelial; RE beta sólo marcó positivamente el citoplasma de la población fibroblastoide. Al inocular las tres líneas s.c. en ratones hembra y macho BALB/c se encontró que la línea LM05-Mix generó tumores sólo en ratones hembra, mientras que la LM05-F fue tumorigénica en hembras y machos. Por último, hasta los 60 días post inoculación no crecieron tumores en los ratones inyectados con la línea LM05-E. Las características del modelo tumoral murino LM05 sugieren que el mismo puede ser una herramienta original y útil para el estudio de los mecanismos involucrados en el crecimiento de tumores de mama estrógeno dependientes.

- 141. (12672) ESTUDIO DE LOS EVENTOS ASOCIADOS A LA RESPUESTA DE UN TUMOR MAMARIO MURINO ESTRÓGENO DEPENDIENTE A LA TERAPIA HORMONAL.** SIMIAN, MARINA; PONTIGGIA, OSVALDO; RODRIGUEZ, VANINA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA

Instituto de Oncología Angel H. Roffo

El adenocarcinoma mamario murino estrógeno dependiente M05, que expresa receptores de estrógeno y progesterona, surgió espontáneamente en una hembra virgen BALB/c en el bioterio del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo". Antes se demostró que el tratamiento por ovariectomía o con tamoxifeno llevaba al estancamiento del crecimiento tumoral. Los objetivos de este trabajo fueron investigar los eventos involucrados en la respuesta a la terapia hormonal, y determinar si la falta de crecimiento tumoral se debe sólo a citostasis o si se trata de un proceso más complejo. El análisis de los tumores teñidos con H & E reveló un aumento del componente estromal y pérdida del parénquima epitelial en las muestras tratadas. Para comprender los cambios observados se realizaron estudios de IF en cortes por congelación de tumores provenientes de hembras tratadas y controles. Se detectaron islotes epiteliales positivos para E-cadherina y citoqueratina (CK)18, rodeados de células basales mioepiteliales positivas para CK14. A su vez, la población celular estromal resultó vimentina positiva. El análisis de la matriz extracelular reveló la presencia de los componentes de membrana basal colágeno IV, laminina y fibronectina rodeando a los islotes epiteliales. Sólo en la cápsula que rodea al tumor se detectó la presencia de los colágenos estromales I y III. En las muestras tratadas por ovariectomía se detectó una disminución de células E-cadherina y CK18 positivas, con aumento de células estromales. Por otra parte la alteración estructural del tejido fue evidenciada por el cambio en la disposición de los componentes de membrana basal, que perdieron su patrón original, aumentando su deposición en los sitios antes ocupados por el parénquima tumoral. Nuestro trabajo demuestra que el estancamiento del crecimiento tumoral inducido por la terapia hormonal es un proceso dinámico que involucra una fuerte reacción estromal, la cual podría constituir un novedoso blanco terapéutico.

- 142. (12675) TERAPIA METRONÓMICA ANTITUMORAL CON CICLOFOSFAMIDA ADMINISTRADA POR VIA ORAL EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO (M-234P).** MAINETTI, LEANDRO E (1) (*); ROZADOS, VIVIANA R (1) (*); BONFIL, R. DANIEL (2); MATAR, PABLO (1); SCHAROVSKY, O. GRACIELA (1)

(Contribuyeron igualmente; (1) Inst Genética Experimental, Facultad Cs. Médicas, U.N.R. Rosario. (2) Wayne State University School of Medicine and Karmanos Cancer Inst, Detroit, MI, USA*

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antitumoral y la toxicidad de la administración crónica de Ciclofosfamida (Cy), en dosis bajas, sin períodos de descanso (terapia metronómica) en un modelo de adenocarcinoma mamario murino (M-234p). Ratones hembras endocriados de la cepa Balb/c fueron desafiados vía s.c. con M-234p (Día 0) y luego se dis-

tribuyeron en dos grupos: I) Testigos (n=12) y II) Tratados (n=11), que recibieron Cy en agua de bebida, desde el día 8 hasta el final del experimento, en una dosis aproximada de 30mg/kg/día. Se determinó el tamaño tumoral y el peso corporal, dos veces por semana. Se extrajo sangre en los días 0, 15 y 30 para determinar uremia y creatininemia y se evaluó la curva de supervivencia (Kaplan-Meier). El volumen tumoral en el grupo I fue mayor que en el II, en los días 21 ($p<0.05$), 24, 31 y 35 ($p<0.01$) [Día 24 (mm³, media \pm ES), I): 3083,7 \pm 629,8; II): 1052,1 \pm 202,7]. Se observó un aumento de la supervivencia en II comparado con I ($p<0.05$). No se observaron diferencias en el peso corporal. La uremia aumentó continuamente en el grupo I (Día 0 vs Día 40, $p<0.01$), mientras que en el II, no sufrió cambios que indicaran toxicidad (Día 0 vs Día 40 $p>0.05$); la creatininemia mostró un comportamiento similar. Estos resultados demuestran que el tratamiento carece de toxicidad general y renal. Resultados similares se obtuvieron con otro adenocarcinoma de mama. Con el fin de evaluar el mecanismo de acción del tratamiento se está realizando la detección inmunohistoquímica para el marcador vascular CD34. El efecto antitumoral y la ausencia de toxicidad de la terapia metronómica con Cy por vía oral sugieren su aplicación como terapia de intervención crónica no invasiva en el tratamiento de tumores humanos.

143. (12679) IMPLICANCIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA TIPO1 (TGFB1) EN LA PROGRESIÓN TUMORAL DE LA LÍNEA DE CARCINOMA DE PULMÓN MURINO LP07. VAZQUEZ, PAULA; COLOMBO, LUCAS; PETERS, MARÍA GISELLE; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; PURICELLI, LYDIA

Instituto de Oncología Angel H Roffo

TGFB1 es capaz de regular proliferación, migración y muerte celular. Se postuló que TGFB1 podría tener un rol dual y antagónico en cáncer. Anteriormente determinamos que las células LP07 expresan los receptores TBRI y TBRII para TGFB, y que estos son funcionales. Nuestro objetivo actual fue estudiar en LP07 de repique alto (RA, R30-40), muy metastásico, y de repique bajo (RB, R3-10), menos metastásico: 1-la capacidad de TGFB de modular propiedades asociadas con la progresión maligna (proliferación, clonogenicidad y remodelación del citoesqueleto) y 2- el efecto de TGFB sobre el desarrollo metastásico in vivo, analizando las vías implicadas. El tratamiento in vitro con TGFB exógeno (0,01-10 ng/ml) inhibió la proliferación celular en forma dosis dependiente, cuantificado mediante la incorporación de TdH3, siendo RB más sensible que RA ($p<0.05$). Por otro lado, TGFB (4ng/ml) disminuyó significativamente la clonogenicidad (Control: 253 \pm 1,4 vs TGFB: 8 \pm 4,2 colonias/petri). Además, el tratamiento por 24h con TGFB indujo en LP07 (RA y RB) un aumento y redistribución de la molécula de adhesión E-caderina y su contraparte intracitoplasmática B-catenina, observado por IF, mientras que no moduló el citoesqueleto de actina. En ensayos in vivo se demostró que las células LP07 (RA y RB) pretratadas en cultivo con TGFB (4ng/ml) durante 24h y luego inyectadas i.v. a ratones BALB/c produjeron más metástasis que sus controles no tratados [LP07-RA Controles: 50(1-90) vs TGFB: Md 99 (rango 27-229), $p<0.05$]. Esta estimulación pudo ser revertida cuando se empleó un inhibidor farmacológico de la vía de MAPK (PD 98059) no canónica para TGFB. Las células LP07-RA, más metastásicas, son más resistentes que las RB al efecto antiproliferativo in vitro del TGFB. Sin embargo ambas responden a TGFB exógeno, con participación de la vía MAPK, aumentando su capacidad metastásica in vivo otorgándole a TGFB un rol promotor en la progresión tumoral.

144. (12686) DROGAS POLIMERICAS EN LA TERAPIA FOTODINAMICA DE TUMORES. DI VENOSA, GABRIELA(1); CASAS, ADRIANA (1); MAC ROBERT, ALEXANDER (3); BATTAH, SINAN (3); BATTLE, ALCIRA (1); FUKUDA, HAYDÉE (1,2)

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, Hospital de Clínicas, UBA-CONICET. 2) Departamento de

Química Biológica, FCEN-UBA; 3) National Medical Laser Centre, Royal Free and University College Medical School, London, UK

La terapia fotodinámica de tumores empleando ácido 5-aminolevulínico (ALA), ha cobrado gran interés en años recientes. En la búsqueda de estrategias para aumentar su eficacia son atractivos compuestos poliméricos hiper-ramificados como los dendrímeros, pues permiten conjugar el compuesto con varias moléculas de ALA. En este trabajo evaluamos in vitro e in vivo la eficacia del dendrímero con 18 moléculas de ALA (Den18mer, 1,3,5-Tris[N-[N-[N-Imino-3,3'-bis[N-[N-[tris(methyl5-aminolevulinate)methyl]acetamida-propionamida] benzene, TFA sal), para inducir la síntesis de porfirinas. In vitro utilizamos células de adenocarcinoma mamario murino LM3 (Inst Roffo). Por debajo de 0.1 mM, Den18mer induce una síntesis de porfirinas mayor que ALA; concentraciones superiores fueron tóxicas. Correlativamente, la concentración de Den18mer intracelular fue 7,5 veces mayor. In vivo, se administró vía i.p. a ratones cepa Balb/c inoculados s.c. con células LM3, dosis de 1-20 mg/ratón. En los tejidos estudiados incluyendo tumor, la cantidad de porfirinas acumuladas aumenta con dosis mayores de 10 mg, pero más de 20 mg fué tóxico. Empleando concentraciones equimolares en ALA, éste induce un pico de porfirinas a las 3 h ($2 \pm 0,1 \mu\text{g porf/g tej}$), con el Den18mer a ese tiempo se alcanza un plateau ($1,5 \pm 0,15 \mu\text{g porf/g tej}$), que se mantiene hasta las 48 h; para ambos compuestos la cantidad total de porfirinas sintetizadas es la misma. En medio libre de células Den18mer se hidroliza en 48 h, en solución salina + Polietilenglicol (PEG), sólo el 10%. Los resultados sugieren que Den18mer podría ser útil para una administración tóxica con PEG, en ese caso el dendrímero liberaría lentamente las moléculas de ALA, que a su vez se internalizan en las células e inducen una producción de porfirinas constante.

145. (12687) VARIABILIDAD EN LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA E INVASIVA EN LA LÍNEA DE CARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO HUMANA (PANC-1) ASOCIADA A LA SOBREENPRESIÓN DE DISTINTAS ISOFORMAS DE PKC. MAURO, LAURA; GROSSONI, VALERIA; URTREGER, ALEJANDRO; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; PURICELLI, LYDIA

Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"

Sólo los avances en la biología molecular ayudarán a entender la patogénesis del carcinoma pancreático, de pobre pronóstico y resistente a la terapia convencional. Se desconoce la relevancia funcional de los miembros de las tres familias de PKC (serina/treonina quinasas) en la progresión tumoral de esta patología. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la sobreexpresión de distintas isoformas: beta1 (b, familia clásica), delta (d, novel) y zeta (z, atípica) de PKC en la línea de carcinoma pancreático humano PANC1 sobre algunas propiedades in vitro asociadas con el comportamiento tumoral. En todos los casos, células transfectadas con los respectivos vectores vacíos se utilizaron como control (C). La sobreexpresión de las isoformas delta y beta indujo un fenotipo menos maligno, ya que en ambos casos disminuyó la invasión a través de matrigel en cámaras transwell (PKC-d: 3,01 \pm 1,2, PKC-b: 2,35 \pm 1,1 vs C: 11,44 \pm 3,3 cél invasivas/campo, $p<0,05$ en ambos casos). Este resultado fue acompañado en el caso de PKC-d por la reducción de la actividad secretada de MMP2, enzima relevante en la invasión, y en PKC-b por una disminución en la tasa proliferativa. Ninguna de estas PKCs moduló la apoptosis por privación de suero. En cambio la sobreexpresión de PKC-z en las células PANC1 indujo cambios contradictorios respecto a las propiedades asociadas al fenotipo maligno ya que aumentó la invasión (PKC-z: 12,54 \pm 1,8 vs C: 6,53 \pm 0,8 cél/campo, $p<0,05$), pero inhibió la actividad de enzimas proteolíticas secretadas. Por otro lado a la vez que disminuyó significativamente la proliferación aumentó la resistencia a la muerte por eliminación del suero. Las diferentes isoformas de PKC estudiadas estarían involucradas en algunas etapas de la progresión de las células de carcinoma pancreático, asociándose la sobreexpresión de PKC-d y PKC-b a un fenotipo menos maligno.

146. (12693) EXPRESIÓN DE CADERINA-E Y B-CATENINA EN CARCINOMAS DE PULMÓN DE ESTADIOS I Y II. MAURO, LAURA; DALURZO, LILIANA; SMITH, DAVID; LASTIRI, JOSE; VASALLO, BARTOLOME; ROCA, FERNANDA; PALLOTA, GUADALUPE; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; PURICELLI, LYDIA

Instituto de Oncología "A. H. Roffo". Hospital Italiano de Buenos Aires

En los últimos años el cáncer de pulmón se detecta en estadios más tempranos, debido a una mayor sensibilidad en los métodos diagnósticos. De todas formas el pronóstico de estos pacientes es incierto, lo que podría mejorarse con un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares que determinan la progresión del tumor. Un candidato a estudiar es la molécula transmembrana Caderina E, capaz de regular la adhesión célula-célula y cuyo dominio intracitoplasmático se une a B-Catenina, la cual al activarse se transloca al núcleo y regula la transcripción génica. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión del sistema Caderina E/B-Catenina en 47 carcinomas primarios de pulmón de pacientes Estadio I y II, mediante IHQ. Se analizó la expresión de estas moléculas en función de los datos clínico-patológicos y su valor pronóstico se estudió mediante las curvas de supervivencia Kaplan-Meier. Se encontró que aproximadamente el 30% de los tumores pierden de manera completa la expresión tanto de Caderina E como de B-Catenina, mientras que otro 20% de tumores presenta una pobre expresión de estos antígenos (menor del 10% de células positivas). Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la pérdida de Caderina E y de B-Catenina (Pearson 0,8 p <0,05). Aunque no significativo, se observó que el porcentaje de tumores completamente negativos para estas moléculas es mayor en los pacientes con tumores de mayor tamaño y con mayor número de ganglios comprometidos. Por otro lado, el estudio univariado en 37 pacientes demostró que la pérdida de Caderina E está asociada con menor supervivencia global (Log rank test: 4,37 p<0,05). En este grupo de pacientes con carcinomas de pulmón de estadios I y II se encontró que aproximadamente el 50% de los tumores pierden o expresan pobremente las moléculas Caderina E y B-Catenina. Por otro lado, la pérdida de Caderina E se asoció a peor pronóstico, indicando su posible utilidad como marcador pronóstico.

147. (12704) MODELO ORTOTÓPICO DE CÁNCER DE VEJIGA MURINO CON DISTINTO GRADO DE INVASIÓN -EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CATEPSINA B. UMEREZ, MARIA SOL; LODILLINSKY, CATALINA; ALVAREZ, VALERIA; CASABE, ALBERTO; SANDES, EDUARDO; EIJÁN, ANA MARÍA

Area Investigación – Instituto Oncológico "Angel H. Roffo" Av. San Martín 5481 – C.A.B.A. – Argentina

La catepsina B (CB) es una cisteino proteasa lisosomal con diferentes funciones fisiológicas y patológicas. Anteriormente demostramos que la CB se encuentra sobreexpresada en tumores invasores de pacientes con cáncer de vejiga (CaV) (Cancer 2003 jul 15, 98 (2) 262-8). Con el objetivo de desarrollar un modelo murino de utilidad en estudios preclínicos generamos tumores vesicales con diferente comportamiento invasor y evaluamos la expresión de CB. Materiales y Métodos: La inoculación ortotópica se realiza bajo anestesia general mediante la electrocauterización del epitelio vesical de ratones C57Bl/6J por la introducción de un catéter (24G) con un electrodo. La posterior inoculación de células MB49 y MB49-CP generan los tumores MB49-S y MB49-I. El grado de invasión se determina en cortes histológicos coloreados con H-E. La expresión de CB se determina por inmunohistoquímica y Western blot. Resultados: Los tumores MB49-S son formaciones papilomatosas superficiales mientras que los MB49-I presentan invasión de la pared vesical y mayor expresión de CB. El urotelio vesical normal no expresa CB, sin embargo la presencia de infiltrado subyacente de células inflamatorias y tumorales produce cambios en la expresión de CB. Las células MB49 y

MB49-CP en cultivo expresan CB en forma semejante, hallazgo confirmado por la presencia de una banda de 30 kDa por Western blot. Este modelo ortotópico de CaV murino MB49-S y MB49-I reproduce los aspectos histológicos y de expresión de CB similar a la patología tumoral humana. La expresión de CB en ambos tipos celulares es semejante y el infiltrado subyacente al epitelio induce expresión de CB en el urotelio no tumoral. Estas observaciones ponen en evidencia que las interacciones célula tumoral-microambiente sería un factor relevante en la expresión de CB y en el comportamiento invasor.

ONCOLOGIA D

148. (12705) CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE LINEAS CELULARES DE MELANOMA CANINO: UN MODELO IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA TERAPIA GÉNICA Y LA QUIMIOTERAPIA. ALTAMIRANO, NATALIA; RODRIGUEZ, WALTER; FISZMAN, GABRIEL; MARINO, LINA; GLIKIN, GERARDO; FINOCCHIARO, LILIANA; KARARA, ARMANDO

Unidad Transferencia Genética, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", UBA

El melanoma espontáneo maligno canino es un modelo análogo al melanoma humano, pero más agresivo. Por digestión mecánica y enzimática de varios tumores espontáneos caninos, se obtuvieron seis líneas celulares estables en cultivo. Éstas fueron mantenidas en monocapa para su caracterización. Los tiempos de duplicación celular resultaron: Ak (40,4±0,9 h), Ds (22,2±1,9 h), Fk (22,3±2,4 h), Kg (41,3±2,3 h), Ll (21,5±1,7 h) y Sc (25,7±0,3 h). Debido a su capacidad de crecimiento independiente de anclaje, todas las líneas desarrollaron colonias en agar blando. Usando anticuerpos específicos, se analizó por inmunocitoquímica la expresión de antígenos marcadores de melanoma: todas las líneas expresaron S100, vimentina no fue detectada en Fk, mientras que Ll y Fk fueron negativas tanto para HMB45 como para Melan-A. Se determinó la sensibilidad de las células al tratamiento con el sistema gen suicida/prodroga timidina kinasa del virus herpes simplex/ganciclovir (HSVtk/GCV), tanto en monocapa (2D) como en esferoides (3D). Para las líneas celulares Ds, Kg y Sc, transfectadas con HSVtk, la citotoxicidad del GCV se vio disminuida en esferoides (DL50 mg/ml: Ds 61,0±18,7; Kg >1000 y Sc 85,0±15,0) en relación a sus respectivas monocapas (DL50 mg/ml: Ds 2,3±1,3, Kg 0,9±0,5 y Sc 0,14±0,05). Fk y Ll no respondieron al sistema HSVtk/GCV (DL50 >1000), mientras que Ak respondió similarmente en cultivos 2D y 3D. Esferoides de Ak y Ds fueron menos sensibles (10-35%) al tratamiento con quimioterápicos (Doxorrubicina, Taxol y Vincristina) que sus respectivas monocapas. Terapias combinadas (HSVtk/GCV-quimioterápico) en cultivos 2D y 3D mostraron interacciones sinérgicas y antagónicas, dependientes de las dosis. En nuestro modelo tumoral de esferoides, los tratamientos con HSVtk/GCV y quimioterápicos, aunque efectivos, fueron menos eficientes que en monocapa, evidenciando las resistencias multicelulares a drogas observadas in vivo.

149. (12712) EFECTOS ANTITUMORALES DEL CELECOXIB Y UN DERIVADO INDEPENDIENTES DE LA INHIBICIÓN DE COX-2. PELUFFO, GUILLERMO; SCHÖNTAL, ALEX; URTREGER, ALEJANDRO; KLEIN, SLOBODANKA

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. University of Southern California, Ca, EEUU

Previamente demostramos que el tratamiento con celecoxib (cbx) reduce el crecimiento sc y el n° de metástasis espontáneas del adenocarcinoma de pulmón murino LP07. Se observó una reducción in vitro de la actividad de MMP2 y uPA secretadas por las células LP07 y de su capacidad migratoria e invasiva. Nuestro objetivo fue investigar si los efectos del cbx en nuestro modelo tumoral son dependientes de COX2. Para ello se inhibió su ex-

presión mediante la transfección de un vector antisentido. Se realizó el tratamiento con un derivado del cxb, el dimetilcelecoxib (DMC), que carece de actividad inhibitoria de la COX2. La reducción en la expresión de COX2 no afectó la viabilidad de las células LP07. El cxb redujo la viabilidad de las células LP07 aún con una menor expresión de COX2 ($58\pm 3\%$ vs $72\pm 2\%$ control). El DMC evidenció la misma inhibición que el cxb, siendo aún mayor a concentraciones más altas (CL50 $10\text{-}25\mu\text{M}$ vs $25\text{-}50\mu\text{M}$). Las actividades de MMP2 y uPA fueron reducidas por la menor expresión de COX2 ($P<0,05$), reducción que no fue mayor por el tratamiento con cxb. El DMC redujo la actividad de ambas proteasas, en mayor medida que el cxb en el caso de la MMP2 ($P<0,01$). La expresión de la COX2 aumentó con el tratamiento de cxb y DMC ($10\mu\text{M}$). La inhibición de la actividad de uPA y MMP2 por la reducción de COX2 y por el tratamiento con DMC, y la ausencia de un efecto aditivo del cxb en un contexto de menor expresión de COX2 sugieren que en la inhibición de ambas proteasas intervienen tanto mecanismos dependientes como independientes de COX2. La reducción de la viabilidad sería independiente de COX2, ya que no se vio aumentada por su menor expresión. Además el cxb mantuvo su efecto en estas células y el DMC inhibió la viabilidad de manera similar al cxb. Dados los inconvenientes derivados del uso del cxb y la evidencia de nuevos blancos antitumorales de los AINEs, es importante la aparición de derivados que mantienen la capacidad antitumoral aún cuando carecen de actividad inhibitoria de la COX2.

150. (12717) CITOPROTECCIÓN DE HO-1 Y ASOCIACIÓN CON MAPKS EN CÁNCER DE PRÓSTATA. GUERON, GERALDINE; CASTRONUOVO, CYNTHIA; PAULA, SACCA; MONICA, KOTLER; VAZQUEZ, ELBA

Depto. de Química Biológica- FCEN-UBA

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) disparan la activación de múltiples vías de señalización incluyendo el de MAPKs e inducen muerte en una amplia variedad de tipos celulares. La hemo oxigenasa 1 (HO-1) es una proteína inducida por estrés que confiere citoprotección contra el daño oxidativo y provee una función vital en el mantenimiento de la homeostasis. Sus funciones anti-inflamatorias y anti-apoptóticas son mediadas por MAPKs. El objetivo de este trabajo ha sido determinar el rol de p38 y JNK en la muerte celular inducida por H2O2 en cáncer de próstata y su relación con HO-1. Se utilizaron cultivos de células PC3 expuestos a H2O2 ($200\mu\text{M}$) durante 1.30h y posterior tratamiento con hemina ($20\mu\text{M}$) durante 22h. Se midió la expresión de p-p38, p-JNK y HO-1 por Western Blot. La viabilidad celular fue determinada por exclusión de Azul de Trypan y el ensayo de MTT. El estrés oxidativo fue evaluado por tinción con diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA-DA, $25\mu\text{M}$). El efecto del H2O2 sobre la viabilidad celular fue dosis y tiempo dependiente, observándose una disminución del 50% ($p<0,05$) con una concentración de $200\mu\text{M}$ durante 1.30h. La hemina restauró parcialmente la viabilidad celular. La expresión de HO-1 se indujo significativamente por tratamiento con hemina tanto en células controles como pre-tratadas con H2O2. Por microscopía de fluorescencia se detectó un importante aumento en los niveles de ROS por tratamiento con H2O2 y una disminución concomitante en células tratadas con H2O2 y hemina, concordante con el aumento de HO1. La expresión de p-JNK disminuyó un 46% ($p<0,05$) en presencia de H2O2 y los niveles fueron completamente restaurados por la hemina. H2O2 indujo un 35% ($p<0,05$) la expresión de p38, mientras que la hemina no produjo ningún efecto. Las células tratadas solo con hemina no sufrieron modificaciones en la expresión de MAPKs. Estos resultados demuestran un efecto citoprotector mediado por HO1 y la participación de JNK y p38 en el estrés oxidativo inducido por H2O2 en cáncer de próstata.

151. (12734) EFECTO PROTECTOR DE HO1 FRENTE AL DAÑO OXIDATIVO EN CARCINOMA DE PRÓSTATA.

SACCA, PAULA ALEJANDRA; CASTRONUOVO, CYNTHIA; KOTLER, MONICA; VAZQUEZ, ELBA

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA

La Hemo oxigenasa 1 (HO1), proteína inducible por estrés, desempeña un marcado rol antiinflamatorio y antioxidante. Niveles moderados de expresión de HO1 conducen a una resistencia al daño oxidativo. La inducción de la expresión y actividad de HO1 por ácido acetilsalicílico (ASA) previene el daño celular en condiciones inflamatorias debido a su potencial como agente antioxidante. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de HO1 sobre el daño celular inducido por H2O2 en cáncer de próstata. Se utilizó hemina como agente inductor de la expresión de HO1 y ASA como agente anti oxidante en la línea celular PC3. Las células se expusieron sucesivamente a H2O2 $100\mu\text{M}$ durante 1:30 h, y a hemina $20\mu\text{M}$ o ASA $100\mu\text{M}$ durante 22 h. Se evaluó la viabilidad celular (ensayo de exclusión de trypan blue) y la expresión de las proteínas HO1 y Bcl-2 por Western Blot. El tratamiento con H2O2 disminuyó la viabilidad celular (50%, $p<0,05$), efecto que fue revertido parcialmente por hemina (62%, $p<0,05$) y por ASA (74%, $p<0,05$). La expresión de HO1 aumentó significativamente con los diferentes tratamientos: H2O2 2,5 veces, hemina 17,8 veces y H2O2+hemina 26 veces ($p<0,05$). La expresión de Bcl-2 aumentó (hemina 95 %, H2O2+hemina 64%, $p<0,05$) sugiriendo que el tratamiento con hemina desencadena un efecto antiapoptótico. ASA indujo la expresión de HO1 1,3 veces y H2O2+ASA la incrementó 4,2 veces ($p<0,05$). Conclusión: El efecto protector de la inducción de la expresión de HO-1 frente al estrés oxidativo resultaría de la acción antiapoptótica mediada por CO, producto de la actividad de esta enzima. Consideramos que la modulación farmacológica de la expresión de HO1 puede constituir la base para modificar la respuesta citotóxica al estrés oxidativo.

152. (12749) PERFILES MOLECULARES TEMPRANOS EN CEBRO INDUCIDOS POR TUMORES PERIFÉRICOS. ALVAREZ, MARIANO; SALIBE, MARIANO; BERCETCHE, MARTÍN; RUBINSTEIN, MARCELO (1); PITOSI, FERNANDO (2); PODHAJECR, OSVALDO (2)

Gentron, LLC. (1) INGEBI (2) Instituto Leloir

La búsqueda de nuevos marcadores para el diagnóstico temprano del cáncer suele hacerse comparando muestras de tumores con tejidos normales adyacentes. Cada mutación en un tumor genera una señal de "peligro" y se calculan en 10.000 las mutaciones antes del diagnóstico clínico. Dado que muchos cambios en la homeostasis periférica son sentidos por el sistema nervioso central, hipotetizamos que éste podría detectar dichas señales tempranas tumorales de "peligro". En este trabajo presentamos el análisis de la expresión génica de varias zonas del cerebro de ratones inyectados en el flanco con líneas tumorigénicas de mama, pulmón o colon. Los ratones fueron sacrificados a las 18hs, 72hs u 8 días post-inyección. El perfil transcripcional de la respuesta del cerebro a la presencia de los tumores periféricos fue analizado usando microarreglos producidos en nuestro laboratorio. De los 10,000 oligonucleótidos evaluados, observamos que un 11,4 % estaban diferencialmente expresados en ratones con tumores ("fold" > 1.15 y $p < 0.05$). Dentro de los genes diferencialmente expresados con función conocida, predominaron aquellos relacionados con la actividad sináptica y con el "sickness behaviour". Un subgrupo de estos genes fue validado por PCR en tiempo real. Usando análisis jerárquicos no supervisados, pudimos discriminar entre ratones con tumor y controles con un alto nivel de sensibilidad y especificidad. También identificamos conjuntos de genes expresados en cerebro capaces de discriminar entre los tres modelos de cáncer. Estos resultados indican que la neoplasia es sensada por el SNC y sugiere que el análisis de genes diferencialmente expresados en el cerebro podría ayudar a la identificación de marcadores de diagnóstico en sangre periférica.

153. (12752) INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TUMORALES MURINAS Y MACRÓFAGOS ACTIVADOS. PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS INFLAMATORIAS CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) Y RECEPTORES DE LA ACTIVACIÓN DE PEROXISOMAS TIPO G (PPAR-G). ROLANDO, ROMINA; MAGENTA, GABRIELA; BORENSTEIN, XIMENA; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA; JASNIS, MARIA ADELA

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Área Investigación, U.B.A.

Antecedentes: COX-2 y PPARg son "blancos moleculares" prometedores para el tratamiento preventivo del cáncer de mama ya que participan en vías de señalización de crecimiento celular y apoptosis, participando en procesos carcinogénicos. La rosiglitazona (tiazolindionas, ligando sintético de PPAR-?) y la Indometacina (AINES) actúan como ligandos de PPAR-?. Objetivo: investigar efectos de Rosiglitazona (RO) e Indometacina (INDO), sobre la viabilidad celular, producción del mediador inflamatorio óxido nítrico (NO) y de metaloproteasas de matriz (MMP) en células de adenocarcinoma mamario murino LMM3 y en macrófagos peritoneales de ratones portadores de tumor de 7 días de evolución (MfT7). Materiales y Métodos: Células LMM3 y MfT7 se cultivaron con RO 100 µM, INDO 1 µM, BADGE 20 µM y a las 24 hs. se determinó la producción de NO por reactivo de Griess y viabilidad celular por MTS. Además se evaluó la citotoxicidad de MfT7 tratados con RO e INDO y sus medios condicionados (MC) sobre LMM3. Las MMPs se determinaron en MC de MfT7. RO inhibe 40% la producción de NO en LMM3 ($p < 0.001$ vs control) y 25% la viabilidad celular ($p < 0.01$) no revertido por BADGE (antagonista de PPARg). En MfT7 RO aumenta 44% su actividad citotóxica ($p < 0.001$). INDO no tiene efecto. MC de MfT7 no son citotóxicos. En los MC de los MfT7+ RO hay aumento de MMP9 y no de MMP2. RO inhibe la viabilidad en LMM3 vía PPARg independiente y baja el nivel de NO (factor de supervivencia). El aumento en la citotoxicidad de MfT7 es por contacto célula-célula y no por factores solubles. INDO no lisa LMM3 ni modula la actividad citotóxica de los MfT7. Así, la RO en nuestro modelo, tiene el beneficio de activar células efectoras de la respuesta inmune y aumentar la muerte de células tumorales aunque también inducen un incremento de la actividad de MMPs en los Mfs peritoneales de los ratones portadores de tumor.

154. (12754) EFECTO DE LA ROSIGLITAZONA SOBRE LA INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS EXPERIMENTALES. NÚÑEZ, M; MARTÍN, G; GUTIÉRREZ, A; MOHAMAD, N; CRICCO, G; MEDINA, V; GARBARINO, G; SAMBUCCO, L; CROCI, M; RIVERA, E; BERGOC, R

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.

La Rosiglitazona (Rosi) es una tiazolidinodiona empleada en el tratamiento de la diabetes que ha demostrado también poseer acción antitumoral in vitro sobre diversas líneas celulares transformadas. En estudios previos demostramos su acción in vivo sobre tumores mamarios inducidos en rata mediante la administración del carcinógeno N-Nitroso-N-metilurea (NMU) inyectado ip a los 50, 80 y 110 días de vida de los animales. El objetivo del presente trabajo fue estudiar su posible efecto sobre la inducción de éstos tumores, administrada sola o en combinación con el antiestrógeno tamoxifeno (Tam). Las administraciones de Rosi y Tam se efectuaron desde 10 días antes de la NMU y durante 100 días consecutivos, en los siguientes lotes ($n=10$): A- Rosi/NMU (Rosi=0,12 mg/Kg/día-vo); B- Tam/NMU (Tam=1mg/Kg/día-sc); C- Rosi+Tam/NMU (ambos tratamientos); D- Control/NMU (vehículo). Los resultados obtenidos fueron: 1) Periodo de Latencia (días) = 91,10±15,7; 90,6±10,2; 119,3±10,5; 82,5±8,7, respectivamente ($p < 0,0001$ C vs. D; $p < 0,05$ C vs B). 2) Incidencia tumoral (%) = 100, 50, 60, 100 respectivamente ($p < 0,0001$ C vs. D y C vs. B). 3) nº de tumores/rata = 2,6±1,1; 1,6±1,5; 1,2±0,9; 5,2±1,8 respectivamente ($p < 0,0001$ A vs. D). La observación microscópica de cortes histológicos de las mamas a los 55, 85 y 115 días mostró la progresión en el desarrollo tumoral en el lote D hasta la forma-

ción de carcinomas mamarios ductales de alto grado de malignidad y alto número de mitosis por campo (M/campo=8). En el lote A los tumores desarrollados mostraron menor M/campo (3-4), intensa reacción inflamatoria y secreción. En el lote C se observa una potenciación de los efectos observados en el lote B. Los resultados muestran una clara acción inhibitoria de la Rosi sobre la promoción tumoral, tanto sola como combinada con Tam, en el modelo de carcinogénesis ensayado.

155. (12758) EFECTO CITOTÓXICO SELECTIVO DE LA HISTAMINA SOBRE CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS. MEDINA, VANINA; GARBARINO, GLORIA; CRICCO, GRACIELA; MOHAMAD, NORA; CROCI, MAXIMO; NÚÑEZ, MARIEL; MARTIN, GABRIELA; BERGOC, ROSA; RIVERA, ELENA

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Inmunooncología

En el presente trabajo se investigó la acción de la histamina (HA) sobre la regulación de la proliferación y procesos de señalización celular en líneas celulares epiteliales, normales (HBL-100) y tumorales (MDA-MB-231), derivadas de la glándula mamaria humana. Se evaluó la proliferación mediante el ensayo clonogénico y el tiempo de duplicación (Td) por recuento celular; la apoptosis mediante citometría de flujo y ensayo Tunel (Apoptag); la diferenciación con el colorante de lípidos Nile Red y el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Se determinó el contenido endógeno de HA por inmunofluorescencia y la expresión de los receptores RH[1], RH[2], RH[3] y RH[4] por western blot empleando anticuerpos específicos. Las células HBL-100 expresan los 4 receptores mientras que las MDA-MB-231 no expresan el RH[2]. El contenido endógeno de HA mostró correlación directa con el grado de malignidad. La HA regula la proliferación en forma dosis-dependiente en las células malignas (134% HA10nM y 23% HAµ10M vs control 100% $p < 0.01$) observándose un incremento del Td de 28 a 44 hs ($p < 0.01$) luego del tratamiento con HA10µM. En las células normales HBL-100 sólo disminuyó la proliferación con HA 10nM (72%, $p < 0.05$). En las células tumorales la inhibición de la proliferación se asocia con: un arresto del ciclo celular en la fase G2/M (20.5±0.7 % vs control 9.5±1.2 %, $p < 0.01$), con un aumento de células en apoptosis (9±1% vs control 1±1%, $p < 0.01$) y con un aumento en el contenido de lípidos del 26±2%, $p < 0.01$. En las HBL100 sólo se observa un arresto en el ciclo en la fase G1/G0 (HA 10nM 60.5±3.5% vs control 32.5±4.1%, $p < 0.01$). Estos resultados demuestran que la histamina modula selectivamente procesos asociados a la proliferación en células tumorales, ya que este efecto que no se observa en células normales y por lo tanto representa un blanco potencial para el desarrollo de terapias más específicas y menos tóxicas para el tratamiento del cáncer mamario humano.

156. (12766) OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN CLON DE CÉLULAS EPITELIOIDES DE BAJA TUMORIGENICIDAD A PARTIR DE UN TUMOR MAMARIO MURINO. KRASNAPOLSKI, M; PELUFFO, G; VELOSO, MJ; MAGRI, L; EIJAN, AM; BAL DE KIER JOFFÉ, E

Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"

El epitelio de la glándula mamaria está formado por dos tipos celulares: células luminales (LEP) y mioepiteliales (MEP). Previamente hemos caracterizado el tumor murino mamario espontáneo M38 compuesto por ambos tipos celulares. Con el objetivo de estudiar las subpoblaciones celulares que lo componen obtuvimos un nuevo clon (LM38-D9) por dilución límite, cuya caracterización se describe. En monocapa, las células presentan una morfología ahusada. El estudio por inmunofluorescencia reveló que, aunque no expresan E-cadherina, poseen una baja expresión de citoqueratinas evidenciando su origen epitelial. Asimismo se observó que su citoesqueleto de actina presenta una disposición cortical con algunas fibras de stress. El estudio citogenético reveló un número modal de 40 y la presencia de distintas aberraciones

ciones cromosómicas, incluyendo una translocación similar a la ya observada en las otras líneas derivadas del mismo tumor. Cuando las células fueron inoculadas s.c. en ratones singéncicos (2-4 x 10⁵/ ratón), sólo desarrollaron tumores un 20% (3/15) de los animales inoculados, con una latencia de 3 semanas. 2/3 de los ratones murieron con un pequeño tamaño tumoral (10 mm x 9 mm) y sin evidencias de metástasis. El diagnóstico histológico de los tumores mostró carcinomas indiferenciados, poco vascularizados, muy poco invasivos, con numerosas imágenes de mitosis y apoptosis. En pulmón se observó una alta infiltración neutrofílica con hiperplasia de las paredes alveolares sin metástasis. Los animales con tumor cursan con leucocitosis (19000±/4000 leucos/ml) y pérdida de peso media del 30%, compatible con caquexia. Se ha obtenido un clon de características epitelioides, que constituirá una nueva herramienta para estudiar las interacciones entre las células LEP y MEP de los tumores mamarios. Este clon cobra también interés porque a pesar de su baja tumorigenicidad y de no desarrollar metástasis, fue capaz de producir alteraciones compatibles con síndromes paraneoplásicos.

157. (12791) EXPRESION DE P8 EN CANCER DE PROSTATA. SACCA, PAULA; CASAS, GABRIEL(1); MEISS, ROBERTO(2); MAZZA, OSVALDO(1); VALLACO, PIA; IOVANNA, JUAN(3); MORENO, SILVIA; VAZQUEZ, ELBA

Depto Química Biológica FCEN-UBA. (1)Hospital Alemán, (2)Academia Nacional de Medicina - Argentina, (3) IUnite 624, Inserm Marsella Francia

La expresión de la proteína p8, un polipéptido de 80 aminoácidos, es activada durante la fase aguda de la pancreatitis, el desarrollo y la regeneración pancreática, situaciones relacionadas con estrés y la promoción del crecimiento celular. Se ha sugerido que p8 es un regulador transcripcional y un análisis exhaustivo de su secuencia indicó que p8 tiene una señal de localización nuclear bipartita y una señal de exportación rica en lisinas. Su expresión podría tener una función anti-apoptótica. Hay resultados contradictorios acerca del significado fisiológico de esta proteína en cánceres humanos. En cáncer de mama p8 podría ser un supresor tumoral y estaría regulado por estrógenos. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión y localización de p8 en cáncer de próstata. Utilizamos técnicas de inmunohistoquímica tanto en muestras de pacientes (prostatectomías radicales de tumores primarios de próstata, provenientes del Hospital Alemán, n=5 y un caso de hiperplasia benigna de próstata, BHP), como en las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y LNCaP, con diferente perfil de respuesta a la dependencia hormonal. En células PC3 la proteína se encontró localizada en núcleo y citoplasma mientras que en células LNCaP estuvo localizada en citoplasma. Las células PC3, tienen un crecimiento andrógeno independiente y conducen a un fenotipo tumoral más agresivo que las células LNCaP se sugiere entonces que la localización nuclear de p8 podría ser indicadora de un crecimiento tumoral mayor. En las secciones histológicas provenientes de los tumores primarios se encontró marcación citoplasmática positiva en 4/5 pacientes, mientras que 2/5 mostraron tinción nuclear positiva para p8. La muestra de BHP solo mostró tinción citoplasmática. Si bien estos resultados son insuficientes, demuestran por primera vez que p8 se expresa en cáncer de próstata y la proteína se localiza de manera diferencial de acuerdo a las características celulares.

158. (12797) PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR HISTAMINA EN CÉLULAS DE CARCINOMA PANCREÁTICO HUMANO. CRICCO, G; GARBARINO, G; GARCÍA, A; MEDINA, V; MOHAMAD, N; NÚÑEZ, M; SAMBUCCO, L; GUTIÉRREZ, A; BERGOC, R; RIVERA, E; MARTÍN, G

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

La línea celular de carcinoma pancreático sobreexpresa receptores a histamina H1 y H2. La histamina (HA) a través de los re-

ceptores H2 activa la adenilato ciclasa y produce una inhibición de la proliferación. Está descrito que en diversas líneas celulares tumorales el óxido nítrico (NO) media los efectos anti-proliferativos. Por otra parte, en células endoteliales la histamina induce la expresión de nítrico sintasa (NOS) y aumenta la producción de NO. El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible regulación de la NOS con HA y su acción sobre el crecimiento celular. Se evaluó la proliferación celular mediante el método clonogénico. Se observó una inhibición dosis-dependiente del crecimiento tanto en presencia de los inhibidores de la NOS (L-NAME, CE[50]= 2±0.5mM); Aminoguanidina, CE[50]= 250±15µM) como del dador de NO (SIN-1, CE[50] = 10±3µM). Se estudió la expresión de las isoformas de NOS (endotelial e inducible) por RT-PCR. Observamos que las células PANC-1 expresan eNOS en forma constitutiva y que a las 24 h la eNOS es regulada positivamente por HA 10µM, forskolina 10 µM (Fk: activador directo de la adenilato ciclasa) y por L-NAME 4 mM. Mientras que se observó una disminución de los niveles de ARNm de la eNOS en presencia de SIN-1 20 µM. La expresión de iNOS resultó indetectable en las mismas condiciones. La determinación de NO por citometría de flujo utilizando el indicador fluorescente diacetato de 4,5diaminofluoresceína permitió detectar un aumento significativo del NO intracelular luego de 24hs de incubación con HA (140±13%), Fk (162±18%), L-NAME (153±15%), p< 0.01 vs Control. Se puede concluir que en la línea celular PANC-1 los niveles de NO regulan la transcripción de la eNOS y modulan el crecimiento celular. Asimismo, los resultados obtenidos indican que el efecto inhibitorio ejercido por la HA sobre la proliferación celular puede ser mediado por los niveles de NO generados en el sistema.

GASTROENTEROLOGIA

159. (12746) ASINCRONÍA DE REPLICACIÓN EN ADENOMAS Y CARCINOMAS DE COLON. PEDRAZZINI, ESTELA (1); JURY, GASTÓN (2); BERNEDO, ALBERTO (2); CHOPITA, NÉSTOR (2); SLAVUTSKY, IRMA (1)

(1) Depto Genética, Academia Nacional de Medicina, (2) Serv Gastroenterología, HIGA San Martín, La Plata

Diferentes estudios describen cambios en el patrón de replicación bialélica de células malignas, originando una asincronía de replicación (AR), con un alelo de replicación temprana y otro de replicación tardía, lo que determinaría silenciamiento de genes supresores de tumor. En este trabajo se evaluó la AR del gen supresor de tumor RB1 (retinoblastoma) en sangre periférica (SP) y mucosa normal y patológica de pacientes con adenomas (A) y carcinomas de colon (Ca). Se analizaron 22 pacientes al diagnóstico: 12 A y 10 Ca (13 varones; edad media 58,2 años) y 3 controles (C). Se efectuó procesamiento directo de las muestras de biopsia endoscópica de mucosa intestinal durante 2 hs a 37°C en medio F-12 con suero fetal bovino. La SP estimulada se cultivó durante 72 hs. Se empleó hibridación in situ con fluorescencia con la sonda locus específica RB1 (Vysis). Se analizaron 120 núcleos interfásicos por muestra, evaluando la cantidad de células disómicas con replicación sincrónica: dos señales simples (SS) o dos señales dobles (DD), y las no sincrónicas con una señal simple y otra doble (SD). Se encontró un incremento significativo de células SD para el gen RB1 en A (25,3%±1,1) y Ca (31,2%±1,4) respecto de la mucosa normal (16,5%±1,0) de los pacientes y de C (11,9%±0,5) (p<0,001); se observó diferencia entre las mucosas patológicas (p<0,003). La SP mostró un incremento significativo de células SD en A (23,7%±1,5) y Ca (32,3%±1,3) (p<0,01) y de ambos respecto de SP de C (9,9%±1,6) (p<0,003). Se detectó también un aumento significativo de aneuploidías del gen RB1 en Ca (34,6%±9,6) respecto de A (10,3%±4,4) (p<0,02). Nuestros resultados muestran un incremento de la AR del gen RB1 en Ca respecto de A de colon así como de la mucosa normal, indicando una alteración de la actividad transcripcional de dicho gen. Resulta destacable la similitud de los valores de SP con los de la

respectiva mucosa afectada, lo que sugeriría a este último tejido como de elección para el estudio de AR en estas patologías.

160. (12237) MANEJO HEPÁTICO, INTESTINAL Y RENAL DE 1-COLORO-2,4-DINITROBENCENO (CDNB) EN RATAS CON LIGADURA DE COLÉDOCO (LC). VILLANUEVA, SILVINA (1); RUIZ, MARIA (1); LUQUITA, M. (1); SÁNCHEZ POZZI, E. (1); PELLEGRINO, J. (1); TORRES, ADRIANA (2); CATANIA, VIVIANA (1); MOTTINO, A. (1)

(1)IFISE-CONICET. (2) Área Farmacología Fac. de Cs. Bioquímicas y Farm. UNR.

El hígado juega un rol esencial en la eliminación de xenobióticos conjugados con glutatión mediada por Mrp2. En la colestasis extrahepática la función secretora biliar se encuentra anulada y el papel de tejidos extrahepáticos se desconoce. Se evaluó el efecto de la LC sobre la expresión y actividad de Mrp2 en hígado, yeyuno y corteza renal en ratas Wistar macho adultas, 1 (LC1) y 7 (LC7) días pos-cirugía. La expresión de Mrp2, evaluada por western blotting, disminuyó en hígado (LC1: -45%; LC7: -76%) y en intestino (LC1: sin cambios; LC7: -42%) y aumentó en riñón (LC1: +73%; LC7: +123%) respecto de Sham (S), ($p < 0.05$, $n=3$). La actividad de Mrp2 fue evaluada in vivo administrando 30 μ moles de CDNB/Kg i.v. y posterior detección de los derivados dinitrofenil glutatión (DNP-SG) y dinitrofenil cisteinilglicina (DNP-CG) por HPLC. La excreción de derivados totales (μ moles acumulados en 90 min/g tejido) en perfusato intestinal (perfusión con buffer PBS, 0.4 ml/min) no se modificó en LC1 (0.032 \pm 0.002) y fue menor en LC7 (0.024 \pm 0.002) respecto de S (0.036 \pm 0.004), ($p < 0.05$, $n=3$). La excreción renal (orina recogida por canulación) aumentó en LC1 (0.782 \pm 0.039) y LC7 (0.921 \pm 0.178) respecto de S (0.369 \pm 0.109), ($p < 0.05$, $n=3$). El contenido tisular de DNP-SG, evaluado a los 5 min de la inyección de CDNB, disminuyó en hígado (LC1: -56%; LC7: -78%), aumentó en intestino (LC1: sin cambios; LC7: +121%) y aumentó en corteza renal (LC1: +76%; LC7: +85%) respecto de S ($p < 0.05$, $n=4$). La concentración plasmática de DNP-SG no mostró diferencias entre grupos. Los resultados indican un agravamiento de la actividad depuradora hepática debido a una deficiente conjugación de CDNB a DNP-SG. El intestino muestra un deterioro de la actividad Mrp2 con preservación de la disponibilidad del conjugado. El riñón cumpliría una función compensadora ante dichas alteraciones.

161. (12452) FOSFATIDILINOSITOL-3 QUINASA (PI3K) ESTÁ INVOLUCRADA EN LA ALTERACIÓN SECRETORA DE SALES BILIARES INDUCIDA POR ESTRADIOL-17 β -GLUCURÓNIDO (E17G) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR). CROCENZI, FERNANDO; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE; PÉREZ, LEONARDO; BASIGLIO, CECILIA; OCHOA, ELENA; PELLEGRINO, JOSÉ; MOTTINO, ALDO; ROMA, MARCELO

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)

PI3K modula diversos procesos hepatocelulares, incluyendo la función secretora biliar. Su activación es requerida en cuadros colestásicos, como aquel inducido por taurolitocolato. E17G es un metabolito estrogénico endógeno colestásico que ha sido postulado como posible mediador en la colestasis gravídica. En este trabajo, evaluamos el rol de PI3K en la disfunción secretora de sales biliares inducida por E17G en DAHR. Las DAHR fueron obtenidas mediante doble perfusión con colagenasa, enriquecidas mediante elutriación y cultivadas 5 hs para permitir la recuperación de su polaridad secretora. Luego, se incubaron con el inhibidor de PI3K Wortmanina (WM, 100 nM y 1 μ M, 45 min) y posteriormente con E17G (50 μ M, 20 min) en presencia de WM. Finalmente, se adicionó una sal biliar fluorescente, la colil-lisil-fluoresceína (CLF) durante 5 min para permitir su captación y luego se agregaron nuevamente los compuestos en estudio para evaluar su efecto sobre el transporte canalicular. Se cuantificó, a partir de microfotografías, el porcentaje de DAHR que mostraban

fluorescencia visible en sus vacuolas canaliculares (test de acumulación canalicular de CLF, acCLF), así como la cantidad de CLF acumulada en dichas vacuolas (como porcentaje de CLF celular total). Los resultados (media \pm ES) se analizaron por ANOVA. La acCLF fue disminuida por E17G (16 \pm 2 vs 68 \pm 4; $p < 0.05$ vs control). WM no afectó a ambas dosis la acCLF y previno el efecto de E17G (WM 100nM+E17G: 24 \pm 2; WM 1 μ M+E17G: 34 \pm 3; $p < 0.05$ vs E17G y control). La cantidad de CLF acumulada apicalmente fue disminuida por E17G (5,9 \pm 0,4 vs 14,1 \pm 1,1; $p < 0.05$ vs control); este efecto fue parcialmente prevenido por WM (9,1 \pm 0,7; $p < 0.05$ vs E17G y control). Concluimos que la alteración del transporte de sales biliares inducida por E17G depende parcialmente de la activación de PI3K inducida por este agente colestásico.

162. (12510) INSULINA (I) Y GLUCAGON (G) MODULAN LA COLESTASIS POR ESTRADIOL 17-GLUCURÓNIDO (E17G). CROCENZI, FERNANDO; PÉREZ, LEONARDO; MONTI, JUAN; PELLEGRINO, JOSÉ; OCHOA, ELENA; BASIGLIO, CECILIA; CARNOVALE, CRISTINA; ROMA, MARCELO; MOTTINO, ALDO; SÁNCHEZ POZZI, ENRIQUE

IFISE, CONICET - Universidad Nacional de Rosario

Los niveles hepáticos de AMPc modulan la colestasis por E17G. I y G regulan estos niveles por lo que evaluamos sus efectos en colestasis. In vivo se evaluó la colestasis en ratas diabéticas por estreptozotocina (SZ) e in vitro se evaluó el efecto de I y G sobre la alteración por E17G en la capacidad de duplas aisladas de hepatocitos (DAHR) para acumular la sal biliar colil-lisil-fluoresceína (CLF) en su vacuola canalicular. Metodología: a) Ratias hembras se dividieron en: i) Diabéticas (D, SZ 50 mg/kg, i.v., $n=8$); ii) Controles (C, solvente, $n=8$). A los 15 días luego de recoger bilis basal, se inyectó E17G (E, 9 μ mol/kg) o solvente (S) y se recogió bilis cada 10 min por 2 hs. Se determinó flujo biliar y sales biliares (SB) en bilis. b) DAHR obtenidas por perfusión con colagenasa seguida de elutriación, luego de 5 hs de cultivo se incubaron con G (0,4mg/l), I (250 mU/l) o ambos, seguido de incubación con E17G (50 μ M) o solvente y finalmente exposición a CLF. Por microscopia de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon CLF (acCLF). Los resultados se analizaron por ANOVA. Resultados (media \pm ES): En CE, el flujo biliar se redujo al 20 \pm 5% del basal sin normalizarse hasta los 120 min, mientras que en DE la caída fue menor (83 \pm 9% del basal, $p < 0.05$) y a los 20 min retomó los valores de los grupos con solvente (DS y CS). La excreción biliar de SB disminuyó con E17G (CE:13 \pm 8% del basal, $p < 0.05$) mientras que no se afectó en ratas diabéticas. In vitro ($n=2$), E17G redujo acCLF (20 \pm 2% del control, $p < 0.05$) mientras que G previno esta reducción (67 \pm 4%, $p < 0.05$). I no mejoró acCLF (40 \pm 3%) y contrarrestó la prevención de G cuando se co-incubaron (39 \pm 3%). G e I no causaron efectos per se. Conclusión: diabetes experimental reduce el impacto causado por administración de E17G sobre flujo biliar y excreción de SB. Este efecto se debería al predominio de las acciones benéficas de G en ausencia de I endógena.

163. (12553) LA CITOQUINA TNF-ALFA MEDIA LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE AQUAPORINA-8 EN COLESTASIS POR ENDOTOXEMIA. LEHMANN, GUILLERMO L.; CARRERAS, FLAVIA I.; GRADILONE, SERGIO A.; MARINELLI, RAUL A.

IFISE-CONICET

La aquaporina 8 (AQP8) es un canal proteico que facilita el flujo osmótico de agua durante la secreción biliar canalicular. AQP8 se localiza intracelularmente y en la membrana canalicular del hepatocito. La aquaporina-9 (AQP9) se encuentra constitutivamente en la membrana sinusoidal, permitiendo el pasaje de agua y solutos. Previamente observamos que la expresión hepática de AQP8 está disminuida en la colestasis por endotoxemia. Si bien el mecanismo involucrado es desconocido, podría estar mediado por citoquinas proinflamatorias, entre ellas TNF- α (factor de necrosis tumoral α). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el rol de TNF- α en la disminución de la expresión de

AQP8 en la colestasis inducida por lipopolisacárido (LPS). LPS (4 mg/kg peso i.v.) se administró a ratas controles y a ratas con TNF-alfa inactivado por inyecciones intraperitoneales repetitivas de la proteína de fusión p75-TNF-alfa. Resultados: Luego de 16 hs de inyectado el LPS, las ratas controles mostraron una disminución del flujo biliar (-36%; $p < 0,05$; $n=3$). Por estudios de fraccionamiento subcelular e inmunoblotting, se detectó una disminución de AQP8 hepática en las membranas celulares totales (-40%; $p < 0,05$; $n=3$), mientras que la AQP9 permaneció invariable. Estudios inmunohistoquímicos en secciones de hígado para AQP 8 y 9, confirmaron los resultados. La inactivación de TNF-alfa logró prevenir la disminución del flujo biliar y la caída de los niveles de AQP8 hepática inducidos por LPS. Conclusión: Nuestros resultados sugieren que la citoquina TNF-alfa es un mediador clave en la disminución de la expresión hepática de AQP8 y de la colestasis inducidas por endotoxemia.

164. (12572) LA HIPERTENSIÓN PORTAL POR ESTRECHEZ REGLADA DE VENA PORTA NO AUMENTA EL DAÑO POR STRESS EN LA MUCOSA GÁSTRICA. ROMAY, SALVADOR (1,3); EIZAYAGA, FRANCISCO (1); JAROSLAVSKY, MARÍA JOSÉ (3); BALASZCZUK, ANA MARÍA (2); COSTA, MARÍA DE LOS A. (2); ARRANZ, CRISTINA (2); LEMBERG, ABRAHAM (1)

Cátedra de fisiopatología FFyB -UBA, Hospital Pirovano. (1) Cátedra de Fisiopatología FFyB, (2) Cátedra de Fisiología FFyB, (3) Hospital Pirovano

La hipertensión portal (HP) es una consecuencia de las hepatopatías crónicas. Su principal complicación mortal es la hemorragia digestiva. Esta hemorragia se da principalmente por ruptura de las várices esofágicas y en la mucosa gástrica. En estómago está favorecida por la llamada gastropatía hipertensiva, como expresión de la vasodilatación esplácnica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad de la mucosa gástrica a sufrir lesiones por stress y confinamiento en la HP por estrechez reglada de la vena porta, tomando por controles ratas con una operación simulada (Sh). Se utilizaron ratas Wistar machos de un peso entre 220 y 250 g. Grupo 1 (G1. $n=8$) Sh. Grupo 2 (G2. $n=8$) HP. El stress fue inducido por encierro en tubos de 60mm de diámetro y sometidas a un ambiente frío a 4°C durante 120 minutos, previo ayuno de 24 hs. Parámetros estudiados: Número de lesiones gástricas observadas macroscópicamente. Estudio anatómopatológico de los estómagos Resultados: 1) Score de úlceras en mucosa gástrica (promedio \pm SEM): G1: 19.13 \pm 5.29; G2: 17.5 \pm 4.62. $p = n.s.$ Conclusiones: La hipertensión portal produce una gatropatía hipertensiva que predispone a la hemorragia y las lesiones gástricas. La disminución de las lesiones gástricas por stress está descrita en otros modelos como la cirrosis por ligadura de colédoco, pero no en hipertensión portal prehepática. Es posible que exista un mecanismo asociado a la vasodilatación que proteja la mucosa ante la lesión inducida por stress, pero no ante los efectos de otras agentes agresivos.

165. (12628) ESPIRONOLACTONA (E) CONTRARRESTA LA COLESTASIS INDUCIDA POR ETINILESTRADIOL (EE) EN LA RATA. RUIZ, MARÍA LAURA; VILLANUEVA, SILVINA; LUQUITA, MARCELO; OCHOA, J. ELENA; MOTTINO, ALDO; CATANIA, VIVIANA

IFISE-CONICET. Facultad de Cs. Bioq. y Farm. UNR.

Dos fracciones componen el flujo biliar total (FB): la dependiente de sales biliares (FBdSB) cuyo transportador canalicular es Bsep, y la independiente (FBiSB) atribuida principalmente a la excreción de glutatión (gsh) mediada por Mrp2. La expresión de Mrp3, de ubicación basolateral, es baja excepto en cuadros de obstrucción biliar. EE produce colestasis en la rata disminuyendo principalmente FBiSB. E produce coleseresis en la rata al aumentar el FBiSB. Objetivo: evaluar si E produce una mejora del cua-

dro colestático producido por EE. Metodología: ratas Wistar macho adultas recibieron EE (5 mg/kg/día, 5 días consecutivos, s.c.), o E (200 μ moles/kg/día, 3 días consecutivos, i.p.), o ambos (EE+E; E los 3 últimos días de tratamiento con EE). Los controles (C) recibieron propilenglicol (vehículo de EE y E) 3 ó 5 días y para el análisis se unificaron. Se evaluaron: FB, (μ l/min/g hígado); velocidad de excreción de SB (VESB; nmol/min/g hígado); velocidad de excreción de gsh (VEgsh, nmol/min/g hígado); contenido de Mrp2, Mrp3 y Bsep por immunoblotting. Resultados: (media \pm SD; diferencias significativas respecto de C: $p < 0.05$; $n=4-6$): FB (C:2.00 \pm 0.17) disminuyó en EE (0.98 \pm 0.41), aumentó en E (3.43 \pm 0.35) y se normalizó en EE+E (1.84 \pm 0.17). La VESB disminuyó en todos los grupos (EE:37 \pm 15, E:40 \pm 8 y EE+E:29 \pm 8) en comparación con C (58 \pm 10). La VEgsh (C:2.53 \pm 0.46) disminuyó en EE (0.38 \pm 0.26), aumentó en E (9.79 \pm 0.61) y se normalizó en EE+E (2.11 \pm 0.16). Mrp2 disminuyó en EE (42%), y aumentó en E (60%) y en EE+E (40%). Mrp3 aumentó en EE (200%) y en EE+E (260%) y no varió en E. Bsep no mostró diferencias significativas. E mejora la colestasis producida por EE al aumentar el FBiSB (por inducir Mrp2 y aumentar VEgsh). Es sabido que E disminuye la síntesis de SB por lo que, además, evitaría la acumulación hepática de las mismas en las ratas tratadas con EE previniendo un daño mayor. La inducción de Mrp3 en EE indicaría un cambio vectorial en la excreción de endo- y xenobióticos.

166. (12049) EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS HEPÁTICAS EN COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRÓGENOS. CARRERAS, FLAVIA I. (1); LEHMANN, GUILLERMO L. (1); FERRI, DOMENICO (2); SANCHEZ POZZI, ENRIQUE J. (1); CALAMITA, GIUSEPPE (2); MARINELLI, RAÚL A. (1)

(1) IFISE-CONICET. Universidad Nacional de Rosario. (2) Universidad de Bari. Italia

Las aquaporinas (AQPs) son proteínas canales que facilitan el transporte osmótico de agua a través de las membranas celulares. El hígado de rata expresa AQP9, localizada en la membrana basolateral de los hepatocitos y AQP8, localizada en la membrana canalicular y en compartimentos intracelulares. Recientemente observamos que en disfunción secretora biliar asociada a colestasis obstructiva, la expresión hepática de AQP8 y AQP9 está disminuida. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión génica y localización subcelular de las AQPs hepáticas en ratas con colestasis intrahepática inducida por el estrógeno etinilestradiol (EE). Resultados: La administración de EE (5 mg/kg p.c., s.c.) durante 5 días redujo el flujo biliar un 58% ($P < 0,05$). Estudios de fraccionamiento subcelular e inmunoblotting indicaron que AQP8 disminuyó tanto en membrana plasmática (-88%; $P < 0,05$) como en la fracción intracelular (-73%; $P < 0,05$). La colestasis por EE no modificó significativamente los niveles proteicos de AQP9, ni su localización subcelular. Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica de secciones de hígado. En las ratas tratadas con EE, el ARNm de AQP8, medido por Northern blot, aumentó significativamente un 115%. Por otra parte, se evaluó el efecto protector de la sal biliar ursodeoxicolato (UDC) en la colestasis inducida por EE. La co-administración de UDC (25 mg/kg p.c., i.p.) previno parcialmente la colestasis, pero no corrigió la disminución proteica de AQP8. Conclusión: la colestasis por EE disminuyó la expresión de hepática AQP8, posiblemente mediante mecanismos post-transcripcionales, sin alterar los niveles proteicos de AQP9 ni su localización subcelular. La expresión defectuosa de AQP8 podría estar involucrada en los mecanismos moleculares determinantes de la disfunción secretora biliar en colestasis. No obstante, la prevención del cuadro colestático inducida por UDC no está mediada por una normalización de la expresión de AQP8.

167. (12770) ACCIÓN CITOTÓXICA DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 (STX2) DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE GB3 EN MODELOS CELULARES DE EPITELIO INTESTINAL

HUMANO. NUÑEZ, PABLO; PISTONE CREYDT, VIRGINIA(1); BIBINI, MARIEL(2); IBARRA, CRISTINA(1)

(1)Laboratorio de Fisiopatogenia, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA. (2)Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Facultad de Medicina UBA

E. coli enterohemorrágica (EHEC) productora de toxina Shiga (Stx) produce diarrea acuosa, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). El SUH se produce por la acción de Stx luego de trasladar la barrera intestinal. El objetivo de este trabajo fue dilucidar los efectos citotóxicos de Stx2 y de su subunidad B (Stx2B) asociados a las distintas vías de entrada de la toxina y la potenciación por factores inflamatorios. Se estudió la acción de ambas toxinas en las líneas celulares Caco-2 (Gb3+) y T84 (Gb3), aceptadas como modelos de intestino humano. La viabilidad celular se cuantificó mediante la incorporación de rojo neutro en presencia o ausencia de IL1?, IL6, IL8 o TNF? preincubados durante 24hs. La apoptosis celular se evaluó por citometría de flujo y la inhibición de síntesis proteica por incorporación de 35S-metionina. Stx2 disminuyó la viabilidad celular de Caco-2 de manera dosis y tiempo dependiente (1 pg/ml a 24hs de incubación, $p < 0.05$). La toxina también estimuló la apoptosis celular y redujo la síntesis de proteínas pero a concentraciones mayores. En T84, Stx2 disminuyó la viabilidad celular (100 ng/ml a 18hs de incubación, $p < 0.001$), inhibió la síntesis de proteínas pero no estimuló la apoptosis celular. Estos resultados demuestran que el efecto citotóxico de Stx2 es mayor en presencia de Gb3. Sin embargo la toxina es capaz de modificar la viabilidad y la síntesis de proteínas aún en ausencia del receptor Gb3. En ambas líneas celulares, 1 ug/ml de Stx2B no alteró la viabilidad, la síntesis de proteínas ni la apoptosis celular. Los factores inflamatorios no potenciaron la citotoxicidad de Stx2 ni de Stx2B. En conclusión, los mecanismos citotóxicos de Stx2 en el epitelio intestinal estarían asociados de una manera diferencial a vías de entrada dependientes o independientes del receptor Gb3.

REPRODUCCION A

- 168. (12147) DISFUNCIÓN TESTICULAR DISOCIADA EN UN PACIENTE CON SÍNDROME DE MCCUNE-ALBRIGHT: MECANISMO PATOGENICO.** REY, RODOLFO; VENARA, MARCELA; COUTANT, RÉGIS; PICARD, JEAN-YVES; LUMBROSO, SERGE

CEDIE, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires. rodolforey@cedie.org.ar. Département de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers; INSERM U.493, Clamart; Centre Hospitalier Universitaire, Montpellier, Francia

La proteína Gs-alfa transduce la señal de la LH en las células de Leydig y de la FSH en las células de Sertoli. Se han descrito mutaciones somáticas activadoras en el gen de la proteína Gs-alfa, presentes como un mosaicismo en diferentes tejidos en pacientes con el síndrome de McCune-Albright (SMA). Cuando la mutación está en el tejido gonadal, los varones pueden presentar una pseudopubertad precoz por activación testicular primaria, independiente de gonadotropinas. Previamente habíamos estudiado un niño de 3 años con SMA, con macro-orquidismo y niveles séricos elevados de AMH (marcador de Sertoli), pero con testosterona baja y sin signos de pubertad. La mutación activadora R201H fue hallada en el gen Gs-alfa de ADN extraído de tejido testicular. Los padres dieron consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el comité del Centre Hospitalier de Angers. Ahora, nuestro objetivo fue esclarecer por qué parecía haber una anormal activación sertoliana sin activación leydigiana. La biopsia testicular mostró hiperplasia de células de Sertoli; no había activación de la espermatogénesis ni de las células de Leydig. Para explicar por qué sólo las células de Sertoli mostraban hiperactividad, realizamos una disección con microscopio de captura láser de la biopsia testicular, aislando los túbulos seminíferos del tejido intersticial. Al ser amplificado por PCR anidada y

secuenciado el gen de la proteína Gs-alfa, el ADN aislado del tejido tubular presentó la mutación R201H, mientras que el del tejido intersticial fue normal. En ensayos luciferasa, la capacidad trans-activadora sobre el promotor de la AMH de un plásmido del gen Gs-alfa R201H fue significativamente mayor que la de un plásmido Gs-alfa normal (media \pm desvío estándar: R201H: $3,7 \pm 0,9$ RLU vs. normal: $2,1 \pm 0,7$ RLU; $p < 0,05$). La mutación somática R201H afectó sólo a las células de Sertoli, siendo probablemente responsable de la disfunción testicular disociada, caracterizada por hiperfunción sertoliana sin disfunción leydigiana.

- 169. (12148) N-ACETYLGLUCOSAMINIDASA (NAG) PARTICIPA EN LA UNION PRIMARIA ESPERMATOZOIDE-ZONA PELLUCIDA (ZP).** ZITTA, KARINA; MIRANDA, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET

La NAG es la glicosidasa más abundante en espermatozoides de mamífero. Ha sido involucrada en el proceso de fertilización, aunque no está claro en cual de sus etapas. En el presente trabajo quisimos determinar si la NAG participaba en la interacción del espermatozoide de hamster con la ZP y de ser así, en que paso durante este complejo proceso. Los espermatozoides fueron purificados e incubados en medio TALP suplementado con 3 mg/ml de BSA para su capacitación. Los ovocitos, obtenidos por superovulación, fueron liberados del cúmulus con hialuronidasa y utilizados en el momento para el ensayo de fertilización in vitro (FIV) o mantenidos en sulfato de amonio para su posterior uso en ensayos de unión. La actividad enzimática se midió con un sustrato fluorométrico específico. NAG humana recombinante se purificó del medio de cultivo de células CHO con expresión estable de la enzima. Zona pelúcida soluble, obtenida por tratamiento ácido de los ovocitos, fue capaz de inhibir a la NAG de espermatozoides ($41 \pm 3\%$ del control a 33 ZP/ml, $p < 0.01$). Ligandos específicos de NAG fueron capaces de inhibir la unión espermatozoide-ZP ($50 \pm 14\%$ para el inhibidor 2-acetamido-2-deoxy-D-glucono-1,5-lactone 1 mM, y 40 ± 3 para el sustrato p-nitrofenil-N-acetylglucosaminide 3 mM, vs control=100, $p < 0.05$). La lactona inhibió la FIV ($52 \pm 5\%$, $p < 0.05$) solo estando presente desde el comienzo del ensayo y no afectó la fusión ni la reacción de zona. La NAG recombinante inhibió la unión de los espermatozoides a la ZP al estar presente durante los ensayos de unión o por pre-incubación de los ovocitos (43 ± 3 y $54 \pm 7\%$ del control, respectivamente $p < 0.05$). La NAG exógena también inhibió la FIV (46 ± 2 y $67 \pm 3\%$ del control para co y pre-incubación, respectivamente, $p < 0.05$). Igual cantidad de proteína total proveniente de células CHO control no causaron ningún efecto. Estos resultados sugieren que la NAG participaría en la unión primaria del espermatozoide de hamster a la ZP actuando no como una enzima sino como una proteína unidora de azúcares.

- 170. (12235) IDENTIFICACIÓN DEL DOMINIO DE UNIÓN AL OVOCITO DE LA PROTEÍNA EPIDIDIMARIA "DE".** COHEN, DEBORA; DA ROS, VANINA; MAURO, MORGENFELD; BUSSO, DOLORES; ELLERMAN, DIEGO; CUASNICU, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

La proteína epididimaria de rata DE pertenece a la familia CRISP (cysteine-rich secretory proteins) y participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios de unión en el ovocito. La evaluación de la capacidad de unión al ovocito de diferentes fragmentos recombinantes de DE sugirió que dicha capacidad residiría en la región de aminoácidos 114 -158. Con el fin de identificar el sitio activo de DE, en el presente trabajo evaluamos la capacidad de dicha región (F7) de inhibir el proceso de fusión. La incubación con F7, pero no con F6 (aa 62-112) (control), produjo una inhibición significativa ($p < 0.05$) y dependiente de la concentración (6 uM-30 uM) en el porcentaje de ovocitos fusionados (C: $86 \pm 6\%$, F6: 100% , F7: $42 \pm 4\%$, 30 uM), confirmando que el dominio activo se encontraría dentro de F7. Interesantemente, esta

región contiene los dos motivos característicos de la familia CRISP denominados Signatures 1 y 2. Con el fin de investigar si los mismos eran responsables de la actividad de DE, se sintetizaron los péptidos: P1 (GHYTVVWNST) y P2 (FYVCHYCPGGNY), correspondiendo a ambos motivos, y se evaluó su unión al ovocito por inmunofluorescencia (IIF). Mientras los ovocitos incubados con P1 no mostraron marca fluorescente, aquellos incubados con P2 presentaron una clara marcación. La especificidad de dicha unión fue confirmada por la falta de marcación obtenida al emplear un péptido con los mismos aminoácidos que P2 en forma desordenada. El análisis por IIF de diferentes proteínas CRISPs disponibles indicó que aquellas proteínas capaces de unirse al ovocito de rata presentaban un Signature 2 muy similar al de DE, mientras que aquellas que no se unían, presentaban una homología menor. En conjunto, estos resultados indican que el sitio de unión de DE estaría en una región de 12 aminoácidos altamente conservada en todas las proteínas CRISP, sugiriendo su relevancia para el mecanismo de acción de otros miembros de esta amplia familia.

171. (12405) REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN CÉLULAS DE SERTOLI POR GLUCOSA. GALARDO, MARÍA NOEL LUJÁN; RIERA, MARÍA FERNANDA; PELLIZZARI, ELIANA H.; CIGORRAGA, SELVA B.; MERONI, SILVINA B.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños R Gutiérrez

La entrada de glucosa (G) a la célula de Sertoli (CS) es fundamental para la producción de lactato, nutriente esencial para el desarrollo del epitelio germinal. La entrada de G se realiza por difusión facilitada utilizando transportadores específicos denominados GLUTs. En algunos sistemas, se ha visto que la disminución del aporte de G produce un aumento en la capacidad de la célula para incorporar este azúcar. El objetivo del trabajo fue en CS: a) estudiar los efectos de la privación de G en la incorporación de dicho sustrato y b) analizar posibles mecanismos involucrados. Cultivos de CS de rata de 20 días de edad fueron expuestos por 48 hs a distintas concentraciones de G (8, 4 ó 0 mM) y se analizó la incorporación de 2-deoxiglucosa tritiada (2-DOG). Se observó un aumento en la incorporación de G con la disminución de G en el medio (8mM: 666±68a, 4mM: 855±28b, 0mM: 2105±19c, dpm/μg ADN; X±DS, n=3, diferentes letras indican diferencias significativas p<0.01). Para analizar la participación de la traslocación de GLUTs preexistentes y/o del incremento en la síntesis de los mismos en el fenómeno observado, en células cultivadas en 8 y 0mM de G se estudiaron: 1) la incorporación de 2-DOG en presencia o ausencia de 100 μM Nocodazol (despolimerizante de los microtúbulos -Noc-) ó 1 μM Citocalasina D (inhibidor del ensamblaje de los filamentos de actina -CitD-) y 2) los niveles de ARNm de GLUT1 por Northern blot. El incremento en la incorporación de 2-DOG fue parcialmente inhibido por CitD y no por Noc (8mM: 854±39a, 0mM: 2245±185b, 0mM+CitD: 1531±163c, 0mM+Noc: 2712±319b dpm/μg ADN). Asimismo se observó en CS cultivadas en 0mM G un aumento en los niveles de ARNm de GLUT1 (6.7 veces vs 8mM, n=3). Los resultados obtenidos sugieren que la privación de G en CS produce un aumento en el transporte de G que se debe en parte a translocación de GLUTs hacia la membrana plasmática, dependiente de la integridad de los filamentos de actina, y en parte a un aumento en la biosíntesis de GLUT1.

172. (12595) REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN MASIVA DE OOCITOS EN EL OVARIO ADULTO DE LAGOSTOMUS MAXIMUS. JENSEN, FEDERICO; WILLIS, MIGUEL; ALBAMONTE, MIRTA; ESPINOSA, MARIA BEATRIZ; VITULLO, ALFREDO

CEBBAD-Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnósticos-Univ Maimónides

Las hembras de mamíferos nacen con un número definido y no renovable de células germinales, todas las cuáles se encuen-

tran detenidas en meiosis I y rodeadas por células somáticas definiendo estructuras conocidas como folículos. La gran mayoría de estas células producidas durante la vida fetal se pierden por atresia. Se ha propuesto, que la cantidad relativa de proteínas anti apoptóticas, BCL-2 y BCL-XL en relación a pro apoptóticas, BAX y BCL-XS, funciona como un "reóstato" que determina la susceptibilidad de la célula a sufrir apoptosis. Las hembras de *L. maximus* poseen la tasa de ovulación más alta descripta para mamíferos, ovulan entre 400 y 800 oocitos en cada ciclo, 8 a 10 son fecundados e implantados y sólo 1 ó 2 gestados a término. Se estudió la regulación de esta producción masiva de gametas mediante análisis de la integridad/fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL, y la funcionalidad del reóstato BCL-2/BAX por inmunohistoquímica, como así también la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona. Se observó que las hembras adultas de *L. maximus* poseen una inversión natural del reóstato BAX/BCL-2 con una alta expresión de la proteína anti apoptótica BCL-2 y una expresión constitutiva de BAX en todas las muestras estudiadas. Esta inversión esta relacionada con la baja recurrencia de folículos atrésicos encontrados por medio de la técnica de TUNEL y la alta tasa ovulatoria de estos animales. De manera complementaria la expresión del receptor alfa de estrógenos que actúa como factor de sobrevida en el ambiente ovárico, presenta una marcada expresión. En conclusión, *L. maximus* muestra una supresión natural de la atresia ovárica por sobreexpresión de BCL-2, que permite sostener una producción masiva y constante de gametas femeninas.

173. (12614) LA ANANDAMIDA (AEA) INHIBE LA UNIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES AL OVIDUCTO BOVINO. RAPANELLI, MAXIMILIANO; BILLI, SILVIA; FRANCHI, ANA; PEREZ MARTINEZ, SILVINA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET

Los endocannabinoides (ECB) modulan negativamente la función espermática en espermatozoides (ESP) humanos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación de la AEA, principal ECB, en la interacción espermatozoide-oviducto bovino. Para ello se investigó 1) si el ESP bovino expresa los diferentes subtipos de receptores (Cb1;Cb2) para ECB, 2) si el oviducto bovino es capaz de sintetizar AEA, 3) el efecto de AEA exógena en la interacción espermatozoide-oviducto in vitro. El semen bovino fue descongelado e incubado en S-TALP. Los oviductos se perfundieron y los folículos obtenidos se incubaron 7 días en M199 a 39 °C. Los cultivos se incubaron 1 h con 5x10⁵ ESP/ml. El cocultivo fue fijado y se cuantificó el nº de ESP/área. Los resultados, observados mediante las técnicas de RT-PCR, Western Blot e inmunocitoquímica, muestran que los ESP bovinos expresan tanto Cb1 (281pb; 64 kDa) como Cb2 (187pb; 50 kDa), este último encontrado por primera vez en espermatozoides de mamíferos, y que ambos receptores se localizan principalmente en la cabeza del ESP. Para investigar el punto 2) se utilizó la técnica de radioconversión de ácido araquidónico ((14)CAA) a (14)CAEA. Se observó que el oviducto bovino sintetiza AEA en la ampolla e istmo (3,49±0,72 y 0,47±0,2 nmol (14)CAEA /h/mg proteína, respectivamente). Los resultados indicaron que la incubación del cocultivo en presencia de metaAEA (análogo estable de AEA) disminuye la unión de los ESP a las células oviductales (Control: 81,7; metaAEA 10(-9) M: 47,4 ESP/mm(2); p<0,001). Concluimos que el sistema ECB está presente en espermatozoides y oviducto bovino y que la AEA modularía negativamente la interacción entre ambos, posiblemente a través de los receptores Cb1 y Cb2 del ESP. Futuros estudios indicarán si dicha molécula puede actuar como un factor decapacitante e inhibir la unión de los ESP al oviducto o si participa en la liberación de los mismos de las células oviductales para la fertilización.

174. (12629) PROPIEDADES DE DESAGREGACIÓN DEL FILAMENTO DE MIOSINA DE CÉLULAS MIOIDES PERITUBULARES. BERTOLDI, MARÍA VICTORIA;

LEYTON, CAROLINA M; FERNÁNDEZ, DARÍO; LÓPEZ, LUIS A

Laboratorio de Citoesqueleto y Ciclo Celular. Instituto de Histología y Embriología. IHEM-CONICET. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. República Argentina.

El túbulo seminífero (TS), contiene el epitelio germinal y el mecanismo para transportar espermatozoides hacia la rete testis. Una capa de células mioideas peritubulares (CMP) con un citoesqueleto semejante al de las células de músculo liso rodean al TS y son las responsables de la contracción. En nuestro laboratorio, purificamos y caracterizamos miosina de CMP (miosina-CMP), que presenta ciertas características de miosina II de músculo liso (MML II), pero que difiere fundamentalmente en que no se encuentra ensamblada en filamentos en el citoplasma de las CMP. Miosina-CMP solo forma filamentos *in vitro* cuando se encuentra en soluciones de baja fuerza iónica a 37°C. Se analizó la estabilidad de los filamentos de miosina-CMP en soluciones de distintas concentraciones de NaCl o de ATP. Se utilizó como control MML II de pollo. Miosina-CMP y MML II (0,2 mg/ml), se incubaron a 37°C 30 minutos, se centrifugaron y se separaron los filamentos formados. Los filamentos fueron incubados con 40 mM de buffer fosfato (pH 7,5) a 4°C, conteniendo 0-400 mM de NaCl o 0-32 mM de ATP. Se centrifugaron las suspensiones y se analizaron los sobrenadantes. El tratamiento con NaCl indicó que tanto miosina-CMP como MML II comenzaron a solubilizarse con 200 mM y con 250 mM se solubilizó el 30% y 43% respectivamente; con 300 mM se solubilizaron el 60,31±7,42% y 59,78±4,85% respectivamente, y con 400 mM ambos filamentos se solubilizaron completamente. Cuando se utilizó el medio con ATP se comprobó que miosina-CMP se solubiliza 60% (2mM) y 100% (4mM); mientras que MML II se solubiliza 30% (4mM), 45% (8mM) y 100% (16mM). De estos resultados los filamentos de miosina-CMP tienen la misma estabilidad que los de MML II frente a soluciones de distinta fuerza iónica, pero son significativamente más lábiles en presencia de ATP. Se interpreta que los filamentos de miosina-CMP presentan en sus dominios LMM una conformación que permite que ATP interactúe más fácilmente produciendo cambios de conformación que desagregan a estas moléculas.

175. (12718) INFLUENCIA DE CONTAMINANTES AGRO-INDUSTRIALES EN LA DINÁMICA OVÁRICA DE CAIMAN LATIROSTRIS (YACARÉ OVERO). STOKER, CORA; BELDOMÉNICO, PM; REY, F; MUÑOZ-DE-TORO, MM; LUQUE, EH

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac de Bioquímica y Cs Biológicas, UNL.

Los perturbadores endocrinos (PE) imitan y/o antagonizan la acción de las hormonas endógenas alterando la homeostasis endocrina. El bisfenol A (BPA) es un compuesto utilizado en la fabricación de plásticos. La atrazina y el endosulfán son herbicidas muy difundidos. Todos ellos están clasificados como PE. Previamente demostramos que la exposición *in ovo* a BPA produce reversión sexual y/o alteraciones de la histoarquitectura gonadal similares al 17β-estradiol (E2). Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la exposición *in ovo* a E2, BPA, atrazina y endosulfán sobre la dinámica ovárica neonatal en *C. latirostris*. Huevos cosechados en áreas de baja probabilidad de contaminación, incubados a 30°C (temperatura que produce hembras) se topicaron en la etapa 20 de desarrollo embrionario con vehículo o dosis ambientalmente relevantes de E2 0.014ppm, BPA 1.4ppm, atrazina 0.02ppm y endosulfán 0.02ppm; 2ppm; 20ppm. A los 10 días de edad se estudió la dinámica ovárica mediante cuantificación de las etapas de crecimiento y maduración de células germinales (ovogonias) y folículos previtelogénicos (estadios I a III) en cortes histológicos seriados coloreados con Picrosirius-hematoxilina. Se observó un aumento significativo de folículos previtelogénicos estadio III en los grupos tratados con E2, BPA y

atrazina. La población de células germinales disminuyó en los animales tratados con E2 y BPA, mientras que con atrazina fue semejante al control. Se demuestra que E2 y BPA aumentan la velocidad de maduración de los folículos a expensas del número de células germinales, mientras que atrazina adelantó el desarrollo folicular a expensas tanto de células germinales como de los estadios I y II. Endosulfán no afectó la dinámica ovárica neonatal en las dosis ensayadas. La alteración en el desarrollo folicular promovida por BPA y atrazina podría influir en la aptitud reproductiva de estas hembras en la vida adulta poniendo en riesgo el equilibrio del ecosistema.

176. (12742) LA EXPOSICIÓN PRENATAL A BISFENOL A ALTERA EL DESARROLLO FOLICULAR Y LA ESTEROIDOGÉNESIS DE CAIMAN LATIROSTRIS (YACARÉ OVERO). REY, FLORENCIA; STOKER, C; LUQUE, EH; MUÑOZ-DE-TORO, M

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac de Bioquímica y Cs Biológicas, UNL.

Varios contaminantes ambientales alteran la homeostasis del sistema endócrino y se denominan perturbadores endocrinos (PE). El bisfenol A (BPA) es un PE ampliamente difundido y su detección en cursos de agua representa un riesgo para la salud. El yacaré overo, posee características fisiológicas y ecológicas que sugieren su utilidad como especie centinela de contaminación con PE. Previamente demostramos que, en yacaré expuestos *in ovo* a 17β-estradiol (E2) o BPA se promueve reversión sexual y/o alteraciones en la histoarquitectura gonadal. El objetivo fue estudiar si la perturbación endócrina inducida por BPA se manifiesta en el largo plazo, un año después de finalizada la exposición. Se incubaron huevos a 30°C y 33°C (temperaturas para obtener 100% de hembras y 100% machos, respectivamente) y en el estadio 20 del desarrollo embrionario se topicaron con vehículo, E2 (0.014 y 1.4ppm) o BPA (1.4 y 140ppm). Los animales se criaron en condiciones controladas y alimentación *ad limitum*, se sacrificaron a los 12 meses, se obtuvo sangre para determinar E2 y testosterona (T) por RIA y el complejo gonadal-adrenal-mesonefros (GAM) para evaluar la dinámica ovárica. Se confirmó la reversión sexual en animales nacidos de huevos incubados a 33°C y tratados con las dosis más altas de E2 (1.4ppm) y de BPA (140ppm). Cortes histológicos del complejo GAM de hembras tratadas con E2 o BPA u obtenidas por reversión presentaron un incremento significativo en el número de folículos poliovulares. Los niveles hormonales de las hembras obtenidas por reversión no se diferenciaron de las hembras controles. Los machos expuestos *in ovo* a 1.4ppm BPA tuvieron concentraciones menores de T respecto a los controles (193±28pg/ml y 266±16pg/ml, respectivamente). Los resultados demuestran que la perturbación endócrina inducida por exposición prenatal a un xenoestrógeno se mantiene en el tiempo alterando el desarrollo folicular y la esteroidogénesis. Estas alteraciones pueden afectar la capacidad reproductiva de *C. latirostris*.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

177. (12118) CA2+-CALMODULINA (CM) FACILITA LA FORMACIÓN DE POROS DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (PTPM) INDUCIDOS POR ESTRÉS OXIDATIVO VÍA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNA QUINASA II (PKII). PÉREZ, L.M.; OCHOA, J.E.; SÁNCHEZ POZZI, E.J.; ROMA, M.G.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE), CONICET-Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario - Argentina.

El estrés oxidativo es un evento común a muchas hepatopatías, conduciendo a lipoperoxidación de membranas. La formación secundaria de PTPM podría agravar este cuadro, vía

fuga de electrones de la cadena respiratoria y consecuente formación de radicales libres. En un estudio previo, demostramos que la generación de lipoperoxidación por el agente pro-oxidante tert-butil hidroperóxido (tBOOH) es dependiente de CM. En este trabajo, corroboramos la participación de PTPM en dicho proceso y la intervención de las moléculas dependientes de CM PKII (principal mediador de señalización de CM) y calcineurina (con capacidad potencial de translocar Bad a mitocondria, con generación de PTPM). La lipoperoxidación inducida por tBOOH 500 μM (+450 %, $p < 0.001$) no fue solo debida a la generación de radicales libres secundaria a su metabolización, sino a la formación de PTPM, dado que el inhibidor de PTPM ciclosporina A previno parcialmente este efecto (-37%, $p < 0.025$). La fracción de lipoperoxidación dependiente de PTPM fue totalmente abolida por la quelación del $\text{Ca}(2+)$ intracelular con BAPTA/AM (50 μM) y por la inhibición de CM con W7 (100 μM) o trifluoperazina (10 μM), sugiriendo que la formación de PTPM inducida por tBOOH es dependiente de $\text{Ca}(2+)$, vía CM. Esto fue corroborado cuantificando la formación de PTPM, midiendo el grado de despolarización de la membrana mitocondrial como parámetro subrogado utilizando tetrametil-rodamina metil éster como sonda fluorescente. Los inhibidores de PKII calmidazolium (10 μM) y KN-62 (10 μM), pero no el inhibidor de calcineurina FK506 (1 μM), previnieron parcialmente ambos eventos (-23% y -17%, $p < 0.05$, respectivamente). Concluimos que el $\text{Ca}(2+)$ exacerba el daño oxidativo hepa-tocelular por formación de PTPM activando PKII, vía CM. Dado que la inhibición de PKII sólo previno parcialmente estos fenómenos, otras moléculas dependientes de CM aún no identificadas, y distintas de calcineurina, estarían involucradas.

178. (12128) ROL DE AKT EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR DEPENDIENTE DEL ESTADO REDOX. ANTICO ARCIUCH, VALERIA GABRIELA; GALLI, SOLEDAD; FRANCO, MARÍA CLARA; SASSONE, ALINA; CARRERAS, MARÍA CECILIA; PODEROSO, JUAN JOSÉ

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires

Akt es una serina/treonina proteína quinasa que posee alta homología con las proteínas quinasas A y C y además constituye el homólogo celular de la oncoproteína viral v-Akt. Esta quinasa es activada por varios estímulos como factores de crecimiento, citoquinas y estrés celular y de esta forma regula procesos como el metabolismo de la glucosa, la supervivencia celular y la angiogénesis. El objetivo de este trabajo fue analizar la modulación del tráfico de Akt por H_2O_2 en conexión con la progresión del ciclo celular de la línea NIH/3T3. La distribución subcelular de P-Akt (núcleo, mitocondria y citosol) fue analizada por western blot y la localización mitocondrial de Akt fue confirmada por microscopía confocal con Mitotracker Red. El índice de proliferación y apoptosis fueron evaluados por incorporación de $[\text{H}(3)]$ timidina, citometría de flujo con iodo de propidio y tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. En células tratadas con 50 μM H_2O_2 el índice de proliferación aumentó 37% mientras que al ser incubadas con 250 μM H_2O_2 disminuyó 40% (control: 3980.6 ± 687.7 dpm; $p < 0.05$). 250 μM H_2O_2 causó apoptosis evidenciada por la aparición de un pico hipodiploide en la citometría de flujo. Por otra parte, diferencias en el estado redox celular provocaron una redistribución de P-Akt. A 50 μM H_2O_2 la activación de Akt y su translocación al núcleo fueron rápidas y persistentes mientras que a 250 μM H_2O_2 resultaron transitorias. Por el contrario, 50 μM H_2O_2 no ejerció modulación sobre P-Akt mitocondrial mientras que 250 μM H_2O_2 indujo la entrada y retención de P-Akt en la organela. Estos resultados sugieren que H_2O_2 provoca la activación y tráfico diferencial de Akt regulando la progresión del ciclo celular. De esta forma, la retención mitocondrial de P-Akt podría restringir los efectos nucleares proliferativos favoreciendo la activación de la apoptosis.

179. (12144) EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF) INDUCE LA PROLIFERACIÓN DE UN ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO POR UN MECANISMO QUE REQUIERE DE LOS RECEPTORES DE TNF TIPO 1 Y 2 (TNFR1 Y TNFR2). RIVAS, MARTIN; ROSEMBLIT, CINTHIA; CARNEVALE, ROMINA; SALATINO, MARIANA; PROIETTI, CECILIA J; BÉGUELIN, WENDY; CHARREAU, EDUARDO H; ELIZALDE, PATRICIA V; SCHILLACI, ROXANA

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET. Buenos Aires, Argentina.

Previamente demostramos que el TNF es mitogénico en las células C4HD, provenientes de un tumor mamario murino progestágeno dependiente, y que las quinasas involucradas en dicho efecto son la p42/p44 MAPK, JNK y PI-3K/Akt. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de TNFR1 y TNFR2 y establecer su participación en la proliferación y señalización intracelular en células C4HD. Se determinó que las células C4HD expresan TNFR1 y TNFR2, mediante citometría de flujo y Western Blot. Utilizando anticuerpos (Ac) bloqueantes dirigidos contra uno u otro receptor en células C4HD tratadas con TNF 20ng/ml, se observó la inhibición completa de las vías p42/p44 MAPK, JNK y PI-3K/Akt tanto con Ac anti TNFR1 como con Ac anti TNFR2. Utilizando Ac estimulantes de los respectivos receptores se observó que cada uno por separado fue capaz de activar la mencionadas quinasas. En ensayos de proliferación por incorporación de timidina- $[\text{H}]$ se observó que, tanto el bloque de TNFR1 como el de TNFR2 con los respectivos Ac, disminuyó la proliferación de las células C4HD inducida por TNF en un $58,2 \pm 4,5\%$ y $76,1 \pm 15,9\%$ respectivamente. Mientras tanto, la adición de los Ac estimulantes de cada receptor por separado, aumentó la proliferación de las células C4HD en un $89,7 \pm 5,9\%$ para el TNFR1 y en un $113,1 \pm 19,9\%$ para el TNFR2, considerando 100% la estimulación inducida por TNF. En este trabajo hemos demostrado que el TNFR1 y el TNFR2 por separado son capaces de inducir la proliferación de las células C4HD y la activación de la p42/p44 MAPK, JNK y PI-3K/Akt. Finalmente mostramos que es necesario que ambos receptores de TNF sean funcionales para que se produzca la proliferación y señalización inducida por TNF.

180. (12231) MAPK ACTIVADAS POR HEREGULINA (HRG) Y POR EL PROGESTÁGENO SINTÉTICO ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) FOSFORILAN A STAT3 EN SERINA727 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA. ROSEMBLIT, CINTHIA; PROIETTI, CECILIA; SALATINO, MARIANA; CARNEVALE, ROMINA; RIVAS, MARTIN; BÉGUELIN, WENDY; CHARREAU, EDUARDO H.; SCHILLACI, ROXANA; ELIZALDE, PATRICIA V.

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET - Buenos Aires - Argentina

Previamente demostramos que HRG, ligando de los receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I (RTKs-I), activa p42/p44 MAPK en células C4HD progestágeno-dependiente, provenientes de un adenocarcinoma mamario murino inducido por MPA. Además, se sabe que HRG activa MAPK en la línea celular de cáncer de mama humano T47D. En el presente trabajo estudiamos la fosforilación de la proteína transductora de señales y activadora de transcripción 3 (Stat3) en serina727 por MAPK activadas por HRG y MPA en cáncer de mama. Tanto en células C4HD como en T47D, el tratamiento con HRG (20 ng/ml) y MPA (10 nM) por 5 a 10 minutos produjo fosforilación de Stat3 en serina727, medida por western blot utilizando un anticuerpo contra la forma fosforilada de Stat3. Al preincubar las células con el inhibidor de MAPK U0126 (10 μM), se inhibió la fosforilación así como la activación transcripcional de Stat3. Demostramos además que MAPK activadas por HRG o MPA son capaces de fosforilar in vitro a Stat3 usando ensayos con ATP no radioactivo y MAPK

inmunoprecipitadas de células C4HD y T47D tratadas con HRG y MPA. Es sabido que la fosforilación de Stat3 en serina727 es esencial para su activación transcripcional. Sin embargo, no se conocen los mecanismos ni las quinasas involucradas. Nuestros resultados demuestran por primera vez que MAPK activadas por un ligando de RTKs-I y por progestágenos son capaces de fosforilar in vivo e in vitro a Stat3.

181. (12310) EFECTOS NO GENÓMICOS DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA) INDUCEN LA PROLIFERACIÓN DE CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO. CARNEVALE, ROMINA; SCHILLACI, ROXANA; URTREGER, ALEJANDRO (1); SALATINO, MARIANA; PROIETTI, CECILIA; RIVAS, MARTÍN; ROSEMBLIT, CINTHIA; BÉGUELIN, WENDY; CHARREAU, EDUARDO; BAL DE KIER JOFFÉ, ELISA (1); ELIZALDE, PATRICIA V

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"

La progesterona induce la proliferación de células de carcinoma mamario mediante la interacción con su receptor clásico. Trabajos previos demostraron que dicha interacción resulta en la activación del receptor de progesterona (RP) como factor de transcripción así como en la activación rápida de diversas vías de transducción de señales. En el presente trabajo se estudió la capacidad del MPA de estimular la activación rápida de ERK1/2 y PI-3K/Akt y se analizó la regulación de la proliferación por MPA en forma independiente de la actividad transcripcional del RP en las células de carcinoma mamario humano T47DY y murino LM3 (las cuales no expresan RP). Las células T47DY y LM3 fueron transfectadas en forma transiente con un plásmido de expresión conteniendo la isoforma B del RP (T47DY-RP, LM3-RP) o una forma transcripcionalmente inactiva (T47DY-RPi, LM3-RPi). El tratamiento con MPA 10nM por 10 minutos aumentó la fosforilación de ERKs y de Akt tanto en las T47DY-RP y T47DY-RPi como en las LM3-RP y LM3-RPi (Western Blot). El antiprogéstágeno RU486 10nM revirtió la activación de ERKs por MPA en las T47DY y en las LM3 transfectadas con ambos tipos de receptores. Sin embargo, la activación de Akt por MPA fue revertida en presencia de RU486 solo en las T47DY-RP y T47DY-RPi. El tratamiento con MPA por 24hs aumentó la proliferación un 33±6% en las T47DY y un 43±3% en las LM3 transfectadas tanto con RP como con RPi (incorporación de timidina[(3)H]). Este efecto fue revertido por la presencia de RU486 y los inhibidores específicos de ERKs (U0126) y de PI-3K/Akt (Ly294002) en las células transfectadas con RP y RPi. Estos resultados demuestran que la inducción de la proliferación por MPA en células de carcinoma mamario humano y murino es independiente de la actividad transcripcional del RP y está mediada por las vías ERK1/2 y PI-3K/Akt.

182. (12391) PARTICIPACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 EN CÁNCER DE MAMA. BÉGUELIN, WENDY; SALATINO, MARIANA; PROIETTI, CECILIA; CARNEVALE, ROMINA; RIVAS, MARTÍN; ROSEMBLIT, CINTHIA; CHARREAU, EDUARDO; SCHILLACI, ROXANA; ELIZALDE, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina

Previamente demostramos que la proteína caveolina-1 (cav-1) está regulada positivamente por el tratamiento con el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) en el tumor mamario murino C4HD, el cual requiere MPA para su crecimiento y expresa receptores de progesterona (PR). También hemos demostrado que la regulación positiva de la expresión de cav-1 por MPA involucra al PR clásico y que el MPA es capaz de inducir la fosforilación de cav-1. A partir de estos antecedentes se evaluó si el MPA regula transcripcionalmente la expresión de cav-1 en diferentes modelos. Además, se determinó cuál es la quinasa responsable de la fosforilación de cav-1 inducida por MPA. Los resultados muestran que en células C4HD transfectadas

con un vector reportero de luciferasa bajo el control transcripcional del promotor de cav-1 (PGL3-mcav-1-Luc), el MPA indujo una significativa activación del promotor de cav-1 (2,5 veces, $p < 0,001$). Este efecto fue inhibido por el pre-tratamiento con el antagonista del PR RU486. Estos resultados se corroboraron en la línea celular humana de cáncer de mama T47D transfectada con el mismo plásmido, en la línea celular T47DY y en la línea tumoral mamaria murina LM3, estas dos últimas co-transfectadas con un vector de expresión de PRB y el plásmido PGL3-mcav-1-Luc, ya que no expresan PR. Por otro lado, el tratamiento de células C4HD con MPA provocó la fosforilación de cav-1 a los 5 y 10 minutos, efecto bloqueado por un inhibidor de la familia de las quinasas Src, PP2 (40 % vs MPA). Demostramos además, mediante un ensayo de fosforilación in vitro, que Src activada por MPA es capaz de fosforilar a cav-1. Nuestros resultados indican por primera vez que el progestágeno MPA regula la expresión de cav-1 a nivel transcripcional en cáncer de mama, por un mecanismo que involucra al PR clásico, y que Src es la quinasa responsable de la fosforilación de cav-1 inducida por MPA.

183. (12462) HEREGULINA (HRG) ACTIVA STAT3 POR UN MECANISMO DEPENDIENTE DE ERBB-2 Y SRC EN CÁNCER DE MAMA. PROIETTI, CECILIA JAZMÍN; ROSEMBLIT, CINTHIA; SALATINO, MARIANA; BÉGUELIN, WENDY; CARNEVALE, ROMINA; RIVAS, MARTÍN; CHARREAU, EDUARDO; SCHILLACI, ROXANA; ELIZALDE, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Demostramos previamente que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) es capaz de activar Stat3 en células C4HD progestágeno-dependientes, provenientes de adenocarcinomas mamaros murinos inducidos por MPA. El presente trabajo estudia la capacidad de HRG, ligando de los receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I (RTKs-I), de activar Stat3 en las células C4HD. El tratamiento con HRG de las células C4HD durante 48hs indujo un aumento significativo en la expresión de la proteína Stat3. Además, la estimulación con HRG durante 5 a 10 minutos, produjo la fosforilación de Stat3 en el residuo tirosina 705, la cual fue bloqueada por el antagonista de progestágenos RU486. Esta inducción fue también significativamente inhibida por el bloqueo de la expresión de ErbB-2 usando oligodeoxinucleótidos antisentido a su ARNm y por el pretratamiento con el inhibidor selectivo de Src, PP2. Ensayos de DNA mobility shift mostraron que la HRG fue capaz de inducir la unión de Stat3 a su elemento respondedor en el DNA (Sis inducible element, SIE). Ensayos de transfección con un plásmido conteniendo 4 copias de la secuencia de alta afinidad de Stat3, m67, clonadas río arriba de un gen reportero LUC, demostraron que la HRG fue capaz de aumentar significativamente la actividad luciferasa. Investigamos la relación entre la activación de Stat3 inducida por HRG y la proliferación celular. Para ello, transfectamos células C4HD con una forma dominante negativa de Stat3 (Stat3Y705-F), la cual inhibe la dimerización y la unión al ADN de Stat3 endógena y evaluamos la proliferación por incorporación de timidina tritiada. La expresión de Stat3Y705-F inhibió la proliferación inducida por HRG, en comparación con células transfectadas con un vector vacío. Estos resultados demuestran que i) HRG induce la activación transcripcional de Stat3 y ii) Stat3 participa en el crecimiento inducido por HRG de células de carcinoma mamario murino.

184. (12585) REGULACIÓN DE CICLINA D1 POR PROGESTINA EN CÉLULAS ENDOMETRIALES. VALLEJO, GRISELDA (1); BEATO, MIGUEL (2); SARAGÜETA, PATRICIA (2,3)

(1) Instituto de Biología y Medicina Experimental, Bs As, Argentina (2) Centro de Regulación Genómica, BCN, España (3) Dpto. Qca. Biológica-FCEN UBA

Recientemente hemos demostramos que la progestina R5020 (R5020) a bajas concentraciones (10-11-10-8M) induce la proli-

feración de células estromales de endometrio, mediante la vía de MAPK y PI-3K/Akt. El bloqueo de estas vías de señalización citoplasmática con inhibidores específicos abolió la respuesta celular a la progestina llevada a cabo a través de una interacción del receptor de progesterona con el receptor de estrógenos tipo beta. (Vallejo y col, *Mol Endo* 2005, doi:10.1210). La expresión de Ciclina D1 (CD1) es regulada por progestinas aunque su promotor carece de las secuencias consenso de unión al receptor de progesterona. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación de la expresión de CD1 en respuesta a la activación citoplasmática de MAPK y PI3K/Akt por R5020. La línea celular U118 fue tratada durante diferentes tiempos con 10-8M R5020. Los niveles de mRNA de CD1 se analizaron mediante RT-PCR semicuantitativa. Las curvas de tiempo en respuesta a 10-8M R5020 mostraron que la inducción de CD1 es transiente y máxima a los 45min. La máxima inducción de CD1 se consiguió con 10-10-10-9M de R5020 ($4,9-7 \pm 0,6$ veces mRNA CD1/control). Esta inducción no se vio afectada por el tratamiento con un inhibidor de MAPK y fue bloqueada por el tratamiento con un inhibidor de PI3K (LY294002) ($2,3 \pm 0,1$ veces mRNA CD1/control). Mientras que el tratamiento con los antagonistas del receptor de progesterona (RU486) y del receptor de estrógenos (ICI) produjeron una inhibición total del efecto de R5020 sobre la inducción del transcripto de CD1. Estos resultados muestran: a) que bajas dosis de progestina activan la transcripción de ciclina D1 mediante la vía PI3K, sin la participación de la vía de MAPK, b) que el receptor clásico de progesterona y el receptor de estrógenos participan en esta regulación. Estos resultados sugieren que el aumento en la expresión de CD1 podría estar comprometido en la proliferación celular mediada por la activación de la vía PI3K/Akt inducida por progestinas en el endometrio.

185. (12601) EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNFA) INDUCE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIAS (LIF) EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2. SCHERE LEVY, CAROLINA; BLAUSTEIN, MATÍAS; GATTELLI, ALBANA; PELISCH, FEDERICO; COSO, OMAR; SREBROW, ANABELLA; KORDON, EDITH

IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

En la glándula mamaria del ratón, la expresión del factor inhibidor de leucemia (LIF) se incrementa rápidamente a pocas horas de finalizado el amamantamiento. También hemos reportado que en este tejido el perfil de expresión de TNF α es muy similar al de LIF. Esta última observación nos llevó a investigar y determinar que el primero induce la expresión del segundo en células epiteliales mamarias SCP2. El objetivo del presente trabajo fue investigar los caminos de señalización involucrados en esta inducción. Por Western Blots hallamos que el tratamiento de dichas células con TNF α induce la activación de ERK1/2 a los 5 min. y la de JNK a los 30 min., tiempo al que los niveles de activación de ERK1/2 vuelven a niveles basales. Asimismo, utilizando Luciferasa como reportero hallamos que TNF α induce la activación de NF κ B. Con el objeto de determinar cuáles de estas vías son relevantes en la inducción de la expresión de LIF, células tratadas con TNF α fueron colocadas en presencia de diferentes inhibidores farmacológicos específicos. Los resultados obtenidos por RT-PCR de Tiempo Real indican que el inhibidor farmacológico de la fosforilación de ERK1/2 (PD98059) inhibió la inducción de LIF provocada por el tratamiento con TNF α . Sin embargo, tanto el tratamiento con el inhibidor farmacológico de JNK (SP600125) como el inhibidor de NF κ B (Sulfazalacina) indujeron la sobre-expresión (por encima del tratamiento con TNF α sólo) de LIF. En células tratadas con estos inhibidores, análisis de Western blot demostraron que mientras que PD98059 inhibe la activación de ERK1/2, el tratamiento con SP600125 o con sulfazalacina la sobre-activa. Estos resultados muestran el rol fundamental que juega ERK1/2 en la inducción de la expresión de LIF y sugieren que la activación de JNK y de NF κ B podrían modular negativamente dicha inducción.

186. (12555) CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE BCL-XL POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF) EN CÉLULAS MAMARIAS DE RATÓN (HC11). ROMORINI, LEONARDO (1); COSO, OMAR A. (2); PECCI, ADALI (1,2)

Dto Química Biológica, FCEN-UBA. Dto. de Fisiol. Biol. Molecular y Celular FCEN-UBA, IFIBYNE-CONICET.

La activación de las vías de señalización dependientes de EGF ha sido asociada al control de la proliferación celular y la apoptosis. La línea celular HC11 derivada de epitelio mamario de ratón es un modelo muy utilizado en el estudio in vitro de la proliferación y diferenciación de células mamarias. EGF revierte la apoptosis de células HC11 confluentes y aumenta la expresión de Bcl-2 (proteína con función antiapoptótica). El gen bcl-X (de la familia de bcl-2) codifica para varias isoformas con funciones opuestas, i.e: Bcl-XL (antiapoptótica) y Bcl-XC (proapoptótica). El perfil de expresión de esas isoformas varía en las diferentes etapas de desarrollo del epitelio mamario. Estudiamos la regulación de la expresión de Bcl-X por EGF y los mecanismos de señalización involucrados. Se midieron los niveles de la proteína Bcl-XL por Western Blot en células HC11 confluentes luego de un tratamiento de 8 hs con EGF (100 ng/ml), observándose un aumento de 1,9 veces con respecto al control, que fue inhibido por los inhibidores para MEK/ERK1/2 (PD) o JNK (SP), sugiriendo que ambas enzimas estarían involucradas en el control de la expresión de Bcl-XL. Luego se analizaron los niveles de los ARNm de Bcl-X mediante RT y Real Time PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de las dos isoformas: bcl-XL y bcl-XC. Se calcularon los cambios en la relación bcl-XL/bcl-XC para cada tratamiento. Los resultados mostraron que EGF aumenta la relación bcl-XL/bcl-XC (23,1 veces vs. control) lo que indica una condición antiapoptótica. El inhibidor SP bloquea totalmente ese efecto, mientras que PD lo hace sólo en forma parcial, sugiriendo un mayor compromiso de JNK en la mediación de la respuesta a EGF. En conclusión: EGF aumenta la expresión de la proteína Bcl-XL y la relación bcl-XL/bcl-XC de los ARNm en células HC11 confluentes estando las proteínas ERK y JNK involucradas en ese proceso.

CARDIOVASCULAR A

187. (12132) EL TRATAMIENTO PROLONGADO CON PIOGLITAZONA MODIFICA LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA LIBERACIÓN DE PROSTANOIDES EN LA RATA CON SOBRECARGA DIETARIA DE FRUCTOSA. PUYÓ, ANA MARÍA; DONOSO, ADRIANA; MAYER, MARCOS; GIORGI, SALVADOR; PEREDO, HORACIO

Cátedra de Anatomía Humana Macro y Microscópica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Cátedra de Farmacotecnia I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET.

La administración de fructosa (F) provoca en la rata un cuadro similar al síndrome metabólico humano, con aumento de la presión arterial (PA), resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia. Las tiazolidindionas como la pioglitazona (Pio, donada por el laboratorio Phoenix), agonistas de los receptores PPAR gamma, son utilizados en la diabetes tipo 2 para disminuir la resistencia a la insulina y mejorar el perfil lipídico. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de Pio sobre PA, parámetros metabólicos y producción vascular de prostanoideos (PR) en ratas control y tratadas con F. Se estudiaron 4 grupos de ratas Sprague-Dawley macho (200 g): Control (C, n=4), F (n=4; 10 % P/V en el agua), P (n=7; 10 mg/kg/día de Pio en el agua) y F-P (n=8; ambos tratamientos) durante 9 semanas. En F los triglicéridos (TG) plasmáticos (g/l) se incrementaron (F: 2.4 ± 0.3 vs C: 1.2 ± 0.2 , $p < 0.01$), mientras que Pio disminuyó TG (P: 0.5 ± 0.1 vs. C, $p < 0.01$; F-P: 1.1 ± 0.1 vs. F, $p < 0.001$). F aumentó la PA (mmHg; F: 128 ± 6 vs. 109 ± 4 , $p < 0.03$), dicho aumento no se observó en F-P. Los PR liberados por la aorta (A) y el lecho mesentérico (LM) se midieron por HPLC. Se

detectaron prostaglandinas (PG) F2 alfa y E2, así como PG 6-ceto F1 alfa y tromboxano (TX) B2, metabolitos estables de prostaciclina (PGI2) y TXA2. En A, F disminuyó PGI2 (ng/mg tejido; 68 ± 13 vs. C: 160 ± 18 , $p < 0.05$). Por su parte, Pio redujo TX (P: 49 ± 11 vs. C: 87 ± 9 , $p < 0.05$; y F-P: 43 ± 9 vs. F: 93 ± 14 , $p < 0.01$). En LM, F disminuyó PGI2 (F: 62 ± 12 vs. C: 101 ± 9 , $p < 0.05$) y PGE2 (F: 29 ± 5 vs. C: 99 ± 10 , $p < 0.005$). P redujo TX (P: 34 ± 4 vs. C: 52 ± 7 , $p < 0.05$; y F-P: 32 ± 3 vs. F: 60 ± 11 , $p < 0.01$), y normalizó PGI2 ($p < 0.05$ vs F) pero no PGE2. Pio disminuyó TG en C y F; anuló el incremento en PA provocado por F; disminuyó la liberación del TX y restableció la liberación de PGI2. El tratamiento con Pio tiene consecuencias positivas para el estado hemodinámico y metabólico de los animales con síndrome metabólico experimental.

188. (12156) IMPACTO VASCULAR DE LOS FITOESTROGENOS. RAUSCHEMBERGER, M.BELÉN (1,2); POLINI, NÉLIDA (1); BENOZZI, SILVIA (1); CUTINI, PABLO (1); SELLÉS, JUANA (1); MASSHEIMER, VIRGINIA (1,2)

1 Cátedra de Análisis Clínicos II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur.
2 CONICET

El mantenimiento del balance de síntesis de vasodilatadores (NO y PGI[2]) y vasoconstrictores (tromboxano, endotelina) y la inhibición de la adhesión/agregación plaquetaria sobre la pared vascular, contribuyen al mantenimiento de la integridad fisiológica del lecho vascular. Se postula que los fitoestrógenos (FE), podrían ser útiles para prevenir desórdenes cardiovasculares. Investigamos si el tratamiento directo del tejido vascular con el FE genisteína (Gen) afecta la producción de vasodilatadores y al proceso de agregación plaquetaria (AP). Se utilizaron anillos de aorta aislados de ratas hembras, tratados "in vitro" (1 – 30 min) con Gen ($10 \mu\text{M}$ – 10nM). Utilizando (3)H-arginina y (3)H-araquidonato como precursores, demostramos que la Gen estimula la síntesis de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI[2]) (65; 35% sobre el control respectivamente), e inhibe la producción de tromboxano (Tx) (43% debajo del control). Teniendo en cuenta que la Gen es un inhibidor de la actividad tirosina quinasa, y la asociación TK/MAPK, utilizando el ensayo de fosforilación proteica, observamos una inhibición de la actividad MAPK luego de 1 min tratamiento con Gen (763 ± 68 vs 603 ± 48 cpm/mg prot/min, Gen vs control). La activación del sistema PLC/PKC también forma parte del mecanismo de acción del FE. Gen 30 y $10 \mu\text{M}$ incrementó significativamente la síntesis de diacilglicerol (152% y 75% sobre el control, $p < 0.01$). La Gen inhibió la AP de un plasma rico en plaquetas incubado con los anillos de aorta y el FE. La antiagregación disminuye en presencia de inhibidores específicos de las enzimas óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa (L-NMMA e indometacina). Los resultados muestran una acción directa del FE sobre el tejido vascular estimulando la síntesis de NO y PGI[2], y consecuentemente inhibiendo la agregación plaquetaria.

189. (12161) ESTUDIO DE LA FRECUENCIA ALELICA DE APOLOPROTEINA E (APOE) Y LÍPIDOS SÉRICOS EN UNA POBLACIÓN INFANTIL. D'ARRIGO, MABEL; LIOI, SUSANA; ENSINCK, ALJANDRA; PITUELLI, NORMA; CORBERA, MIRTA; TURCO, MIRYAN; BELOSCAR, JUAN; ROSILLO, IRENE

Area Química Analítica. Depto de Bioquímica Clínica. Fac. de Ciencias Bioq. y Farm. U.N.R.

La apo E es una proteína polimórfica, las variantes más comunes son apo E2, apo E3 y apo E4 codificadas por los alelos e2, e3 y e4. La literatura enfatiza la asociación de e2 y e4 sobre los niveles lipídicos y el impacto de estos alelos en las enfermedades cardiovasculares (ECV). Dada la vulnerabilidad de la población infantil que pone restricciones a la realización de estudios, se refuerza la necesidad de plantear intervenciones preventivas que limiten la instalación de procesos patológicos a edad temprana.

En este trabajo nos propusimos determinar la frecuencia alélica (FA) de apoE y su asociación con niveles de lípidos séricos en una población infantil y compararla con la población de referencia internacional. Para estimar la FA en la población estudiada, se trabajó con una muestra de 56 niños de ambos sexos (6 a 14 años). El tamaño muestral fue calculado estadísticamente para lograr una estimación representativa de la población total, con una confianza del 95%. Se determinó la genotipificación por ASA – PCR y los lípidos séricos por método enzimático. De los resultados obtenidos las FA fueron: e3 0.786 (IC del 95%; 0.679-0.893); e4 0.178 (IC del 95%; 0.078-0.278) y e2 0.036 (IC del 95%; 0.000-0.084). Para comparar la FA de nuestra población con la de referencia bibliográfica internacional se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal. En nuestra población la FA de e3 es significativamente mayor a la observada para e2 y e4, datos que coinciden con la bibliografía internacional. Aplicando el test exacto de Fisher se encontró asociación significativa ($p=0.05$) entre presencia de e4 y aumento de Colesterol total y Colesterol no HDL. La identificación factores de riesgo y la carga genética desde edades tempranas permitiría adoptar cambios conductuales (hábitos alimentarios, práctica de ejercicio, etc.) que contribuirían a prevenir y controlar el impacto de éste y otros factores de riesgo asociados a ECV.

190. (12183) RESPUESTA MECANICA AUMENTADA EN LA AORTA DE RATONES CON ENFERMEDAD DE FABRY. FRITZ, MARIANA (1); ROZENFELD, PAULA (1); BRADY, ROSCOE (2); FOSSATI, ALBERTO (1); RINALDI, GUSTAVO (1)

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. (2) National Institutes of Health, USA

Antecedentes: La Enfermedad de Fabry es un error innato del metabolismo de los glicoesfingolípidos, causado por la deficiencia de la actividad de la enzima alfa-galactosidasa A que conduce a la acumulación de globotriaosilceramida (Gb3) en diversos tipos celulares, siendo uno de los más afectados el endotelio vascular. Objetivo: El objetivo del presente trabajo fue analizar la reactividad aórtica en ratones con enfermedad de Fabry (RF), en comparación con sus controles normales (RC). Métodos: Anillos de 3-4 mm de longitud de la aorta de RF y RC fueron suspendidos de un transductor de fuerza, dentro de un baño de solución de Ringer termostatazido a 37°C. Luego de una hora de estabilización (tensión de reposo = 2 g) se provocó contracción en solución de $[K^+] = 80 \text{ mM}$ y por noradrenalina $1 \mu\text{M}$ (NA), y la relajación de esta última por acetilcolina $1 \mu\text{M}$ (Ach). Las contracciones se calcularon en mg de fuerza por mg de peso del anillo (mgF/mgP) y las relajaciones como porcentaje de la contracción previa y en tiempo hasta la mitad de la relajación (T-50). Resultados: Las aortas de RF desarrollaron mayor contracción que las de RC en $[K^+] = 80 \text{ mM}$ (1526 ± 169 vs. 1083 ± 117 mgF/mgP, $P < 0.05$) y con NA (1412 ± 119 vs. 1174 ± 141 mgF/mgP, NS). La relajación inmediata de la contracción de NA por el agregado de Ach no difirió significativamente en RF y RC tanto en magnitud ($37 \pm 7\%$ y $22 \pm 5\%$) como en T-50 ($21 \pm 2\%$ y $21 \pm 4\%$). A más largo plazo (15 min o más) la relajación fue persistente en RF ($37 \pm 11\%$) pero no en RC ($11 \pm 9\%$, $P < 0.05$). Conclusiones: 1) el músculo liso aórtico de los RF presentó contracción aumentada por activación de los canales voltaje-operados pero no de los operados por NA, 2) la función endotelial evaluada mediante la relajación dependiente de NO se mostró preservada en RF; pero la mayor persistencia del efecto relajante podría reflejar que esta enfermedad disminuye la metabolización del NO y/o afecta la cadena de eventos intracelulares que producen relajación del músculo liso vascular.

191. (12186) PARTICIPACIÓN DE LA ANGIOTENSINA II Y DEL FACTOR NF-KB EN LA INFLAMACIÓN TUBULOINTERSTICIAL RENAL PRODUCIDA POR SOBRECARGA AGUDA DE SODIO EN RATAS NORMALES. ROSÓN,

MARÍA INÉS (1); DELLA PENNA, SILVANA (1); TOBLLI, JORGE E (2); FERNÁNDEZ, BE (1)

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (1). Hospital Alemán (2)

En un trabajo anterior hemos observado que una sobrecarga aguda de sodio hipertónica es capaz de generar en el riñón una mayor reabsorción tubular de sodio y una reacción inflamatoria tubulointersticial precoz. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación de la Angiotensina II (ANG II) renal y del factor nuclear de transcripción NF-κB en dicho proceso inflamatorio. Se infundieron ratas macho SD (270-350 g) por vía endovenosa durante 2 hs con concentraciones crecientes de NaCl. Se estudiaron 4 grupos: C: 0.15 M, G1: 0.5 M, G2: 1M y G3: 1.5M NaCl (n= 4-7). Se determinó el flujo plasmático renal a través del clearance de p-aminohipurato (Cl PAH). Al finalizar la infusión, se obtuvo sangre para calcular osmolalidad plasmática (Osm) y grado de deshidratación. Se extrajo el riñón izquierdo para evaluar ANG II y NF-κB por inmunohistoquímica. Los resultados expresados como $X \pm \text{ESM}$ no mostraron modificaciones en el Cl PAH. La Osm plasmática (mOsm/Kg) aumentó en el G3: 326 ± 3 vs C: 303 ± 2 , $p < 0.001$. El grado de deshidratación de acuerdo con la literatura, fue leve en los grupos G1: 2.0% y G2: 4.1%, y moderado en el G3: 6.6% ($p < 0.001$). La inmunomarcación positiva (%) para ANG II tubular aumentó en los grupos G2: 8.2 ± 0.5 ($p < 0.01$) y G3: 18.0 ± 1.1 ($p < 0.001$) vs C: 2.8 ± 0.6 ; mientras que la activación del factor NF-κB se incrementó significativamente en el G3 (C: 1.75 ± 0.45 , G1: 1.87 ± 0.51 , G2: 3.12 ± 0.35 y G3: 8.37 ± 0.62 , $p < 0.01$). Basados en las acciones proinflamatorias descriptas para la ANG II y el factor NF-κB, se concluye que el incremento renal local de ambos factores en este modelo de sobrecarga aguda de sodio hipertónico estarían relacionados con el desarrollo del proceso inflamatorio tubulointersticial detectado en forma precoz.

192. (12197) ASOCIACIÓN ENTRE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DE MONOCITOS Y POLIMORFONUCLEARES. BRITES, F; FORNARI, MC; BENÍTEZ, B; BERARDI, V; GÓMEZ ROSSO, L; LYNCH, S; YANNARELLI, G; CUNIBERTI, L; WIKINSKI, R

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Universidad Favaloro Laboratorio Bioalpha S.A

La participación de los leucocitos activados es crucial en el desarrollo de los procesos inflamatorios durante la aterogénesis. Los monocitos y polimorfonucleares interactúan tanto entre sí como con células endoteliales activadas. Estas interacciones están mediadas por las denominadas moléculas de adhesión celular (MAC). En leucocitos, se encuentran las integrinas CD54 (ICAM-1) y CD18 que constituyen un par ligando-receptor, y el CD49 que es el receptor del CD106 (VCAM-1), localizado en la superficie de células endoteliales junto con el CD54. Se ha reportado que la expresión de las MAC es modulada por citoquinas, glucosa, triglicéridos y lipoproteínas de alta densidad, existiendo diferencias para cada una de ellas. No obstante, aún no se sabe si las distintas clases de leucocitos responden a los mismos mecanismos regulatorios. Nuestro objetivo fue comparar el contenido de MAC de monocitos y polimorfonucleares de sangre periférica. Se obtuvieron muestras de sangre de 70 hombres adultos y se midieron CD54, CD18 y CD49 en monocitos (CD14+) y polimorfonucleares por citometría de flujo (Media aritmética \pm EE; unidades arbitrarias). Se analizó la distribución de los valores obtenidos y se correlacionaron los datos de monocitos y polimorfonucleares por test de Pearson o de Spearman según correspondiera. Los resultados obtenidos en monocitos fueron: CD54 = 46 ± 2 ; CD18 = 383 ± 25 ; CD49 = 367 ± 15 ; y en polimorfonucleares: CD54 = 16 ± 2 ; CD18 = 177 ± 12 ; CD49 = 17 ± 3 . El contenido de las tres MAC evaluadas, CD54, CD18 y CD49, correlacionó positivamente entre monocitos y polimorfonucleares ($r = 0,67$; $p < 0,0001$; $r = 0,89$; $p < 0,0001$; $r = 0,69$; $p < 0,0001$; respectivamente). La expresión de CD54, de su receptor CD18, y de CD49 estaba estrechamente relacionada en monocitos y polimorfonucleares. Este hallazgo sugeriría la presencia de me-

canismos moduladores comunes para estos tipos celulares de activa participación en la génesis de los fenómenos inflamatorios y aterogénicos.

193. (12232) MEMORIA DEL EFECTO CARDIOPROTECTOR CONFERIDO POR LA HIPOXIA HIPOBÁRICA CRÓNICA Y PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA AL CALCIO. LA PADULA, PABLO; COSTA, LIDIA E.

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA

En ratas aclimatizadas a hipoxia hipobárica la capacidad funcional del miocardio y su recuperación luego de un episodio de hipoxia aguda fue mayor que en sus controles normóxicas (J App Physiol 98:2363-2369, 2005). En el presente estudio se analizaron la participación de la respuesta de los miofilamentos al calcio y la duración de los efectos observados durante la desaclimatización, utilizando 15 ratas sometidas a 53.8 kPa en una cámara de hipopresión durante 5 meses e igual número de controles (C) a 101.3 kPa. A los 0.4, 2 y 5 meses de interrumpida la hipopresión se aislaron ambos músculos papilares del ventrículo izquierdo de 5 ratas de cada grupo y se determinaron los parámetros de actividad mecánica en condiciones isométricas a 0.6, 0.8, 1.3, 1.8, 2.3, y 2.8 mM Ca(2+), y a esta última concentración, durante un período de 60 min de hipoxia y 30 min de reoxigenación (H/R). Resultados: El hematocrito (aumentado 23%) y el peso corporal (disminuido 10%) se encontraron normalizados a los 2 meses, mientras que el peso del ventrículo derecho (aumentado 100%) fue mayor que en los controles aún a los 5 meses (30%). La tensión desarrollada (TD) fue significativamente mayor en todos los grupos desaclimatizados que en C a partir de 0.8 mM Ca(2+), tendiendo a disminuir con el tiempo. La TD máxima (g/mm²) a 0.4, 2 y 5 meses fue: 2.4 ± 0.2 , 2.2 ± 0.2 y 1.9 ± 0.2 , respectivamente; C: 1.2 ± 0.1 . La concentración de Ca(2+) (mM) requerida para el 50% de activación máxima fue menor a los 0.4 meses (0.75 ± 0.07) que en C (1.06 ± 0.04). La TD post H/R declinó con el tiempo (1.7 ± 0.2 , 1.5 ± 0.2 , 1.2 ± 0.2), pero fue en todos los grupos mayor que en C (0.6 ± 0.1). Las velocidades máximas de contracción y de relajación se comportaron de manera similar a TD. Se concluye que el efecto cardioprotector conferido por la hipoxia hipobárica crónica persiste durante más de 5 meses de suprimido el estímulo e involucra un aumento en la respuesta de los miofilamentos al calcio.

194. (12256) ACTIVIDAD AUMENTADA DE METALOPROTEASAS CIRCULANTES EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLEMICOS. BERG, GABRIELA; SCHREIER, L; MIKSZTOWICZ, V; MUZZIO, ML; D'ANNUNZIO (1), V; DONATO (1), M; MORALES (1), C; GELPI (1), R; WIKINSKI, R

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Fac. Farmacia y Bioquímica-UBA. LabLípidos-Lipoprot, FacFarm-Bioq, (1) Inst Fisiopat Cardiovasc, Dpto Patología, Fac Medicina. UBA

El modelo de conejos bajo dieta rica en colesterol es muy utilizado para el estudio de procesos aterogénicos, principalmente en pared arterial. La formación acelerada de la placa ateromatosa luego de 1-2 meses de dieta hipercolesterolémica, aumenta la actividad de metaloproteasas (MMP) 2 y 9 in situ, sin embargo escasos estudios evalúan las MMPs circulantes. El objetivo de este trabajo fue medir la actividad de MMP-2 y MMP-9 y el perfil lipídico-lipoproteico en 6 conejos alimentados con dieta enriquecida en colesterol 1%, pre (preD) y post dieta (PD). Se emplearon conejos neocelandeses de 1.8-2 Kg Se obtuvieron muestras basales y después de 8 semanas de dieta. En suero se midió Colesterol (col), triglicéridos (TG), col-HDL y col-no HDL. En plasma se midió actividad de MMP-9 y MMP-2 por zimografía cuantitativa en geles con gelatina y se cuantificaron las áreas gelatinolíticas. Se realizó un examen histopatológico de las aortas y de vasos intramiocárdicos y coronarias, en cortes por congelación utilizando al técnica de Rojo "O". El perfil lipídico-lipoproteico mostró un incremento acorde con el modelo utilizado (preD vs PD, media \pm DS, mg/dl): colesterol (116 ± 38 vs 280 ± 114 , $p < 0.05$), TG

(271±111 vs 173±71, $p<0.01$), col-HDL (23±8 vs 23±10, ns) y col-no HDL (92±35 vs 223±133, $p<0.05$). Luego de 8 semanas de dieta se observó un incremento significativo de proMMP-2 en circulación (Unidades densitométricas: 47.6±65 vs 217±105, $p<0.01$), sin presencia de MMP-9. Los conejos respondieron a la dieta con incremento significativo de colesterol aterogénico, reflejado en el col-no HDL. El análisis histológico reveló la aparición de depósitos lipídicos intimaes en arteria aorta luego de 8 semanas de dieta. Los depósitos lipídicos en aorta y el aumento en la forma latente de MMP-2 en plasma indicaría la aceleración del proceso aterogénico inducido por la dieta.

195. (12283) EL L-NAME (LN) REVIERTE PARCIALMENTE LA PROTECCIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) EN EL CORAZÓN DE RATA SOMETIDO A ISQUEMIA GLOBAL (I)-REPERFUSIÓN (RP). MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA (1); FERNÁNDEZ, ALEJANDRA (2); PERAZZO, JUAN (2); INFANTE, NORMA (1); SAVINO, ENRIQUE (1); VARELA, ALICIA (1)

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET. Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Se investigó si la protección ejercida por el PC es afectada por LN. Se trabajó con corazón perfundido Langendorff sometido a 25 min I-30 min RP, de ratas alimentadas (AL) o ayunadas (AY) 24 hs. El PC consistió en 3 min I-5 min RP previos a la I sostenida. LN 50µM fue agregado al medio 5 min antes del PC hasta el final de la I. La contractilidad se evaluó con el producto presión sistólica por frecuencia (PxF) y la contractura con la presión diastólica final (PDF). La VC se midió con el para-feniltetrazolio. Los corazones AY se recuperaron mejor que los AL. El PC mejoró la recuperación en ambos grupos, efecto revertido por LN (PxP, RP30 min, AL: Control (C): 59.28±9.16, PC: 82.86±8.07 $p<0.05$ vs C, PC-LN: 51.8±13.6 %, AY: C: 80.83±6.47, PC: 108.71±9.46 $p<0.05$ vs C, PC-LN: 56.00±6.04 %, PDF, RP min: AL: C: 34.86±10.54, PC: 1.14±0.86 $p<0.05$ vs C, PC-LN: 17.00±5.54 %), preservó el glucógeno isquémico (µg/100mg al final de I: AL: 184.48±31.26 vs 64.85±18.55, $p<0.05$, AY: 173.39±37.69 vs 69.22±16.61, $p<0.05$) efecto no modificado por LN (AL: 128.22±16.13, AY: 162.94±18.50). La inhibición de la acumulación de lactato por el PC (µmol/g seco: AL: 95.29±10.51 vs 153.71±14.22, $p<0.05$, AY: 66.37±22.08 vs 112.53±15.17, $p<0.05$), no se afectó por LN (AL: 64.64±6.19, AY 60.99±5.85). El %VC fue similar en AL y AY, aumentó con el PC, y no fue modificado por LN (AL: C 21±6, PC 60±8 $p<0.05$ vs C, PC-LN: 55±6, AY: C: 18±7, PC: 48±8 $p<0.05$ vs C, PC-LN: 51±3 %). LN en ausencia de PC no modificó los parámetros metabólicos ni el %VC, pero disminuyó la recuperación de la contractilidad en AY (PxP, RP-30 min: 67.00±4.74, $p<0.05$). Estos resultados sugieren que el óxido nítrico no participaría en los mecanismos responsables de la preservación de la VC y del desvío metabólico hacia un fenotipo favorable para el corazón sometido a isquemia global, pero podría participar en aquellos responsables de la protección funcional.

196. (12289) EL L-NAME (LN) REVIERTE PARCIALMENTE LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL DIAZÓXIDO (DZ) Y DEL AYUNO EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA GLOBAL (I) – REPERFUSIÓN (RP). MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA (1); GONZÁLEZ, MARCELA (1); PÉREZ, JULIA (2); FERNÁNDEZ, ALEJANDRA (2); SAVINO, ENRIQUE (1); VARELA, ALICIA (1)

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET. Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

El objetivo fue explorar si el óxido nítrico está implicado en los efectos beneficiosos del DZ sobre el corazón sometido a I (25 min)-RP (30 min). Se trabajó con corazones perfundidos Langendorff provenientes de ratas alimentadas (AI) o ayunadas 24 hs (Ay). El DZ 30 µM fue agregado 10 min antes de la I y el LN 50 µM 5 min antes del DZ hasta el final de la I. La contractili-

dad se evaluó con el producto presión sistólica por frecuencia (PxP) y la contractura con la presión diastólica final (PDF). La VC se midió con el método de para-feniltetrazolio. Los corazones AY se recuperaron mejor que los AL. El DZ mejoró la recuperación en ambos grupos, efecto revertido por el LN (PxP, RP 15 min, AL: Control (C): 47.25 ± 8.62, DZ: 71.13 ± 8.65 $p<0.05$ vs C, DZ-LN: 31.33 ± 7.72 %, AY: C: 69.00 ± 11.54, DZ: 83.25 ± 9.06 $p<0.05$ vs C, DZ-LN: 63.75 ± 9.53 %, PDF, RP 5min: AL: C: 49.13 ± 11.45, DZ: 13.63 ± 5.06 $p<0.05$ vs C, DZ-LN: 31.5 ± 8.06 %). El efecto beneficioso del DZ no se acompañó de preservación del glucógeno tisular durante la isquemia. En cambio, disminuyó la producción isquémica de lactato en AL (104.76 ± 12.45 vs 153.71 ± 14.22 µmol/g seco, $p<0.05$), efecto que no fue revertido por el LN (71.93 ± 7.98). El %VC fue similar en AL y AY, aumentó con el DZ, y no fue modificado por el LN (AL: C 21 ± 6, DZ 56.33 ± 6.9 $p<0.05$ vs C, DZ-LN: 61.39 ± 7.21 AY: C: 18 ± 7, DZ: 57.97 ± 4.20 $p<0.05$ vs C, DZ-LN: 62.39 ± 7.18 %). El LN en ausencia de DZ no modificó los parámetros metabólicos ni el %VC, pero disminuyó la recuperación de la contractilidad en AY (PxP, RP-30 min: 67.00 ± 4.74 vs 83.88 ± 7.48, $p<0.05$). Estos resultados sugieren que el óxido nítrico no participaría en los mecanismos responsables de la preservación de la VC y de la disminución de la producción isquémica de lactato ejercida por el DZ, pero podría participar en aquellos responsables de la protección funcional.

197. (12476) METALOPROTEASA 9 Y 2 CIRCULANTES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CORONARIA. MUZZIO, LUZ; BERG, G; MIKSZTOWICZ, V; REPETTO, M; PETERSON, G (1); AGUILAR, D (1); WIKINSKI, R; SCHREIER, L

LabLípidos-Lipoproteínas-FacFarmacia y Bioquímica-Universidad de Buenos Aires. PROPIA- UNLP

Las metaloproteasas (MMP) son enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular. En los últimos años se estudia el papel de MMPs en el engrosamiento de la íntima y en la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica. Su medida en plasma podría aportar un valor pronóstico en el desarrollo y severidad de la lesión aterosclerótica. Objetivos: Evaluar la presencia de MMP-9 y MMP-2 en plasma de pacientes con y sin enfermedad coronaria (EC) y su correlación con parámetros lipídico-lipoproteicos. Métodos: Se estudiaron 50 pacientes, ambos sexos, de 43 a 80 años, sometidos a angiografía coronaria como estándar de referencia, realizada por único observador, para diagnóstico de EC o evaluación prequirúrgica valvular, conformándose 2 subgrupos: con presencia $n=28$ y ausencia de lesiones ateroscleróticas $n=22$ (edad, media±DS: 67.3±9.7 y 67.5±6.9 respectivamente, sin diferencias significativas. En plasma obtenido luego de 12 horas de ayuno se midió actividad de MMP-9 y MMP-2 por zimografía cuantitativa en geles con gelatina y se cuantificaron las áreas gelatinolíticas como áreas relativas (AR). Paralelamente en suero se midió col-total, triglicéridos, apoB, col-HDL y LDL. Los pacientes con EC presentaron mayores niveles plasmáticos de MMP-9 que los controles (AR: 0.80±0.59 vs 0.01±0.01, $p<0.001$), así como de proMMP-2 (AR: 0.70±0.44 vs 0.37±0.29, $p<0.03$). MMP-9 y proMMP-2 correlacionaron negativamente con Col-HDL: $r=-0.57$, $p<0.006$ y $r=-0.34$, $p<0.03$, respectivamente, y con apoB: MMP-9 $r=0.41$, $p<0.05$ y proMMP-2 $r=0.35$, $p<0.02$. La zimografía cuantitativa reveló aumento en los niveles circulatorios de MMP-9 y de la forma latente de MMP-2 en pacientes con EC confirmada por método estándar. La medida de MMPs constituiría un biomarcador de alto riesgo cardiovascular. La correlación con parámetros lipoproteicos es novedosa y mostraría una asociación entre factores de riesgo y vulnerabilidad de placa aterosclerótica.

CARDIOVASCULAR B

198. (12316) LA INHIBICIÓN DE LA FOSFODIESTERASA-5A CON SILDENAFIL ATENÚA LA DISFUNCIÓN MIOCÁRDICA POST INFARTO. ALVAREZ, MC; PÉREZ,

NG; ENNIS, I; GARCIARENA, CD; PINILLA, A; ESCUDERO, EM; CINGOLANI, HE

Centro de Investigaciones Cardiovasculares U.N.L.P.

Recientemente se ha descripto que la inhibición de la fosfodiesterasa-5A (PDE5A) con sildenafil (S) mejora el remodelamiento del ventrículo izquierdo en corazones sometidos a sobrecarga de presión (Takimoto et al, Nat Med. 2005;11:214). El objetivo de este trabajo fue estudiar si el S puede mejorar el remodelamiento ventricular post infarto de miocardio (IM). El IM fue provocado ligando la arteria coronaria descendente anterior izquierda en ratas Wistar de 3-4 meses de edad. Luego de generado el IM las ratas fueron asignadas al azar a placebo o S (100 mg/Kg/día), administrados a través del agua de bebida durante 6 semanas. Luego del tratamiento, se realizaron estudios ecocardiográficos y se determinó la presión ventricular izquierda y su primera derivada en cada animal. Luego del sacrificio se determinó la superficie de sección (SS) de los miocitos y el contenido de péptido natriurético cerebral (BNP) del ventrículo izquierdo. La efectividad de la inhibición de la PDE5A se confirmó mediante la determinación de la actividad de la proteína quinasa G (PKG) (en fmoles de PO[4]/min/µg de proteína: sham 5.64±0.23 n=4, IM 4.85±0.95 n=5, IM+S 6.74±0.42† n=5, †P<0.05 vs sham e IM). El tratamiento con S aumentó significativamente el acortamiento fraccional (FA) miocárdico y el cociente +dP/dt/PI (donde PI es la presión intraventricular a la cual ocurre el +dP/dt) y disminuyó el contenido de BNP, sin alterar la masa ventricular izquierda o la SS de los miocitos (Tabla).

	MVI (mg)	SS (µm ²)	FA (%)	+dP/dt (mmHg/s)	+dP/dt/PI (s ⁻¹)	DDVI (mm)	DSVI (mm)	BNP (% del sham)
IM	655±25 n=5	18.1±0.8 n=4	45±2 n=5	4575±987 n=7	89±6 n=7	6.2±0.3 n=5	3.4±0.2 n=5	166±22 n=4
IM+S	618±20 n=4	16.2±0.3 n=4	64±4* n=4	5501±600 n=5	112±2* n=5	6.2±0.2 n=4	2.2±0.2* n=4	75±14* n=4

Los resultados sugieren que la inhibición crónica de la PDE5A luego del IM aumenta la actividad de PKG y atenúa la disfunción provocada por el IM sin alterar el remodelamiento ventricular.

199. (12328) DESARROLLO DE ELISA COMPETITIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD OXIDADAS EN PLASMA. PELUSA, FABIÁN; VALDÉS, MARÍA (1); SALAS, BETINA (1); DANIELE, STELLA (1); ARRIAGA, SANDRA (1); ALAMARÁ, ADRIANA (1,2); CAILLE, ADRIANA (1); GHERSEVICH, SERGIO (1)

Área Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (1) Área Bioquímica Clínica (2) CIUNR

El aumento de los niveles de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) constituye un importante indicador de aterogenicidad. El objetivo del trabajo fue el desarrollo de un ELISA competitivo para determinar los niveles plasmáticos de LDLox y la obtención de un intervalo de valores de referencia para dicho parámetro. Las LDL se purificaron a partir de plasma humano mediante ultracentrifugación secuencial en un intervalo de densidades 1,019-1,063 y se oxidaron en presencia de Cu⁺⁺. Por inoculación de conejos con LDLox se obtuvo un anticuerpo policlonal (Ac a-LDLox), cuya especificidad fue confirmada por Western Blot utilizando LDL nativa y oxidada. Se trabajó con 31 plasmas provenientes de dadores de sangre del Servicio de Hemoterapia del Hospital Provincial del Centenario, relación femenino/masculino: 11/20, edad promedio: 35 años; rango: 20-58. Se determinaron los niveles de colesterol (C) total, C-HDL y triglicéridos por métodos enzimáticos. El C-LDL se calculó por la fórmula de Friedewald. Sólo se incluyeron los individuos normolipémicos según el Adult Treatment Panel III. Para el ELISA se sensibilizaron placas de poliestireno con LDLox la cual compitió con la LDLox de la muestra por una cantidad constante de Ac a-LDLox. Los Ac fijados a la placa se revelaron con Ac a-IgG de conejo-peroxidasa y tetrametilbenzidina-H₂O₂. Las densidades ópticas (DO) se leyeron a 450 nm y se compararon con la de un control obtenido con

el Ac a-LDLox en el cual se omitió el agregado de la muestra (100 % de unión). Los resultados se expresaron como unidades ULDLox definidas como el cociente DO control/DO muestra. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron respectivamente 4,8 % y 5,0%. Se obtuvo un rango de referencia de 1,2 a 2,4 ULDLox. La técnica desarrollada permite contar con una metodología específica y sensible para la detección de riesgo aterogénico.

200. (12347) VALORACIÓN DE LA MASA VENTRICULAR IZQUIERDA EN LA HIPERTENSIÓN NOCTURNA. PEREZ LLORET, SANTIAGO (1); TOBLLI, JORGE E. (2); CARDINALI, DANIEL P. (1); MILEI, JOSÉ A. (2)

(1) Dto. de Fisiología, F. Medicina, UBA. (2) Instituto de Inv. Cardiológicas Prof. Dr. A. C. Taquini. F. Medicina, UBA

Antecedentes: La presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD) muestra ritmos diarios con un valle durante el periodo nocturno. La falta de caída nocturna de PA es un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular. Objetivo: evaluar la hipertrofia ventricular izquierda en sujetos con hipertensión diurna y nocturna. Métodos: Se realizó ecocardiografía bidimensional y monitoreo ambulatorio de la PA de 24 hs (Oxford) en 291 sujetos. Se calculó el índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) mediante la fórmula de Devereux. Los sujetos con PAS/PAD diurna > 135/85 mmHg fueron clasificados como hipertensos diurnos (HTA-D) y si PAS/PAD nocturna >125/75 como hipertensos nocturnos (HTA-N). Si la caída nocturna de PAS fue < 10% se consideraron como "non-dippers". Los resultados se analizaron mediante ANOVA y regresión lineal ajustada para género, edad, BMI y tratamiento. Resultados: Se identificaron 112 HTA-D, de los cuales el 31% eran también HTA-N. De los normotensos (179) el 5% mostró HTA-N. El 38% de los sujetos (110) recibía tratamiento antihipertensivo, siendo un 43% HTA-D y un 17% HTA-N. Se comparó el IMVI de acuerdo a la HTA-D y la caída nocturna de PAS. Los HTA-D "non-dipper" tuvieron un IMVI significativamente más elevado (135±5 vs 117±4 -dippers-, p=0.04) hecho que no se vio en los normotensos "non dipper". En cambio, cuando se analizó el IMVI en función de la HTA-D y HTA-N, se observó que tanto en los normotensos como los hipertensos, los HTA-N mostraban mayor IMVI que los normotensos nocturnos (131±3 vs 115±8, p=0.04). Luego de la introducción de todas las variables analizadas en un modelo de regresión lineal sólo la PAS nocturna, el género y la edad resultaron predictores significativos del IMVI. La utilización de un límite de normalidad para la PA nocturna (<125/75 mmHg) muestra mayor utilidad que la magnitud de la caída nocturna de PA para la evaluación de la hipertrofia ventricular.

201. (12348) EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIHIPERTENSIVO SOBRE LA AMPLITUD DEL RITMO DIARIO DE PRESIÓN SISTÓLICA Y DIASTÓLICA. PEREZ LLORET, SANTIAGO (1); TOBLLI, JORGE E. (2); CARDINALI, DANIEL P. (1); MILEI, JOSÉ A. (2)

(1) Dto. de Fisiología, F. Medicina, UBA. (2) Instituto de Inv. Cardiológicas Prof. Dr. Alberto C. Taquini. F. Medicina, UBA

Antecedentes y objetivo: En vista que la presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD) muestra ritmos diarios con un valle durante el periodo nocturno, se estudió el efecto del tratamiento farmacológico antihipertensivo sobre la amplitud de estos ritmos. Métodos: 2729 sujetos fueron evaluados mediante monitoreo ambulatorio de la PA de 24 hs (Oxford Medilog) entre 1988 y 2002. Los periodos diurno y nocturno se definieron en base al diario de los sujetos. Los sujetos con PAS/PAD diurna > 135/85 mmHg fueron clasificados como hipertensos. Los resultados se compararon mediante ANOVA o test de Chi-cuadrado. Resultados: Un 43% de los sujetos fue normotenso (1184). Un 64% de los hipertensos (984 sujetos) estaba bajo tratamiento, 25% con IECA, 27% con combinación de diuréticos, 13% con bloqueantes cálcicos, 10% con beta bloqueantes y 24% con otras drogas.

Todos los tratamientos redujeron las medias diurna y nocturna de PAS y PAD en igual proporción (10%, rango: 9–12%, $p=0.9$). Dado que la reducción de PAS y PAD diurna fue mayor que la nocturna, los tratados mostraron menor amplitud de los ritmos de PA en comparación con los no tratados (PAS: $11\pm 0.2\%$ vs $13\pm 0.3\%$ y PAD: $15\pm 0.2\%$ vs $17\pm 0.3\%$, tratados vs no tratados, ambas $p<0.05$). El 32% de los sujetos tratados (312) no logró control de su PA, independientemente del tratamiento recibido (rango: 22–35%, $p=0.3$). No se observaron diferencias entre la magnitud de la caída nocturna en relación a la droga utilizada (rango: PAS 11–12% y PAS 15–16%, $p=0.4$). Conclusión: Se observó que con todos los tratamientos se obtiene un control similar de la PA diurna y nocturna, con idéntica tasa de fallo terapéutico. La disminución de PA nocturna fue menor en relación a la diurna, por lo cual podrían requerirse tratamientos adicionales o nuevas drogas diseñadas para lograr un mayor control durante la noche.

202. (12349) RITMOS CIRCADIANOS Y ULTRADIANOS DE PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA EN NORMOTENSOS E HIPERTENSOS. PEREZ LLORET, SANTIAGO (1); RISK, MARCELO (2); RAMIREZ, AGUSTÍN (2); CARDINALI, DANIEL P. (1)

(1) Dto. de Fisiología, F. Medicina, UBA. (2) Fundación Universitaria Dr. R.G. Favaloro.

Antecedentes y objetivo: La ausencia de la caída nocturna de presión arterial (PA) podría ser independiente de la evolución de la hipertensión arterial (HTA). El objetivo de este estudio fue comparar las características de los ritmos de PA y frecuencia cardíaca (FC) en normotensos e hipertensos "dipper" y "non-dipper". Métodos: Se utilizó análisis de Fourier para ajustar ritmos de 24, 12 y 8 a 1.5 hs a registros de 24 hs de PA media (PAM) y FC, obtenidos por medición ambulatoria en 452 sujetos. Los periodos diurno y nocturno se definieron en base al diario elaborado por los sujetos. Los sujetos con PAS/PAD diurna $> 135/85$ mmHg fueron clasificados como hipertensos y si la caída nocturna de PAS $< 10\%$ se clasificaron como "non-dippers". Resultados: De los 247 hipertensos, 133 fueron "dipper" y 114 "non-dipper" (47%). De los 205 normotensos un 54% fue "non-dipper". La amplitud de los ritmos de 24 y 12 hs de PAM, pero no de FC, fue menor en los "non-dipper" (7.5 ± 0.2 y 5.0 ± 0.2 mmHg) en comparación a los "dipper" (11.6 ± 0.2 y 6.2 ± 0.2 mmHg; $p<0.01$, ANOVA). El % de variabilidad de PAM relacionada a los ritmos era menor en los "non-dippers" (68±1%) en comparación a los "dipper" (79±1%). Se observó aumento de la variabilidad de la acrofase (momento en el que cada ritmo alcanza su valor máximo) de los ritmos de 24, 12 y 6 hs en los "non-dipper" en comparación a los "dipper" ($p<0.05$, Chi-Sq). La PAM alcanzada en el periodo de 2 horas luego del despertar fue más elevada en los sujetos hipertensos "non-dipper" vs "dipper" (114 ± 2 vs 107 ± 1 , $p<0.01$, ANOVA), sin diferencias en los normotensos "dipper" y "non-dipper". La observación de una alta proporción de "non-dipper" entre los normotensos avala la hipótesis que la falta de caída nocturna de PA no es consecuencia de la HTA. La desorganización de los ritmos en los "non-dipper" tuvo consecuencias sobre la PA al despertar sólo en los hipertensos.

203. (12352) VALORES MEDIOS DE PRESIÓN ARTERIAL DIURNA Y NOCTURNA: COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES MÉTODOS. PEREZ LLORET, SANTIAGO (1); RAMIREZ, AGUSTÍN (2); RISK, MARCELO (2); CARDINALI, DANIEL P. (1)

(1) Dto. de Fisiología, F. Medicina, UBA. (2) Fundación Universitaria Dr. R.G. Favaloro.

Antecedentes: los métodos más comúnmente utilizados para la obtención de las medias diurna y nocturna de presión sistólica (PAS) y diastólica (PAD) luego de la medición ambulatoria de la PA de 24 hs (MAPA) son: 1) CUSUM (los períodos diurno y noc-

turno corresponden a las 6 hs con mayor y menor pendiente del gráfico CUSUM), 2) Intervalo arbitrario (el periodo nocturno se predefine entre las 23:00 y las 07:00) y 3) en base a las anotaciones del sujeto en un diario. Objetivos: Comparar las medias diurna y nocturna de PAS y PAD obtenidas mediante los tres métodos y analizar el impacto de las diferencias sobre la clasificación de los sujetos en hipertensos y en "non-dippers". Métodos: Se realizó MAPA en 470 sujetos. Se calcularon las medias diurna y nocturna en PAD y PAS mediante los tres métodos. Los sujetos con PAS/PAD diurna $> 135/85$ mmHg fueron clasificados como hipertensos y si la caída nocturna de PAS $< 10\%$ se clasificaron como "non-dippers". La concordancia entre las medias de presión se analizó mediante el método de Bland-Altman y en las clasificaciones mediante estadística kappa. Resultados: CUSUM sobreestimó la media diurna de PAS respecto de la definida por intervalos arbitrarios o basado en el diario por 5 ± 8 y 5 ± 7 mmHg ($X\pm SD$), respectivamente ($P=0.001$). Por el contrario, CUSUM subestimó la media nocturna de PAS respecto de los otros dos métodos por -4 ± 6 y -2 ± 6 mmHg, respectivamente ($P=0.001$). Cuando se analizó la PAD, se observó que CUSUM sobreestimó la media diurna respecto de los otros métodos por 3 ± 6 y 3 ± 5 mmHg, respectivamente, y subestimó la media nocturna por -3 ± 5 y -1 ± 5 mmHg, respectivamente ($P=0.1$). Se observó baja concordancia en la clasificación de los sujetos en hipertensos o en "non-dippers" cuando se empleó CUSUM respecto de los otros dos métodos ($k=0.1\pm 0.03$ y $k=0.3\pm 0.04$). CUSUM sobreestimó las medias diurnas y subestimó las nocturnas respecto a los otros dos métodos. No se recomienda su utilización en la investigación y práctica clínica.

204. (12366) DISMINUCION DEL DNA MITOCONDRIAL LEUCOCITARIO Y SINDROME METABOLICO EN ADOLESCENTES. FERNANDEZ GIANOTTI, TOMAS; SOOKOIAN, SILVIA; GARCIA, SILVIA; GONZALEZ, CLAUDIO; DIEUZEIDE, GUILLERMO; PIROLA., CARLOS JOSE

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, UBA. CAIDEM, Chacabuco, Pcia de Buenos Aires.

Recientemente la disminución del DNA mitocondrial (DNA mt) se ha asociado a la patogenia de la diabetes tipo 2. En este trabajo estudiamos la relación DNA mt / DNA nuclear en 175 adolescentes de una muestra poblacional de 934 alumnos de escuela secundaria, con las siguientes características clínicas (media±DS): edad: 15.4 ± 1.5 , 104 mujeres, presión arterial sistólica ajustada por sexo y edad (Z score): 0.57 ± 1.65 y diastólica de -0.08 ± 0.86 , BMI: 0.40 ± 1.08 y contorno de cintura: 74.3 ± 9.6 cm. 54 fueron hipertensos, cuya elevación de la presión arterial parecería depender de algunos signos de síndrome metabólico como una elevación de la relación insulina/ glucosa en ayunas (índice HOMA) y del BMI. Como características de laboratorio mostraron valores promedio de: HOMA 2.60 ± 1.50 , colesterol total 158.5 ± 27.2 mg/dl, triglicéridos 90.4 ± 48.9 mg/dl, colesterol HDL 48.8 ± 9.8 mg/dl, colesterol LDL 91.7 ± 23.0 mg/dl, ácido urico 4.08 ± 1.01 mg/dl, glucosa 88.09 ± 6.83 mg/dl e insulina 11.9 ± 6.4 uU/mL. Resultados: la relación DNA mt / DNA nuclear mediante PCR en tiempo real se relacionó inversamente con la urecemia (Spearman R: -0.18 , $p<0.05$), la glucemia (Spearman R: -0.23 , $p<0.01$) y el índice de insulino-resistencia HOMA (Spearman R: -0.16 , $p<0.05$). Por lo que los adolescentes con insulino resistencia (HOMA > 2) mostraron una menor relación DNA mt / DNA nuclear (media ± ES 26 ± 8 vs. 21 ± 4 , $p<0.05$). No se observó ninguna asociación con las otras características clínicas y bioquímicas estudiadas. En conclusión, una menor relación DNA mt / DNA nuclear podría indicar una disminución del número de mitocondrias la que podría inducir la insulino resistencia.

205. (12423) LA INHIBICIÓN DEL INTERCAMBIADOR NA+/H+ AL INICIO DE LA REPERFUSION REDUCE EL TAMAÑO

DEL INFARTO: PAPEL DE LAS ROS. FANTINELLI, JULIANA; CINGOLANI, HORACIO; MOSCA, SUSANA

Centro de Investigaciones Cardiovasculares

Teniendo en cuenta que la mayor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) ocurre al comienzo de la reperfusión, nuestro objetivo fue evaluar la posible interrelación entre el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE) y ROS en la determinación del tamaño del infarto miocárdico. Para ello, realizamos experimentos en corazones aislados de rata perfundidos isovolúmicamente, en los cuales, después de un período de estabilización de 20 minutos, la arteria coronaria izquierda fue ligada por 40 min y luego reperfundida por 2 horas. El tamaño del infarto (TI) fue determinado mediante la tinción con sales de tetrazolio y expresado como porcentaje del área de riesgo. La peroxidación lipídica fue evaluada a través de la medición de la concentración de las sustancias sensibles al ácido tiobarbitúrico (TBARS). En el grupo control (sin tratamiento) el TI fue de 30 ± 2 %. La administración de un "scavenger" de los radicales hidroxilo, la N-(2-mercapto-propionil)-glicina (MPG) 1 mM al comienzo de la reperfusión disminuyó el TI a 17.6 ± 1,9% (p < 0.05). El bloqueante específico del NHE, isoforma NHE-1, el HOE 642 (cariporide, C), 10 μM, administrado durante los primeros 20 minutos de la reperfusión disminuyó el TI a un valor similar al MPG (15.1 ± 2.4%, p < 0.05). La combinación de ambas intervenciones farmacológicas no provocó protección adicional (18 ± 3%). El contenido de TBARS del grupo control (11,9 ± 1.5 nmol/g) disminuyó significativamente a valores de 5.2 ± 1.3, 7.1 ± 1.1, 5.9 ± 0.6 nmol/g después de MPG, C y C + MPG, respectivamente. Puesto que la inhibición del NHE-1 disminuye las TBARS y el TI a valores semejantes a los obtenidos con MPG, el mecanismo de protección del cariporide parece estar asociado a la disminución del daño oxidativo.

206. (12450) EFECTOS DE DIFERENTES TIEMPOS DE ADMINISTRACION DE LOSARTAN SOBRE EL REMODELAMIENTO VENTRICULAR POST INFARTO EN CONEJOS. PALLEIRO, JIMENA; GONZALEZ, GERMAN E; PEREZ, SUSANA; MONROY, SILVINA; RODRIGUEZ, MANUEL; SEROPIAN, IGNACIO; SACCONI, FLAVIA; PERI CRUZADO, SAMANTA; GELPI, RICARDO J; MORALES, CELINA

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. UBA

Objetivo: comparar el efecto de diferentes tiempos de inicio y duración del tratamiento con losartan (L; 12,5 mg/kg/d) sobre el remodelamiento ventricular post-infarto (IM). 48 conejos fueron sometidos a ligadura de la arteria coronaria izquierda o sham. Se realizaron 6 grupos (G): G1(Sham), G2(IM), G3(IM+L[0]) y G4(IM+L[15]). G3 y G4 recibieron L desde el inicio y desde el día 15 post-IM respectivamente hasta el día 35; G5(IM) de 56 días de evolución y G6 (IM+L[15]) tratado desde el día 15 hasta el día 56. Luego del sacrificio los corazones fueron aislados, se realizaron curvas presión-volumen en un sistema de Langendorff, se procesaron histológicamente y fueron teñidos con H&E, Tricrómico de Masson y Sirius Red. Se midió el diámetro de miocitos en septum (DM), el tamaño de IM (TIM), el índice de adelgazamiento de la cicatriz (AC) y el colágeno en cicatriz (CC%). Resultados: X ± SEM. *p < 0.05 vs. G1, *p < 0.05 vs. G2, † p < 0.05 vs. G3, # p < 0.05 vs. G5.

	G1 (n=10)	G2 (n=10)	G3 (n=7)	G4 (n=7)	G5 (n=6)	G6 (n=6)
TIM (%)	—	26.81 ± 1.97	28.16 ± 2.39	24.86 ± 3.10	20.53 ± 1.61	23.53 ± 2.11
Vol (ml) a	—	—	—	—	—	—
PDF=10 mmHg	0.53 ± 0.09	0.96 ± 0.18	1.81 ± 0.33*	0.94 ± 0.17	0.93 ± 0.15	1.86 ± 0.28#
DM (μm)	13.37 ± 0.28	21.13 ± 0.43	15.61 ± 0.31	15.73 ± 0.25	17.38 ± 0.32	14.57 ± 0.58#
AC	—	0.94 ± 0.10	1.35 ± 0.12*	0.82 ± 0.12†	0.19 ± 0.02	0.28 ± 0.04#
CC (%)	—	70.54 ± 2.35	57.49 ± 2.48*	73.53 ± 1.38	80.78 ± 1.00	76.26 ± 0.97#

La administración de L produciría un efecto desfavorable sobre el remodelamiento post-IM dependiendo de la duración del tratamiento y no de su momento de inicio. Cuando se administró durante 20 días no hubo cambios funcionales con respecto al IM,

mientras que el tratamiento por 5 semanas aumentó la dilatación, disminuyó el CC y aumento el AC.

207. (12469) LA RECUPERACIÓN CONTRÁCTIL DEL VENTRÍCULO DE SAPO SOMETIDO A ACIDOSIS ES INDEPENDIENTE DE LA RECUPERACIÓN DEL PHI Y ESTÁ SUSTENTADA EN EL INFLUJO DE CALCIO. SALAS, MARGARITA; VILA-PETROFF, MARTÍN; VENOSA, ROQUE; MATTIAZZI, ALICIA

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Medicina, 60 y 120, La Plata

La acidosis hipecápnica (AH) produce un efecto inotrópico negativo sobre la contractilidad miocárdica seguido, según la especie, por una recuperación (R) parcial o total. Esta R se evidencia a pesar de la persistencia de la acidosis extracelular. Los mecanismos de esta R no han sido aclarados habiéndose propuesto como probables: la recuperación del pH_i y/o el aumento del Ca(2⁺) intracelular. Nuestro objetivo fue dilucidar el papel desempeñado por estos mecanismos en el corazón de batracio, donde la R es total. La perfusión de tiras ventriculares (TV) o de miocitos aislados (MI) con Ringer equilibrado con 5% CO₂ o con 12% CO₂, provocó un descenso de la contractilidad seguido por R que alcanzó, a los 30 min, valores superiores a los previos al comienzo de la acidosis (113.7 ± 3.03% del valor control). Este efecto contráctil fue acompañado por un descenso y posterior recuperación del pH_i en MI. El bloqueo del intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE) con cariporide, impidió la recuperación del pH_i pero no abolió la recuperación de la contractilidad. La AH produjo un incremento gradual del Ca(2⁺)_i diastólico y sistólico desde el inicio de la AH hasta el final de la R. La inhibición del influjo de Ca(2⁺) a través del modo invertido del intercambiador Na⁺/Ca(2⁺) (KB-R) o a través de los canales de Ca(2⁺) tipo L (nifedipina) abolió la R. La AH produjo además un incremento de la duración del potencial de acción que se mantuvo durante los 30 min de recuperación contráctil. Nuestros resultados indican que, en el ventrículo de sapo: 1. La disminución de la contractilidad por AH es debida a disminución de la respuesta de los miofilamentos al Ca(2⁺), 2. La R es independiente de la recuperación del pH_i, 3. La R depende del influjo de Ca(2⁺) en el que estarían involucrados tanto el intercambiador NCX como los canales de Ca(2⁺) tipo L, siendo este influjo favorecido por la prolongación del potencial de acción.

208. (12313) EFECTO DEL BLOQUEO AT1 EN MIOCARDIO DE RATA HIPERTENSA (SHR) UNINEFRECTOMIZADA (UNX). TOBLLI, JORGE; CAO, GABRIEL; ANGEROSA, MARGARITA

Laboratorio de Medicina Experimental del Hospital Alemán

Objetivo: Evaluar el efecto del bloqueo del Receptor AT1 de Angiotensina II con Valsartán (VAL) en relación con: 1) la expresión de la quimoquina Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); 2) el infiltrado de células mononucleares inflamatorias, macrófagos y monocitos (células ED1); y 3) la expresión de citoquina Transforming growth factor β1 (TGFβ1) en miocardio de rata con severa hipertensión arterial y daño renal progresivo. Métodos: Se utilizaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR) macho y ratas control Wistar Kyoto (WKY). Se practicó uninefrectomía (UNX) y a continuación durante seis meses se procedió con el siguiente esquema: [G1] UNX-SHR (n = 8) agua. [G2] UNX-WKY (n = 8) agua. [G3] UNX-SHR+VAL (n = 8) con VAL 50 mg/kg/día. [G4] UNX-WKY+VAL (n = 8) con VAL 50 mg/kg/día. Se evaluó en tejido miocárdico por inmunohistoquímica: MCP-1; células ED1; TGFβ1. Resultados: Al sexto mes: Presión Arterial (mmHg): G1 = 218 ± 17, G2 = 154 ± 7; G3 = 147 ± 8, G4 = 121 ± 3**. ClCr μl/min/gPC: G1 = 1.2 ± 0.1*, G2 = 2.9 ± 0.1; G3 = 2.6 ± 0.3, G4 = 3.9 ± 0.2**. MCP-1 (% / mm(2)): G1 = 37.5 ± 3.2 *, G2 = 20.6 ± 4.2; G3 = 22.3 ± 4, G4 = 13.6 ± 3.7**. ED1 (Células/mm(2)): G1 = 572 ± 29*, G2 = 192 ± 27; G3 = 286 ± 20***, G4 = 49 ± 11**.

TGF β 1 (% / mm(2)): G1= 19.6 \pm 2.2*, G2= 8.2 \pm 1.5; G3= 11.5 \pm 1.5, G4= 4.4 \pm 1.1**. (p<0.01 * vs. todos G; p< 0.01 ** vs. G2 & G3; p< 0.01*** vs. G2). Conclusiones: El bloqueo del Receptor AT1 de la Angiotensina II a través de la utilización de Valsartán, reduce la inmunexpresión tanto de MCP-1 como de TGF β 1 junto con el infiltrado de células mononucleares (ED1), controlando de esta manera la respuesta inflamatoria en miocardio de rata UNX.

CARDIOVASCULAR C

- 209. (12554) LA ERITROPOYETINA EN ALTAS DOSIS NO TIENE EFECTOS BENEFICIOSOS SOBRE EL INFARTO DE MIOCARDIO REPERFUNDIDO EN OVEJAS.** OLEA, DANIELA; VERA JANAVEL, GUSTAVO (1, 3); DE LORENZI, ANDREA (2); CUNIBERTI, LUIS; YANNARELLI, GUSTAVO; BERCOVICH, ANDRÉS (3); LAGUENS, RUBÉN (1,2); CROTTIGINI, ALBERTO

Universidad Favaloro. (2) Fundación Favaloro, (3) Bio Sidus

El daño de injuria-reperfusion es un cuadro clínico cada vez más frecuente debido al uso de técnicas de reperfusion precoz en el infarto agudo de miocardio (IAM). En ratas y ratones con IAM, se ha comunicado que la eritropoyetina recombinante humana (rhEPO) en altas dosis protege al corazón disminuyendo el tamaño del IAM y mejorando la función del ventrículo izquierdo (VI). En el presente trabajo investigamos si en un mamífero grande y a largo plazo la rhEPO reduce el área necrótica y preserva la función miocárdica en el IAM reperfundido. En 14 ovejas se ocluyó la descendente anterior en su tercio medio 90 minutos y luego se reperfundió. Durante la reperfusion y a las 24 y 48 hs. de ella se administró una infusión i.v. de rhEPO 3.000 U/Kg (n=7) o placebo (n=7) a doble ciego y randomizadamente. Durante el seguimiento se controló el hematocrito (Hcto). A los 70 días (previo al sacrificio) se midieron índices de función ventricular regional y global por ecocardiograma y por cateterismo izquierdo y derecho. La extensión del área necrótica se calculó histológicamente mediante tinción con rojo sirio, y químicamente cuantificando el colágeno por técnica de hidroxiprolina. Resultados: el tamaño de infarto (como % del VI) fue similar en ambos grupos por ambas técnicas (rhEPO: 22,1 \pm 2,1%; placebo: 17,7 \pm 1,6%, p=NS, t-test). La función del VI fue ligeramente peor en el grupo rhEPO, ya que el engrosamiento parietal sistólico peri-infarto fue 0 \pm 10% en el grupo rhEPO y 20 \pm 10% en el placebo (p<0,05), y el volumen de fin de sístole fue 47,0 \pm 5,4 ml en el grupo rhEPO y 32,6 \pm 2,9 en el placebo (p<0,05). El resto de parámetros de función regional y global fueron similares en ambos grupos. El Hcto fue mayor en el grupo rhEPO (39,3 \pm 0,9 vs 36,3 \pm 0,3, p<0.02) indicando que la rhEPO tiene efecto biológico en el ovino. La rhEPO no reduce el área necrótica ni preserva la función en un modelo ovino de IAM.

- 210. (12579) EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLÉMICOS. PAPEL DE PROSTANOIDES VASOCONSTRICTORES.** JEREZ, SUSANA; SIERRA, LILIANA; GUERRERO, RAMIRO; PERAL DE BRUNO, MARIA

INSIBIO-CONICET-UNT

En trabajos previos hemos demostrado que el incremento en la reactividad vascular a la Angiotensina II (Ang II) durante el bloqueo de la producción de NO se debe en parte a la liberación endotelial de prostanoides vasoconstrictores. Objetivo: estudiar el efecto de una dieta rica en colesterol sobre la reactividad vascular a la Ang II y el potencial de membrana en reposo (Pm). Conejos fueron alimentados con una dieta enriquecida con colesterol al 1% (DH) y una dieta control (DC). Al cabo de 4-6 semanas fueron anestesiados y se les midió la PAM por método directo. Se ex-

trajo sangre para dosar colesterol total (CT) y se separó la aorta torácica. Se cortaron anillos para medir contractilidad (Protocolo 1) y Pm (Protocolo 2). Protocolo 1: se estimuló con NA y se realizó una CDRA a Ach, se lavó y a continuación una CDRA a Ang II. Las arterias fueron incubadas o no (control) con Indometacina 10(-5) M, o con SQ29548 10(-6) M) o con 17-ODYA 10(-6) M. Protocolo 2: las mediciones del Pm se realizaron en arterias raspadas y sin raspar antes y después de una estimulación con Ang II 10(-6) M. Resultados: Los valores de PAM fueron similares en conejos DC y DH. En conejos DH los valores de CT fueron superiores (435 \pm 15,6 vs 45,3 \pm 3 mg/dl, p<0,01) y la reactividad endotelial a Ach fue menor que en conejos DC. La respuesta máxima a Ang II fue mayor en conejos DH, y este incremento fue bloqueado por indometacina. Los resultados obtenidos con SQ29548 y 17-ODYA fueron contradictorios. Los valores de Pm de arterias raspadas y sin raspar luego del tratamiento con solución despolarizante de KCl fueron similares. La Ang II produjo disminución del Pm que fue significativamente mayor en arterias sin raspar. La dieta rica en colesterol generó una disfunción endotelial aun sin que se observen cambios en la PAM. En estas condiciones la Ang II estimuló la liberación de prostanoides vasoconstrictores que actuarían incrementando el Pm y la reactividad vascular.

- 211. (12645) EFECTO DE VLDL SOBRE LA RELAJACION ENDOTELIAL IN VITRO.** ZAGO, VALERIA; GORZALCZANY, SUSANA(1); TAIRA, CARLOS(1); WIKINSKI, REGINA; SCHREIER, LAURA

Lab Lípidos y Lipoproteínas-Dto Bioquim Clínica-FFyB-UBA. Lab Lípidos y Lipoproteínas-Dto Bioquim Clínica-FFyB-UBA 1Cát de Farmacología-FFyB

La disfunción endotelial que ejerce LDL es mejor conocida que la de VLDL donde los resultados son escasos y controvertidos. El aumento de triglicéridos (TG) es considerado un factor de riesgo aunque el mecanismo aterogénico de las VLDL no está bien dilucidado. Objetivo: evaluar los cambios en la relajación dependiente del endotelio en presencia de VLDL típicas y alteradas en comparación con LDL. Se obtuvieron VLDL (n=12) y LDL (n=6) humanas de donantes por ultracentrifugación. Las VLDL se subdividieron según su distribución de colesterol/TG en típicas: >0.18 (n=6) y ricas en TG:<0.15 (n=6). Se incubaron anillos aislados de aorta torácica de ratas hembras, SD (200-250g) y se evaluó la relajación inducida por acetilcolina (10(-9)-10(-5)M) en anillos precontraídos con noradrenalina (10(-8)M) en presencia y ausencia de lipoproteínas (0.15 mgProt). Se determinó % de relajación (R) y la concentración efectiva 50 (CE50). El %R fue menor para VLDL ricas en TG (49.1 \pm 26.2) que VLDL típicas (92.1 \pm 9.8), p<0.01; sin diferencias en CE50 (p=0.137). A su vez %R de VLDL ricas en TG y LDL fueron similares (p=0.321) y la mayor CE50 se observó en VLDL atípicas: 7.2 \pm 0.5 vs LDL: 6.6 \pm 0.4, p= 0.036. VLDL típicas no produjeron disfunción endotelial. Las VLDL ricas en TG presentaron un efecto inhibitorio de la relajación dependiente del endotelio semejante al observado con LDL. Alteraciones en la composición de VLDL aumentarían su capacidad aterogénica.

- 212. (12649) PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) EN CORAZONES DE RATAS DIABÉTICAS SOMETIDOS A ISQUEMIA (I)-REPERFUSIÓN (RP).** SAVINO, ENRIQUE; TESTONI, GUSTAVO; VÁZQUEZ, NANCY; ASTUDILLA, CHRISTIAN; MARINA PRENDES, MARÍA; VARELA, ALNÍCIA

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IQUIMEFA-CONICET

El PC y la diabetes protegen al miocardio de los efectos nocivos de la I-RP. Sin embargo no está bien comprobada la existencia del PC en corazones de ratas diabéticas. Para aportar datos respecto de esta controversia se trabajó con ratas Wistar machos se 200-250 g inyectadas con estreptozotocina 50 mg/Kg i.v. o con

vehículo. A las 3 semanas los corazones se perfundieron según Langendorff con Krebs bicarbonato con glucosa 10 mM estimulados a 5 Hz. Se sometieron a 45 min de I y 30 min de RP. El PC consistió en 1 ciclo de I y 5 min de RP o 2 ciclos de 3 min de I intercalando 5 min de RP, antes de la I-RP. Se registraron la presión desarrollada (PD), la presión diastólica final (PDF) y las $+dP/dt$ y $-dP/dt$ máximas. Los resultados se expresan como % de los valores obtenidos antes de iniciar la I-RP. En controles sin PC la PD al final de la RP se recuperó $19,8 \pm 5,5$ y con PC $42,3 \pm 7,0$, $p < 0,05$, $n=7$. La PDF al final de la I aumentó $97,6 \pm 13$ sin PC vs $30,0 \pm 12,2$ con PC. Las diabéticas sin PC ($n=7$) recuperaron la PD $65,0 \pm 16,0$ y la PDF aumentó $46,8 \pm 18,1$, $p < 0,05$ vs controles sin PC. En diabéticas el PC de 1 ciclo no tuvo ningún efecto. En los controles el PC de 2 ciclos ($n=7$) no tuvo efectos sobre la PD ($11,3 \pm 1,3$) ni la PDF ($60,3 \pm 10,4$). En las diabéticas el PC de 2 ciclos ($n=7$) tuvo efectos favorables sobre la PD en la etapa inicial de la RP (diabéticas sin PC $14,8 \pm 4,2$ vs con PC $42,9 \pm 10,5$, $p < 0,05$) y sobre la PDF ($46,8 \pm 13,2$ sin PC vs $14,4 \pm 6,3$ con PC, $p < 0,05$). Después de los 10 min the RP, no hubo diferencia en la PD entre ambos grupos. Se concluye que la diabetes mejoró la función cardíaca en I-RP y que en esta condición metabólica es posible obtener PC aumentando la severidad del estímulo preconditionante.

213. (12657) DEFICIENCIA DE ZINC DURANTE LA PREÑEZ Y CRECIMIENTO: EFECTOS SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR. TOMAT, A; GIRGULSKY, L; LENCINAS, G; CANIFFI, C; VALLONE, C; ZAGO, V; GONZALEZ, A; ELESGARAY, R; BALASZCZUK, A; COSTA, A; ARRANZ, C

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. IQUIMEFA. CONICET.

Previamente mostramos que la deficiencia de zinc en ratas desde el destete y durante el crecimiento induce aumento de la presión arterial (PAS) y disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONS) cardiovascular y renal en el adulto. Objetivo: Estudiar los efectos de la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y posnatal temprana sobre PAS, el sistema del óxido nítrico cardiovascular, perfil lipídico y el estrés oxidativo en la edad adulta. Métodos: Ratas Wistar recibieron desde el inicio de la preñez y hasta el destete: Dieta baja (8 ppm zinc) o control (30 ppm zinc). Los hijos machos recién destetados de cada grupo de madres continuaron con: dieta baja (Cb y Bb) o control (Cc y Bc) durante 60 días. Al finalizar este periodo se determinó: PAS; concentración de zinc y triglicéridos en plasma; concentración de zinc en heces; intensidad de quimioluminiscencia urinaria espontánea (Io); concentración de nitritos y nitratos urinarios (NOx) y actividad ONS con L-[U14C]-arginina en arteria aorta y corazón.

* $p < 0,05$ vs Cc; & $p < 0,001$ vs Bc

Grupo	PAS (mmHg)	Zn plasma (μ g/dl)	Zn Heces (μ g/día)	Triglicéridos (mg/dl)	Io (1/mg creatinina)	NOx (nmol/ml. min.100g)	NOS ventrículo (pmol/g tejido)	NOS Aorta (pmol/g tejido)
Cc	129 \pm 3	147 \pm 7	834 \pm 154	157 \pm 6	0,84 \pm 0,13	1,42 \pm 0,16	196 \pm 3	229 \pm 6
Cb	147 \pm 4*	119 \pm 5*	121 \pm 19* $\&$	214 \pm 13* $\&$	2,90 \pm 0,31*	0,83 \pm 0,07*	148 \pm 5*	157 \pm 7*
Bc	145 \pm 5*	164 \pm 31	702 \pm 138	142 \pm 5	1,61 \pm 0,01	1,18 \pm 0,1	139 \pm 7*	152 \pm 11*
Bb	142 \pm 4*	117 \pm 7* $\&$	174 \pm 33* $\&$	190 \pm 12*	3,66 \pm 0,36* $\&$	0,74 \pm 0,09*	148 \pm 3*	165 \pm 8*

El insuficiente aporte de zinc en la dieta durante la vida fetal, la lactancia y el crecimiento indujo una disminución de la actividad del sistema del óxido nítrico cardiovascular, un aumento de la presión arterial y de triglicéridos en plasma y mayores niveles de estrés oxidativo sistémico. Estos cambios favorecerían el desarrollo de patologías cardiovasculares en el adulto.

214. (12671) EFECTOS DEL EJERCICIO INTENSO INICIADO TEMPRANAMENTE SOBRE EL REMODELAMIENTO

VENTRICULAR POST-INFARTO DE MIOCARDIO. RODRÍGUEZ, MANUEL; GONZÁLEZ, GERMÁN E.; PALLEIRO, JIMENA; PÉREZ, SUSANA; MONROY, SILVINA; BERTOLASI, CARLOS; GELPI, RICARDO J.; MORALES, CELINA

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA

Objetivo: Evaluar el remodelamiento ventricular en presencia de ejercicio iniciado tempranamente en la evolución del infarto de miocardio (IM). Material y método: Se utilizaron conejos hembras neozelandeses sometidos a cirugía sin inducción de IM (operación simulada o "sham") o bien a ligadura de una rama prominente de la arteria coronaria izquierda para producir IM. Se realizó, además, un protocolo de ejercicio intenso en "treadmill", iniciado a los 18 días post-IM, incrementando gradualmente la velocidad, la duración y el número de sesiones hasta llegar a 5 sesiones por semana, a 17 m/min. Se consideraron 3 grupos: Grupo 1 (G1), sham sedentario; grupo 2 (G2), IM sedentario; y grupo 3 (G3), IM y ejercicio intenso. Los animales fueron sacrificados a los 56 días; el corazón fue extraído y perfundido en forma aislada según la técnica de Langendorff. Se realizaron curvas presión-volumen del ventrículo izquierdo (VI), evaluando el componente sistólico mediante la presión desarrollada (PD, mmHg) y el grado de dilatación ventricular mediante el componente diastólico: volumen a una dada presión diastólica final (PDF). El tamaño de infarto (TI) fue medido mediante histomorfometría. Resultados: X \pm error Standard. *: $P < 0,05$ vs. G2

	G1 (n=11)	G2 (n=6)	G3 (n=3)
PD máxima	91,33 \pm 5,71	81,23 \pm 6,47	64,13 \pm 12,45
Volumen (ml) a PD máxima	1,22 \pm 0,08	1,80 \pm 0,21	2,67 \pm 0,83
Volumen VI (ml) para PDF=10 mmHg	0,58 \pm 0,13	1,12 \pm 0,17	2,23 \pm 0,77 *
TI (% de la pared del VI)	-	25,08 \pm 2,51	24,96 \pm 2,38

Si bien se trata de datos preliminares, los mismos sugieren que el ejercicio intenso iniciado tempranamente en la evolución del IM se asocia con un mayor deterioro sistólico y sobrecarga de volumen.

215. (12701) ROL DEL INTERCAMBIADOR NA+/CA2+ (NCX) EN MODO INVERSO EN EL MECANISMO DE FRANK-STARLING. PIAGGIO, MR; PEREZ, NG; CINGOLANI, HE

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Fac. Cs. Médicas, UNLP

Desde Frank-Starling es conocido que el aumento de la longitud (L) diastólica del músculo cardíaco aumenta su acortamiento siendo esto la base de la curva de función ventricular. Sin embargo, se ha postulado que el estiramiento miocárdico posee una respuesta contráctil inmediata y una segunda respuesta lenta que se desarrolla en los siguientes 10-15 minutos. De ser así, las curvas L-tensión desarrollada (TD) variarán según se mida la TD inmediatamente post estiramiento (I) o luego de 10-15 minutos (F), hipótesis que evaluamos en este trabajo. Se hicieron experimentos en músculos papilares (MP) de gato, los que fueron estirados progresivamente en porcentajes fijos de su L inicial (Li) hasta obtener su fuerza máxima (FM). Se les midió TD I y F. Cada estiramiento mostró un comportamiento bifásico en el tiempo de la TD lo cual originó dos curvas L-TD significativamente diferentes (Tabla 1A). Dado que se ha sugerido que la fase lenta de aumento de TD se debería al ingreso de Ca²⁺ a la célula por el NCX en modo inverso, al finalizar la primera serie de estiramientos bloqueamos este mecanismo con KBR7943 5 μ M y repetimos el protocolo, observando que la diferencia entre las curvas se cancelaba (Tabla 1B). Experimentos piloto mostraron que los resultados de dos series consecutivas de estiramientos no difieren significativamente, lo cual valida la comparación de curvas consecutivas antes y después de alguna intervención. (Tabla: valores= media \pm ES de TD en % de la FM de cada MP).

	10% de Li	15% de Li	20% de Li	25% de Li	30% de Li	ANOVA
A I	39.8±4.9	53.3±7.3	65.1±4.8	75.4±4.0	88.6±1.9	P=0.038 n=8
A F	47.7±7.7	61.4±7.4	74.5±5.0	85.1±2.9	100±0	
B I	50.9±11.6	64.1±9.8	75.6±7.5	91.8±6.3	100.2±3.5	P=0.563 n=8
B F	46.7±6.8	61.8±6.9	70.7±5.0	90.3±4.7	100±0	

Los resultados demuestran la participación del NCX en el mecanismo de Frank-Starling

216. (12737) EL AUMENTO EN LA NITRACIÓN PROTEICA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL POR ASFIXIA PERINATAL ES PREVENIDO POR LA APLICACIÓN DE HIPOTERMIA. LOIDL, C. FABIÁN; CACCURI, ROBERTO; REY FUNES, MANUEL; IBARRA, MARIANO; CAPANI, FRANCISCO; COIRINI, HECTOR

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. E. De Robertis". Instituto de Biología y Medicina Experimental, Dpto Bioquímica Humana - Facultad de Medicina -UBA

La asfixia perinatal (AP) severa induce en el 30 % de los casos secuelas neurológicas y psiquiátricas a largo plazo con un costo médico, social y económico altísimos. En estudios previos hemos determinado la participación del óxido nítrico (NO) en el desencadenamiento de la fisiopatología por AP en diferentes áreas del SNC utilizando un modelo de AP en ratas. Al mismo tiempo observamos un efecto neuroprotector por la aplicación de hipotermia. En el presente estudio evaluamos en ratas de 3 semanas de vida que fueron sometidas a AP y a AP en condiciones de hipotermia (n = 5 / grupo) la nitración de proteínas, producto de la formación de peroxinitrito, formado por una excesiva liberación de NO, mediante inmunocitoquímica con anticuerpos anti-nitrotirosina (N-tyr). La N-tyr fue estudiada en corteza frontotemporal, estriado e hipocampo. A diferencia del grupo control se observó en el grupo AP: intensa marca en todas las capas de la corteza cerebral con aproximadamente un 80% de aumento, incluyendo la capa I con la presencia de células de Cajal-Retzius; somas neuronales en cuerpo calloso; mayor inmunomarcación en cuerpo estriado (60%) y en particular en el núcleo accumbens. En el hipocampo también se observó un aumento de 80%. El grupo sometido a AP en condiciones de hipotermia presentó una inmunomarcación similar al control. El sistema nervioso central de los animales sometidos a AP está difusamente alterado en su sistema nitrérgico. Estos cambios observados pueden prevenirse por la aplicación de hipotermia en el momento de asfixia, quizás debido a que al bajar el metabolismo, se evita la cascada neurotóxica disparada en los primeros minutos post-AP. (UBACYT M020)

217. (12761) EFECTO DEL EJERCICIO SOBRE LA FUNCION DIASTOLICA EN PACIENTES CON HIPERTENSION ARTERIAL. PASCUA, ANDRES; BORREGO, CARLOS; DONATO, MARTIN; GABAY, JOSE; BERROCAL, DANIEL; GELPI, RICARDO J; GRINFELD, LILIANA

Servicio de Hemodinamia y Cardiología Intervencionista, Hospital Italiano de Buenos Aires. Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Los pacientes con hipertrofia ventricular izquierda por hipertensión arterial presentan alteraciones diastólicas, particularmente durante el ejercicio. Sin embargo, es controvertido si luego del esfuerzo esta disfunción se normaliza. Objetivo: Evaluar la función diastólica durante y después del ejercicio en pacientes con hipertensión arterial. Se estudiaron 6 pacientes controles (grupo 1, G1) y 6 pacientes hipertensos (Grupo 2, G2). Los pacientes fueron sometidos a cateterismo cardíaco y realizaron ejercicio isométrico durante el estudio hasta que la frecuencia cardíaca aumento un 46±2 % (p<0.05). Se midió: la presión arterial media (PAM) y la presión de fin de diástole (PDFVI) y se calculó la máxima velocidad de ascenso de la presión (+dP/dtmáx) y la constante de tiempo de caída de la presión ventricular (tau). La PAM fue

de 92±05 y 106±3 (p<0.05) en G1 y G2, respectivamente. La +dp/dt[máx] se incrementó significativamente durante el ejercicio en G1 y retornó al valor basal luego del esfuerzo; no se observaron modificaciones significativas en G2. *: p<0.05 vs basal. X±SEM

Grupo 1	Basal	Ejercicio	Post-ejercicio
PDFVI (mmHg)	14.2 ± 1.5	23.1 ± 2.9	18.4 ± 1.9
Tau (mseg)	30.4 ± 2.6	32.2 ± 5.3	26.2 ± 4.3
Grupo 2	Basal	Ejercicio	Post-ejercicio
PDFVI (mmHg)	20.6 ± 3	33.1 ± 6*	23.8 ± 3.9
Tau (mseg)	23.5 ± 2.8	35.7 ± 7.4*	41.6 ± 6.5*

El ejercicio isométrico disminuye la velocidad de relajación e incrementa la PDFVI en pacientes con hipertensión arterial e hipertrofia ventricular izquierda. Luego del ejercicio, la relajación permaneció alterada. Estas alteraciones diastólicas sugieren la presencia de atontamiento miocárdico.

218. (12777) LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROFINA (TRH) COMO POSIBLE AGENTE HIPERTRÓFICO EN CÉLULAS CARDIACAS DE RATA. SCHUMAN, MARIANO (1); SCHLESINGER, HADASSA (2); KREMER, AMIR (2); KESSLER-ICEKSO, GANIA (2); GARCIA, SILVIA I (1)

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Fac de Medicina, UBA. Felsenstein Medical Research Center, Tel Aviv University.

En trabajos previos demostramos que el sistema de la TRH cardíaco se encuentra hiperactivado (aumento del precursor mRNA y del contenido de proteína) en el corazón hipertrofiado de las ratas SHR vs controles WKY y SHR jóvenes en estadio de prehipertrofia. Estudiamos en un modelo de infarto por ligamiento de la arteria coronaria izquierda en rata normal (n=3) la expresión de TRH en la zona adyacente a la cicatriz del ventrículo izquierdo por una RT-PCR a partir del mRNA extraído del tejido cardíaco con primers específicos utilizando la amplificación del gen constitutivo S3 como control de carga. Observamos a las 24 hs posteriores a la maniobra un aumento en la expresión del gen de TRH (TRH/S3) de más de 3 veces en la rata infartada respecto a la rata sham (p<0,03). Dado los escasos estudios en la bibliografía acerca de la TRH cardíaca y su posible rol en el desarrollo de hipertrofia analizamos en cultivos celulares de fibroblastos y miocitos de neonatos de ratas Wistar la presencia de TRH y su receptor de tipo I por RT-PCR a partir del mRNA extraído del cultivo con primers específicos. Encontramos expresión del gen de TRH y de su receptor tipo I en ambos tipos celulares observándose las bandas específicas correspondientes (349 y 505 pb). Para evaluar efectos agudos de la TRH estimulamos cultivos de cardiomiocitos con TRH (0,1 y 1 uM) (n=3) observando un aumento de la expresión de un gen considerado como marcador del desarrollo de hipertrofia, la bMCH (bMCH/S3) (p<0,05). Asimismo la estimulación de los miocitos con un agente hipertrofico, fenilefrina (100uM) (n=4) provocó un aumento significativo (p<0,02) de la expresión del gen de TRH (TRH/S3) en las células tratadas (24 y 48 hs) vs las controles. Estos resultados demuestran por primera vez que la TRH y su receptor se expresan tanto en fibroblastos como miocitos de neonatos y que la TRH participaría en el desarrollo de hipertrofia en cardiomiocitos aislados de rata.

219. (12780) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA HO/CO EN UN MODELO DE HIPERTENSIÓN POR COARTACIÓN AÓRTICA. GORZALCZANY (1), SUSANA; POLIZIO (2), ARIEL HÉCTOR; YANNARELLI (2), GUSTAVO; TAIRA (1), CARLOS ALBERTO; TOMARO (2), MARÍA LUJÁN

Cátedra de Farmacología - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA. Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

El CO es producido endógenamente como producto del catabolismo del grupo hemo a través de 3 isoformas de la

hemoxigenasa (HO), siendo la hemoxigenasa-1 (HO-1) la forma inducible, la cual ha sido involucrada en la regulación de la función cardíaca, aunque no se le conoce aún su rol en modelos experimentales no genéticos de hipertensión arterial. Se utilizó un modelo de coartación aórtica (Rojo-Ortega y Genest, 1968). Para ello el vaso fue ligado entre las dos arterias renales por debajo de la arteria mesentérica superior, en el grupo con coartación de la aorta abdominal (CoA), mientras que al grupo control se lo sometió a una operación simulada (OS) sin realizar la ligadura de la aorta. Los experimentos se llevaron a cabo 7 días luego de la cirugía. Se evaluó el efecto de un inhibidor de la HO, Zn protoporfirina IX (ZnPP-IX) sobre la variación de la presión arterial media (PAM) en ratas despiertas. Además se determinó el ARNm por PCR y la expresión de HO por Western-Blot en arteria aorta torácica y abdominal de ambos grupos. ZnPP-IX (45 µmol/Kg, i.p.) aumentó significativamente la PAM (34,0±6,1* mmHg, *p<0,05) en las ratas controles sin observarse dicho efecto en las ratas con CoA (1,3±4,2 mmHg). El aumento de la PAM en las OS no es observado si los animales son pretratados con 7.5 mg/Kg (i.v.) de L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) antes del tratamiento con ZnPP-IX. Los niveles de ARNm y la expresión de HO-1 están aumentados significativamente en la aorta torácica de ratas con CoA (2,37±0,75*, p<0,01) comparado con las de OS (1,00±0,22), sin observarse diferencias en las aortas abdominales de ambos grupos. Estos resultados sugerirían que la coartación abdominal afecta al sistema HO/CO modificando su actividad e indicando un compromiso del monóxido de carbono en la patogénesis de la hipertensión.

FARMACOLOGIA

220. (12114) ACCION DIRECTA DE RALOXIFENO SOBRE EL METABOLISMO VASCULAR. MASSHEIMER, VIRGINIA (1,2); POLINI, NÉLIDA (1); BENOZZI, SILVIA (1); RAUSCHEMBERGER, M.BELÉN (1,2); SELLES, JUANA (1)

(1) *Cátedra de Análisis Clínicos II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur.* (2) *CONICET*

Los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM) son propuestos como alternativa terapéutica para la menopausia. Estos compuestos han demostrado ser muy efectivos previniendo la pérdida de masa ósea. Nos propusimos investigar cual es el efecto del fármaco Raloxifeno (SERM) a nivel vascular. Empleamos anillos de aorta aislados de ratas (4-6 meses de edad) tratados "in vitro" con raloxifeno (Rx) durante 1-20 min. Observamos que 10 nM Rx estimula la actividad NOS, incrementando la síntesis de óxido nítrico (NO) (3.24 ± 0.3 vs 1.82 ± 0.16 pmol NO/mg prot Rx vs control, p< 0.01). El rango de dosis ensayado fue 1nM – 1µM. El efecto demostró ser específico de sexo, ya que en ratas macho no se obtuvo respuesta (0.29±0.03; 0.39 ± 0.19 vs 0.38 ± 0.02 pmol NO/mg prot, Rx 10 y 1nM vs control). El NO producido por el endotelio vascular, a nivel sistémico es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria (AP). El Rx inhibió la AP de un plasma rico en plaquetas incubado con anillos de aorta en todo el rango de dosis estudiado (46-50% respecto al control, p< 0.01). La inhibición de la NOS con 10µM L-NMMA suprimió significativamente (p<0.001) el efecto antiagregante del fármaco (50% vs 3 % s/control, Rx vs Rx+NMMA respectivamente). Cuando se repitió el ensayo empleando ratas ovariectomizadas, el Rx mantiene su acción antiagregante luego de 1 y 10 min. tratamiento (41; 50 % inhibición respecto al control). Estos resultados aportan evidencias que el Rx ejerce una acción directa sobre el tejido vascular, estimulando la síntesis de NO y que el fármaco podría ser efectivo aún en ausencia de actividad ovárica (postmenopausia).

221. (12157) LA SOBREENPRESIÓN MUSCARÍNICA ESTA INVOLUCRADA EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL. RIMMAUDO, LAURA (1);

DE LA TORRE, EULALIA (1); FISZMAN, GABRIEL (2,1); SALES, MARÍA ELENA (1)

(1) *Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA.* (2) *Instituto de Oncología A.H. Roffo, Facultad de Medicina, UBA.*

Previamente demostramos que las células LMM3 derivadas de un adenocarcinoma mamario murino, sobreexpresan receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) con respecto a células mamarías murinas normales. Estudiamos el efecto de la activación muscarínica sobre la proliferación celular y la angiogénesis tumoral. El agonista carbacol (CARB) estimuló en forma concentración dependiente la proliferación celular. La dosis efectiva máxima (10(-9) M) incrementó en un 158 % (n=4) la proliferación de células LMM3. El pretratamiento de las células con atropina (AT), y pf-HHSiD (antagonista M[3]) 10(-7) M bloqueó totalmente el efecto del agonista. La misma dosis de CARB estimuló la producción de óxido nítrico (NO) (µM NO[2](-)/10(6) cel.) (basal:8,39± 0.71; CARB: 14,71±0,60; n=3) efecto que también fue revertido por AT. Además observamos que la respuesta angiogénica in vivo (d=N°vasos/mm(2)) inducida por las células LMM3 (d=1,63±0,24) (n=9) fue potenciada por CARB (d=2,78±0,37) (n=4) y dicho efecto fue revertido totalmente con 10(-6) M de pf-HHSiD (d=1,41±0.15) (n=6) y parcialmente por pirenzepina (PIR) (antagonista M[1]) 10(-6) M (d=2,12±0,31) (n=6) y metocramina (MET) (antagonista M[2]) 10(-6) M (d=2,14± 0,19) (n=6). La expresión de VEGF-A, estudiada por Western blot en lisados de células LMM3, se incrementó con CARB y el efecto fue revertido totalmente por AT y pf-HHSiD y parcialmente por PIR y MET. Concluimos que la activación muscarínica de células LMM3 estimula la proliferación in vitro y la respuesta angiogénica fundamentalmente a través del subtipo M[3].

222. (12158) EFECTOS DE ANESTESIA INTRAVENOSA CON KETAMINA-FENTANILO-MIDAZOLAM SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTISOL, PROLACTINA, IL-6 Y ÓXIDO NÍTRICO. ELENA, GUSTAVO ADOLFO PEDRO; ACOSTA, ANA; ANTONIAZZI, SONIA; TETTAMANTI, VERÓNICA; COLUCCI, DARIÓ; PUIG, NORA

Instituto de Inmunología, División Anestesiología, Facultad de Ciencias Médicas UNR.

Introducción. Los métodos anestésicos participan en la modulación de la respuesta inmune- inflamatoria a la cirugía. Utilizando el método ketamina combinado con opioides y benzodiazepinas, que produce anestesia satisfactoria, se evaluaron los cambios hemodinámicos, y la respuesta leucocitaria, de cortisol, prolactina, interleucina 6 (IL-6) y óxido nítrico (NO) durante colecistectomías a través de registros prequirúrgicos (M1), inmediatamente después de la intubación (M2) y al final de la cirugía (M3). Pacientes y método: 9 pacientes recibieron ketamina 0,1mg/kg.min en 10 minutos, midazolam 0,2 a 0,3 mg/kg e Innovan 0,02 ml/Kg en la inducción y mantenimiento con ketamina 1mg/kg.h. y midazolam bolos de 0,05-0,1 mg/Kg cada 40 minutos. Para la intubación endotraqueal recibieron succinilcolina y vecuronium 0.1mg/kg para el mantenimiento. Resultados: Se registró estabilidad en la respuesta hemodinámica: TAS, TAD y FC, sin diferencias significativas de M1 a M3. En M2 aumentó el nivel de prolactina (ng/ml) M1 24±29,3; M2 89,7±61,4; M3 46,9±26,4 p=0,001. De M1 a M3 aumentó el cortisol (ng/ml) M1 455± 731; M2 573± 1118; M3 1071±1880, p=0,062. Se observa un aumento en M3 de IL-6(pg/ml): M1 2,15±0,73; M3 10,90±15,17 p=0,034 y del número de neutrófilos/µl (M1 4279±1679; M2 4343±1788; M3 12104±6223; p=0,009), mientras que se registró una caída en óxido nítrico (µM): M1 32,3±18,6, M2 38,56±14,2, M3 26,9±12,1 M2 vs M3 p=0,021. Conclusiones: Si bien se observó estabilidad hemodinámica, se comprobaron modificaciones en la homeostasis endocrino inmunológica con cambios en prolactina, IL-6, neutrófilos y en los tenores de NO. Esto podría indicar interacciones entre la anestesia ketamina-fentanilo-midazolam y la respuesta inflamatoria post operatoria.

223. (12169) EFECTOS DE LA ANESTESIA CON REMIFENTANILLO-MIDAZOLAM: RESPUESTA HEMODINÁMICA, PARÁMETROS HORMONALES E INMUNOLÓGICOS EN COLECISTECTOMÍAS. ELENA, GUSTAVO ADOLFO PEDRO; ACOSTA, ANA; ANTONIAZZI, SONIA; TATTAMANTI, VERÓNICA; COLUCCI, DARIÓ; PUIG, NORA

Instituto de Inmunología, División Anestesiología, Facultad de Ciencias Médicas UNR.

Introducción: Las drogas anestésicas interactúan con el eje inmuno endocrino e influirían en la respuesta típica de hormonas generada por la cirugía. Evaluamos el efecto de anestesia intravenosa con remifentanilo-midazolam sobre: respuesta hemodinámica, leucocitos de sangre periférica, niveles de cortisol, prolactina, interleucina IL-6 y óxido nítrico en registros prequirúrgicos (M1), postintubación (M2) y final de cirugía (M3). Pacientes y método: 9 pacientes recibieron remifentanilo 1µg.Kg(-1).min(-1) durante 5 minutos para la inducción y 0,5 µg.Kg(-1).min(-1) durante el mantenimiento. Se administró midazolam 0,2 a 0,3 mg.kg(-1) en la inducción y bolos de 0,05-0,1 mg.Kg(-1) cada 40 minutos, succinilcolina 1mg.kg(-1) para intubación endotraqueal y vecuronium 0.1mg.kg(-1) para el mantenimiento. Resultados: Los parámetros hemodinámicos aumentaron en M3: TAD(mmHg): M1 60±16; M2 58±9; M3 78±12; p< 0,05; TAS (mmHg): M1 94±19; M2 95±18; M3 115±15 p< 0,05; sin complicaciones clínicas. La prolactina (ng.ml(-1)) aumentó con respecto a M1 18,8±21,6 en M2 64,8±48,4(p= 0.013) y M3 54±34 (p=0.022); y en M3 aumentaron los neutrófilos.µl(-1): M1 5667±3693; M2 5389±4311; M3 9416±5794 p=0,04. No se registraron cambios en cortisol (ng.ml(-1)): M1 1146± 2031; M2 811±1367; M3 634±917; p=0,28; en IL-6 (pg.ml(-1)): M1 4,8±5,2; M3 13,4±11,3 p=0,20; ni en óxido nítrico (µM): M1 35,7±19,9; M2 35,3±20,9; M3 32,3±22,6 p=1,00. Conclusiones: El aumento de prolactina se atribuiría a los opioides administrados, mientras que el cambio en el número de neutrófilos podría relacionarse con el nivel de catecolaminas y fenómenos inflamatorios al final de la intervención. Los leves cambios observados sugieren que la anestesia con remifentanilo-midazolam provee adecuada estabilidad hemodinámica y neuroendocrina.

224. (12258) EFECTOS METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS EN RATAS NORMALES ADULTAS TRATADAS CON PROCAÍNA. (1) FRONTINI, ANA V.; (1) BLANCO, MARIANO; (1) ESPARZA, JUAN M.; (1) LAMELAS, PABLO; (1) VITA, TOMÁS; (1) MERCAU, SEBASTIÁN; (3) PERALTA, ENZO; (2) NAVES, ARIEL; (1) PUSTERLA, DIEGO; (1,4) VENERA, GRACIELA

(1) Cátedra de Biofísica y Fisiología, (2) Cátedra de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina, Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR); UMCE y (3) Laboratorio Central (HIG); (4) CONICET

La procaína regularía los niveles del RNAm de la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa ejerciendo un efecto modulador sobre la formación de esteroides inducida por AMPc sin afectar los niveles séricos basales de colesterol (CHO) y corticosteroides (CT) disminuyendo la concentración de cortisol sólo cuando los valores son superiores a los normales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la procaína sobre parámetros metabólicos y la histología de órganos relacionados con el envejecimiento (cerebro, corazón, aorta, hígado, bazo y riñón). Para ello, ratas macho Sprague-Dawley adultas (90 días) se trataron con procaína (T) (1,4 mg/kg, 0,3 ml v.i.p. 3 veces por semana durante 29 semanas). Las ratas control (C) se inyectaron con solución salina 0,9 g%. Semanalmente se evaluó el peso corporal. Se extrajo sangre sin ayuno previo en distintos estadios del tratamiento. Se determinaron hematocrito (Hto), fórmula leucocitaria (FL), glucosa (Glu), triglicéridos (TG), CHO, HDL, homocisteína (HCys) y CT séricos. Los resultados se analizaron mediante la t de Student. No se observaron diferencias en: Hto,

FL, peso de órganos y peso corporal entre los grupos. La procaína tuvo un efecto diferencial provocando una disminución de TG (C= 168,50±15,18 mg/dl; T= 102,67±17,83 p<0,05), y HCys (C= 5,50±0,04 µmol/l; T= 3,76±0,32 µmol/l; p<0,05) a partir de la semana 8°. Los niveles séricos de CT, Glu y CHO no mostraron diferencias significativas. En todas las ratas C se observó leve hipertrofia miocárdica y en el 50% de los animales T, ligera esteatosis hepática. No se detectaron cambios significativos en los demás órganos estudiados. El presente trabajo demuestra que la procaína desciende los niveles séricos de TG y HCys y es el primer informe del efecto de la procaína sobre la HCys.

225. (12295) MICROALGAS VERDES COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES. ORTEGA ESCANDE, LUCÍA (1); RÍOS DE MOLINA, M.C.(1,3); JUÁREZ, ANGELA (1,2)

(1) Dpto. Quím. Biológica, (2) Dpto. Biodiver. Biol. Experimental, FCEN-UBA, (3) CONICET Buenos Aires, Argentina.

Las microalgas verdes son una fuente rica de compuestos naturales útiles para el hombre. En los últimos años, se ha intensificado la búsqueda de antioxidantes que disminuyan procesos de estrés oxidativo desencadenados por la generación de radicales libres, que constituyen un factor importante en la etiología de enfermedades animales y humanas. Se ha demostrado que algunas especies de microalgas poseen potentes sistemas antioxidantes, por lo que podrían emplearse como suplementos antiestrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue realizar un relevamiento de la capacidad antioxidante de extractos citoplasmáticos, obtenidos a partir de cultivos axénicos de distintas especies de microalgas verdes (*Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus acutus* SAG 276-3a, *S. acutus* Matanza, *Coelastrum sphaericum* y *Asterococcus limneticus*). El efecto protector de estos extractos se analizó sobre un sistema modelo que emplea fracción mitocondrial de homogenato de hígado de rata sometida a estrés oxidativo por Fe/Ascórbico. Se determinaron los niveles de malondialdehído (índice de peroxidación lipídica) en presencia y ausencia de los distintos extractos. Los resultados mostraron una disminución significativa (p< 0,05) de la peroxidación lipídica en presencia de los mismos (10-60 % de protección). El extracto más efectivo resultó ser el de *C. kessleri* (61±1,8 % de protección) y el menos efectivo el de *S. acutus* SAG (11±2 % de protección). Al estudiar los compuestos antioxidantes liposolubles e hidrosolubles presentes en los distintos extractos, se detectó el mayor nivel de glutatión reducido (572,8 nmol/mg de proteína) en la cepa que ejerció mayor protección. Los resultados indicarían la potencial utilidad de las microalgas como fuente alternativa de compuestos antioxidantes con posible aplicación en la línea de suplementos nutricionales, por lo que se han iniciado trabajos de caracterización y cuantificación de los componentes involucrados.

226. (12426) ACCIÓN OSTEOGÉNICA DE UN NUEVO COMPLEJO DE VANADIO(IV) CON EL FLAVONOIDE QUERCETINA SOBRE OSTEOBLASTOS EN CULTIVO. BARRIO, DANIEL ALEJANDRO (1); WILLIAMS, PATRICIA AM (2); ETCHEVERRY, SUSANA B (1,2)

(1) Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. (2) CEQUINOR, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

El Vanadio es un elemento de transición esencial para las plantas y los animales superiores, presenta diferentes propiedades biológicas y farmacológicas entre las cuales se pueden mencionar su acción insulino mimética, osteogénica y antitumoral. La obtención de nuevos compuestos a partir de prototipos activos puede potenciar sus propiedades biológicas. En este trabajo se reporta la caracterización y estudios biológicos de un nuevo complejo de vanadio(IV) con el flavonide Quercetina que posee

propiedades antitumorales. El complejo se identificó por diferentes técnicas fisicoquímicas obteniéndose la siguiente fórmula molecular $[VO(Quercetina)_2.EtOH]_n$. Posteriormente, se realizaron los estudios de la actividad del complejo sobre la proliferación (ensayo del cristal violeta) y diferenciación (actividad específica de fosfatasa alcalina (FAL) y producción de colágeno) de los osteoblastos en cultivo. El complejo de vanadio(IV) estimuló la proliferación de dos líneas de células osteoblasto-símil (UMR106 y MC3T3-E1) siendo el efecto máximo 119 ($p < 0.01$) y 116 ($p < 0.02$)% del basal, respectivamente. Concentraciones superiores a 50 μM produjeron un efecto inhibitorio sobre ambas líneas celulares. A 100 μM se observó una disminución de ca. 50 % respecto del basal. La inhibición causada por el complejo es superior a la producida por el ligando libre 23,6 \pm 3,7% ($p < 0.001$) respecto del basal. El complejo mostró importantes efectos osteogénicos estimulando la producción de colágeno de las células UMR106 hasta un 124 \pm 4,3% respecto del basal a 5 μM . Además, resultó ser un inhibidor menos eficaz de la FAL (18,4 \pm 5,7% del basal, $p < 0,05$) que el vanadilo(IV) (46 \pm 4,0% respecto del basal, $p < 0.001$) afectando en menor medida la diferenciación osteoblástica. Estos resultados sugieren que el nuevo complejo de vanadilo(IV) con Quercetina presenta potenciales propiedades osteogénicas.

227. (12466) CUMARINAS SUSTITUIDAS COMO INDUCTORAS DE APOPTOSIS EN CÉLULAS LEUCEMICAS HUMANAS. RIVEIRO, MARIA EUGENIA; SHAYO, CARINA (2); FABIAN, LUCAS (3); MOGLIONI, ALBERTINA (3); DAVIO, CARLOS (1)

(1) *Lab. de Radioisótopos, FFYB, UBA;* (2) *Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET.* (3) *Dpto. Química Orgánica, FFyB, UBA.*

La utilización de agentes inductores de apoptosis resulta una opción promisoriosa para el tratamiento de leucemias humanas. Existen referencias bibliográficas sobre la actividad pro-apoptótica de la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina) en células leucémicas humanas. Por este motivo, realizamos el estudio de distintas cumarinas naturales y sintéticas estructuralmente relacionadas a la escopoletina para establecer una relación entre su estructura y la actividad pro-apoptótica. Se ensayaron distintos compuestos donde se introdujeron grupos oxhidrilos en distintas posiciones del sistema cumarínico y se determinó la capacidad de inducir apoptosis en la línea leucémica humana U-937. Se evaluó la inhibición de la proliferación y la citotoxicidad a las 24 y 48 horas de tratamiento. La inducción de apoptosis se determinó por fragmentación del ADN y técnicas de tinción nuclear.

Tratamiento	concentración (mm)	inh. Proliferación 24 h (%)	inh. Proliferación 48 h (%)	citotoxicidad 24 h (%)	citotoxicidad 48 h (%)	apoptosis
6,7-dihidroxi-cumarina	0,25	25,5 \pm 5,6	62,0 \pm 4,1	19 \pm 4	46 \pm 4	SI
7-hidroxi-4-metilcumarina	0,25	NO	12,0 \pm 1,3	2 \pm 1	4 \pm 2	NO
7-hidroxi-4-metilcumarina	2,00	19,7 \pm 4,8	57,2 \pm 4,0	11 \pm 6	40 \pm 3	SI
7,8-dihidroxi-4-metilcumarina	0,25	52,7 \pm 3,1	72,1 \pm 2,5	24 \pm 5	62 \pm 4	SI
Ácido cafeico (Ác. 3,4-dihidroxiifenilacrilico)	0,25	31,9 \pm 2,5	70,6 \pm 3,6	26 \pm 5	72 \pm 6	SI

Estos resultados señalan la importancia del patrón de sustitución de los grupos oxhidrilos de las hidroxycumarinas en la actividad pro-apoptótica de células leucémicas. Por lo tanto, resulta de interés profundizar los estudios de la relación estructura-actividad con el objetivo de descubrir nuevas estructuras cumarínicas con mayor actividad y posible aplicación en distintos protocolos terapéuticos de leucemias humanas.

228. (12644) CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA E HISTOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LENTINUS LINDQUISTII. FERNANDEZ ALANIS, EUGENIO (1); BAGDADI, ANDREA (1); EVELSON, PABLO (2);

MANDALUNIS, PATRICIA (3); ALBERTÓ, EDGARDO (4); TASAT, DEBORAH (1,3)

ECyT-UNSAM. ECyT-UNSAM (1), FFyB-UBA(2), FO-UBA (3) y IIB-INTECH (UNSAM-CONICET) (4)

A partir de basidiomicetes se han aislado sustancias con actividad inmunomoduladora, antiinflamatoria y antioxidante. Nuestro objetivo fue evaluar sobre las vías respiratorias de ratones BALB/C, la actividad biológica preventiva in vivo del extracto etanólico de *Lentinus lindquistii* (LL), una variedad autóctona argentina. Para ello se utilizó un modelo de daño pulmonar provocado por la exposición a contaminantes particulados aéreos (ROFA). Los animales se dividieron en 4 grupos: Grupo I (control), Grupo II (3 dosis diarias de ROFA 0,17mg/kg peso, 3 veces durante 1 semana), Grupo III (LL en 6 dosis de 0,34mg/kg peso durante 2 semanas) y Grupo IV (LL+ROFA). Histológicamente evaluamos: el número celular total (CT), los diferentes tipos celulares del lavado broncoalveolar (DC) y el número de células productoras de mucina (PAS positivas). Bioquímicamente analizamos el daño oxidativo a lípidos (TBARS), la capacidad antioxidante total (TRAP), la actividad catalasa y los niveles de ácido ascórbico en homogeneizado de pulmones de animales de los distintos grupos. El CT se incrementó en GIII respecto de GI (0,99 \pm 0,13vs.0,7 \pm 0,06x10⁶cél/ml) manteniéndose la fracción monocito/macrófago (MO/MA) en valores control (95,6 \pm 0,37vs.97,3 \pm 0,53%); también el CT aumentó en el GIV respecto del GIII (3,16 \pm 0,79vs1,69 \pm 0,27x10⁶cél/ml) pero la fracción MO/MA de ambos disminuyó respecto de GI (43,2 \pm 7,43 y 56,9 \pm 11,8vs.97,3 \pm 0,53%). El número de células PAS+ no disminuyó en los Grupos III y IV al compararse con el grupo control. En los GIII y IV los niveles de TBARS aumentaron en relación al control (GIII:6,0 \pm 1,6; GIV:9,9 \pm 1,1; GI:3,7 \pm 0,2pmol/mg prot). Este daño oxidativo se corresponde con los valores de antioxidantes encontrados para los distintos grupos: TBARS, catalasa y ácido ascórbico no muestran diferencias en GIII respecto del GI. El extracto etanólico de *Lentinus lindquistii* muestra actividad quimioattractante pero carece de actividad antioxidante en este modelo.

229. (12731) ESTUDIO REOLÓGICO DEL SURFACTANTE PULMONAR. CORRECCIÓN DEL EFECTO DE LAS PROTEÍNAS POR ADICIÓN DE DEXTRANO. MARTÍNEZ SARRASAGUE, MARÍA MARGARITA; FACORRO, GRACIELA; CIMATO, ALEJANDRA; HAGER, ALFREDO

Cátedra de Física - Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires

Estudios in vivo e in vitro han demostrado que la sangre, el suero y el plasma pueden comprometer severamente la función biofísica del surfactante pulmonar. La hemoglobina, la albúmina y el fibrinógeno poseen un fuerte efecto inhibitorio de su actividad. También es sabido, por estudios de tensión superficial, que polímeros no iónicos (PEG, dextrano y PVP) revierten la acción deletérea de las proteínas. Para comprender mejor estos procesos, ya que se desconoce su naturaleza, estudiamos el comportamiento reológico del surfactante pulmonar exógeno (SPE) proveniente de lavado broncoalveolar bovino, su modificación por el agregado de suero humano y el efecto neutralizante del polímero dextrano. La viscosidad aparente se midió en un viscosímetro cono - plato Brookfield, a 20,0°C y a una velocidad de 50 rpm. SPE en diferentes concentraciones se procesó puro, en presencia de suero humano, y con y sin agregado de dextrano. El SPE presentó un comportamiento pseudoplástico, con ligera histéresis. Su viscosidad aumentó exponencialmente con la concentración. La viscosidad aparente de una solución de SPE decayó (10,0 \pm 0,5 a 2,0 \pm 0,2 cp) en función de la concentración de proteínas séricas (0 -30 mg/ml). El agregado de dextrano (25 mg/ml) a soluciones de SPE (10 mg/ml) adicionadas con suero, restableció en 80 % la viscosidad original. Se realizaron estudios preliminares de microviscosidad mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE), con 5-doxil esteárico como marcador, y el parámetro 2A // para evaluar la fluidez. La concentración de SPE no alteró los valores de fluidez; la variación de la microviscosidad por el agregado de dextrano resultó

no significativa. Los resultados evidencian que el dextrano revierte la variación que sobre la viscosidad aparente ejerce la presencia de proteínas séricas; y son concordantes con los obtenidos en el análisis de la tensión superficial. Así se refuerza la potencial utilidad de polímeros combinados con SPE.

- 230. (12743) EL PRETRATAMIENTO CON ESPIRONOLAC-TONA DISMINUYE LA BIODISPONIBILIDAD DE LA DIGOXINA ADMINISTRADA POR VÍA ORAL EN RATAS.** GHANEM, CAROLINA; DELLI CARPINI, GRISELDA (1); CATANIA, VIVIANA A.(2); LUQUITA, MARCELO G. (2); BENGOCHEA, LAURA A (1); MOTTINO, ALDO D. (2)

Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. CONICET - Universidad Nacional de Rosario.

Introducción: Previamente demostramos que la espirolactona (E) induce la expresión y actividad in vitro de la P-glicoproteína (P-gp) intestinal. La digoxina (D) es un sustrato típico de la P-gp y se co-administra con E en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). Objetivo: Evaluar el efecto de la E sobre la biodisponibilidad de digoxina administrada vía oral en ratas. Materiales y Métodos: Se dividieron ratas Wistar macho en, Grupo E: inyección con E (200 umoles/kg/día, por 3 días consecutivos, i.p.); grupo C: inyección con vehículo. Biodisponibilidad de D in vivo: se administraron 25.6 nmol/kg de D vía oral y se recolectó sangre y bilis durante 135 min. El flujo biliar se determinó por gravimetría y la concentración de D utilizando D-H3 como trazador. En otro lote de ratas con igual dosis de D se muestreó sangre de vena porta hasta 30 min. Los resultados se expresan como media±DE, n=4. Resultados: La concentración plasmática de D disminuyó significativamente a partir de los 90 min (en fmol/ml), T90: E=8.3±3.0 vs C=18.5±6.0*; T105: E=9.5±3.1 vs C=25.3±6.1*; T120: E=8.2±2.7 vs C=22.7±4.8*; T135: P=7.5±1.9 vs C=21.4±6.4* (* P<0.05). Este mismo comportamiento se observó en el contenido de D en sangre portal en ratas tratadas con E a los 25 min y 30 min, presentando una disminución del 60 y 77 %, respectivamente (p<0.05). La excreción acumulativa biliar y el contenido de D hepático no presentaron diferencias significativas entre los grupos. Conclusiones: La inducción de P-gp intestinal, produce una disminución en la absorción de D, disminuyendo su biodisponibilidad plasmática. Dado que la digoxina presenta un rango terapéutico estrecho y que se suele coadministrar con E en pacientes con ICC, sugerimos que esta interacción medicamentosa debería ser considerada para establecer futuras dosis terapéuticas apropiadas de D en dichos pacientes.

- 231. (12778) ESTRES OXIDATIVO EN PULMON POR EXPOSICION A PARTICULAS AMBIENTALES.** ROSSELLI, MARIA SOLEDAD (1); FERNANDEZ ALANIS, EUGENIO (2); BAGDADI, ANDREA (2); TASAT, DEBORAH (2); EVELSON, PABLO (1)

Laboratorio de Radicales Libres (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. (2) ECyT-UNSAM

Existe un creciente interés en el estudio de los efectos sobre la salud de las partículas ambientales, un componente de la contaminación del aire de centros urbanos. Varios estudios han sugerido que las especies activas del oxígeno podrían estar involucradas en la iniciación y la progresión de los efectos patológicos producidos por la exposición a estas partículas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar el grado de estrés oxidativo producido por la exposición a material particulado en pulmón de ratón. Se utilizó un modelo de exposición a contaminantes particulados aéreos provenientes de la combustión del petróleo (ROFA). Los animales fueron expuestos mediante una instilación nasal de 3 dosis diarias de ROFA (0,17 mg/kg peso), tres veces durante una semana. Los animales fueron sacrificados 4 horas luego de la última instilación. La ocurrencia de

estrés oxidativo fue evaluada mediante los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), la quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxido de terbutilo (QL), la capacidad antioxidante total (TRAP), la concentración de glutatión (GSH) y de ácido ascórbico (ASC) y la actividad de catalasa en homogeneizados de pulmón. La exposición a partículas ambientales produjo un aumento del 100 % en los TBARS (valor control: 3,7 ± 0,2 pmol TBARS/ mg prot) mientras que no se observaron cambios en la QL (valor control: 835 ± 99 cpm/ mg prot) respecto del grupo control. El TRAP y el GSH no mostraron cambios cuando se compararon con los animales no instilados (TRAP: 22 ± 2 umol Trolox /mg prot; GSH: 3,7 ± 0,6 nmol/ mg prot). La concentración de ASC y la actividad de catalasa disminuyeron en un 50 % respecto del grupo control (ASC: 0,98 ± 0,05 umol/ mg prot; catalasa 0,43 ± 0,04 pmol/ mg prot). En conclusión, los resultados muestran la generación de especies oxidantes junto con la disminución en los niveles de defensas antioxidantes lo que sugiere la ocurrencia de estrés oxidativo.

GASTROENTEROLOGIA

- 232. (11939) DESARROLLO DE UNA SOLUCIÓN ALTERNATIVA PARA PRESERVAR HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA.** PETROCELLI, SILVANA; GIRAUDI, PABLO; GUIBERT, EDGARDO (1); RODRÍGUEZ, JOAQUÍN; MAMPRIN, MARÍA E

Farmacología. Farmacología, 1 Biología Molecular. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

La solución de la Universidad de Wisconsin (UW), diseñada para preservar el hígado humano a trasplantar, fue modificada en nuestro laboratorio lográndose mantener suspensiones de hepatocitos de rata (H) viables durante 72 h. Lamentablemente su uso es limitado por el alto costo. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una solución de preservación alternativa más económica y sencilla que permita mantener H viables y funcionales durante el mayor período de tiempo de modo que puedan utilizarse en el hígado bioartificial o en el trasplante celular. Los H fueron preservados a 0°C, N[[2]], durante 72 h en solución GSIII (cuyos componentes claves son gluconato de K, sacarosa y BES) y en UW. Se determinó la capacidad buffer de ambas soluciones y diariamente se analizó la viabilidad mediante: liberación de LDH (%), contenido de glucógeno (% de cambio) y de ATP (nmoles/10(6)cel). La solución GSIII mostró una capacidad buffer superior a UW (26 vs 5 mEqH(+))/L/unidad de pH). A las 72 h no se encontraron diferencias significativas para la liberación de LDH (4.5±1.2 vs 4.9±1.3) ni en el contenido de glucógeno (28.1±6.5 vs 19.3±4.2) (anova, p<0.05, n=3). Finalizado el período de isquemia fría, los H fueron reoxigenados (120 min, 37°C, KHR) y se determinaron los parámetros de viabilidad mencionados y la eficiencia de detoxificación de amonio (%EDA={ [NH4]0h-[NH4]t}/ [NH4]0h) x100). Los resultados obtenidos fueron comparados con H recién aislados. A los 120 min no se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos en el contenido de ATP (6.7±1.2 para GSIII, 8.3±2.1 para UW y 7.9±1.9 para los controles). El % de EDA mostró un comportamiento similar: GSIII= 57.6±19.2, UW= 47.9±13 y controles= 40.2±9.1. Estos resultados nos permiten concluir que la solución GSIII es adecuada para preservar H viables y funcionales durante 72 h con valores de detoxificación de amonio y contenidos de ATP similares a controles. Constituye una alternativa a la UW con una mayor capacidad buffer y un menor costo.

- 233. (11981) INHIBICIÓN DE LA SECRECIÓN SALIVAL POR ACTIVACIÓN CENTRAL DE RECEPTORES DE CANNABINOIDES.** FERNÁNDEZ SOLARI, JAVIER(1); PRESTIFILIPPO, JUAN PABLO(1); MCCANN,

SAMUEL(1); RETTORI, VALERIA(1); ELVERDIN, JUAN CARLOS(2)

(1)Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET-Facultad de Medicina, UBA (PICT 03-14264).
(2)Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA.

Es bien conocido que los cannabinoides afectan distintas funciones fisiológicas. Hasta la fecha se han clonado y caracterizado dos tipos de receptores de cannabinoides (CB_r): CB_{1r} principalmente en SNC y periférico, y CB_{2r} principalmente en tejidos periféricos y células inmunes. El endocanabinoide más estudiado es la anandamida (AEA) que presenta gran afinidad por los dos tipos de CB_r. Por otra parte, la secreción salival se encuentra bajo control de los sistemas simpático y parasimpático por activación de receptores adrenérgicos y colinérgicos, respectivamente. Además, se ha reportado que los cannabinoides modulan la neurotransmisión autonómica. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la inyección intracerebroventricular (icv) de AEA sobre la secreción salival de la glándula submaxilar (GSM) en ratas Wistar macho adultas (5/grupo). Se colocaron cánulas icv por donde se les administró AEA (50 ng); AM251(500 ng), un antagonista específico para CB_{1r}; AM251+AEA; o salina. Para obtener la saliva secretada se canuló el conducto excretor principal de una de las GSMs. Los resultados fueron analizados por el test t de Student. La secreción salival fue inducida por inyección de dosis crecientes de metacolina (MC), agonista colinérgico, por vena femoral (1, 3 y 10 µg/Kg) antes (curva control) y después de la administración icv de las distintas drogas, pues la rata no presenta secreción salival espontánea. El tratamiento con AEA redujo la secreción salival inducida por las 3 dosis de MC utilizadas. Con 1µg/Kg: de 5.6±0.5 mg a 2.9±0.7 mg (p<0.05), con 3µg/Kg: de 18.0±1.7 mg a 9.1±1.6 mg (p<0.01) y con 10µg/Kg: de 41.5±3.1 a 25.7±4.3 mg (p<0.05). Por otro lado cuando se co-inyectaron AM251 y AEA, el efecto inhibitorio de AEA fue bloqueado para las 3 dosis de MC utilizadas. AEA inyectada icv inhibió la secreción salival inducida por metacolina actuando a través de CB_r centrales.

234. (12175) GLUCAGON INDUCE LA EXPRESIÓN DEL CANAL DE AGUA AQUAPORINA-8 EN HÍGADO DE RATA. SORIA, LEANDRO R.; GRADILONE, SERGIO A.; MARINELLI, RAÚL A.

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Universidad Nacional de Rosario.

La hormona glucagon, vía AMPc y activación de la proteína quinasa A (PKA), estimula la redistribución intracelular de la aquaporina-8 (AQP8) desde un compartimiento vesicular hasta la membrana canalicular del hepatocito, un proceso clave para la regulación hormonal de la secreción biliar. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si glucagon regula, además, el nivel de expresión hepática de la proteína AQP8. A ratas Wistar machos adultas se les administró glucagon (1 mg, i.p.) o vehículo (controles) siguiendo un protocolo de seis dosis en un período de 48 horas. Seguidamente se extrajeron los hígados, se prepararon membranas celulares totales (MCT) por ultracentrifugación y la expresión de las proteínas AQP8 y AQP9 se evaluó por inmunoblotting y densitometría. Glucagon aumentó significativamente la expresión de AQP8 (+85%; p < 0,01; n=4) respecto a los controles. Sin embargo no se observaron cambios en la expresión de AQP9 en respuesta a la hormona. Cultivos primarios de hepatocitos aislados de rata tratados con glucagon (1 µM) durante 12 horas también mostraron un aumento de AQP8 en MCT (+66%; p < 0,01; n=8). El pretratamiento por 30 min con los inhibidores de PKA, H89 (30 µM) o PKI (10 µM) previno completamente el efecto inductor de la hormona. Finalmente, en células cultivadas por 12 horas en presencia del activador exógeno de PKA, dibutyryl-AMPc (100 µM), también se observó un aumento de la expresión de AQP8 (+74%; p < 0,01; n=4). Conclusión: Nuestros resultados sugieren que glucagon induce la expresión hepática de la proteína AQP8 por un mecanismo dependiente de la vía de señalización AMPc-PKA.

235. (12243) PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE HEPATOCITOS DE RATA: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA DURANTE EL ALMACENAMIENTO A 0°C. LLARRULL, MARÍA SOLEDAD; SCANDIZZI, ANGEL; GUIBERT, EDGARDO (1); RODRIGUEZ, JOAQUIN

Farmacología. Farmacología, Biología Molecular(1). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

La hipotermia disminuye la actividad metabólica de los tejidos favoreciendo su preservación. Además durante la isquemia fría los tejidos efectúan un metabolismo anaeróbico condicionando la viabilidad de los mismos. Resultó de interés entonces investigar la actividad respiratoria de hepatocitos sometidos a protocolos de preservación, y su relación con la viabilidad celular para mejorar las condiciones de preservación. Los experimentos se realizaron con hepatocitos preservados en solución de la Universidad de Wisconsin, equilibrada con: 1- Aire (UW-A) y 2- N[2] (UW-N) a 0°C durante 72 hs. En ambos grupos se determinó el consumo de O₂ a 0°C en UW-A mediante polarografía, empleando el electrodo de Clark. Como control se utilizaron hepatocitos resuspendidos en solución Krebs a 36°C. La caracterización del funcionamiento del sensor a bajas temperaturas y la determinación polarográfica del contenido de O₂ en la solución UW-A a 0°C, se realizó de acuerdo a (1). Los resultados mostraron que la respiración endógena a 0°C fue de 1.37±0.12 nmol/min/10(6)cel, (n=6) vs 33.14±6.28, (n=3) a 36°C. Con el agregado de succinato (2 mM) se produjo la estimulación de la respiración con un cociente V_{succ}/V_{endog} de 2.12±0.49 a 0°C. Para 36°C el cociente fue de 1.48±0.10, lo que indicaría aumento de la permeabilidad de membranas para el succinato debido a la hipotermia. No se observaron diferencias significativas en la respiración ni en la liberación de LDH al medio de preservación en función del tiempo de almacenamiento a 0°C o de la atmósfera de preservación. La PO₂ de las soluciones UW-A y UW-N, al cabo de 72 hs de preservación fueron (UW-A: 95.39±0.06 mmHg y UW-N: 28.72±4.81 mmHg). 1-Llarrull MS y col, *Annals of Hepatology* 4:222-224, (2005). Concluimos que los hepatocitos almacenados en solución UW a bajas temperaturas mantienen actividad respiratoria mínima y que el contenido de O₂ de la solución de preservación sería un factor a considerar en los protocolos de preservación.

236. (12301) SOBREEXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN CÁNCER COLORRECTAL. THEILLER, ELVIRA; MINELLA, KIRIAM; SOLÍS, EDITA; VENERA, GRACIELA; GARNERO, NIDIA; DE LA VEGA, DANIEL

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL Instituto Universitario Italiano de Rosario - IUNIR.

La comunicación entre células es crítica para la supervivencia de células normales y malignas. Proteínas especializadas facilitarían la cohesión de las mismas y la formación de "clusters" de células malignas, favoreciendo el crecimiento y la diseminación del tumor. Entre estas proteínas endógenas ligantes de carbohidratos - lectinas, destaca la galectina-3 (gal-3). En el presente estudio se investigó la expresión celular de gal-3 en biopsias de tejido colónico normal (n=36) y maligno bien diferenciado (n=5), moderadamente diferenciados (n=10) y pobremente diferenciados (n=21), usando anticuerpo monoclonal anti gal-3 y método inmunohistoquímico-inmunoenzimático LSAB2 (DAKO). En colon normal se encontró muy baja expresión de gal-3 en células epiteliales y tejido conectivo, con patrón focal e intensidad de coloración débil (+). Mayor positividad para gal-3, con aumento de intensidad de color y de distribución celular en relación al aumento de indiferenciación tisular, se encontró en colon maligno. El patrón fue focal, con intensidad débil/moderada (+) en cánceres bien diferenciados (n=4/5). En cánceres moderadamente diferenciados el patrón de distribución fue difuso y la intensidad de coloración moderada/fuerte (++) en 8/10 muestras, situación que se acentuó para cánceres pobremente diferenciados, donde 18/21 muestras alcanzaron intensidad de coloración (+++). En los dos

últimos casos la proteína se encontró en el citoplasma, sobre la superficie celular, el núcleo y, atendiendo a la moderada positividad encontrada en células caliciformes, se supone que también la mucina colónica maligna expresa aumento de gal-3. Estos tumores altamente vascularizados, mostraron intensa gal-3 positividad en las paredes de los vasos sanguíneos y moderada positividad en tejido conectivo circundante. Los resultados mostraron sobreexpresión celular de gal-3 en cáncer colorrectal, cuyo aspecto más crítico sería la implicancia en la cohesividad celular y en la adhesión de células malignas a sitios estratégicos para la progresión y metástasis.

237. (12365) EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ALUMINIO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CALBINDIN-D28K (CABP28K) Y CALMODULINA (CAM) EN TEJIDOS DEL SISTEMA DIGESTIVO DEL POLLO. ORIHUELA, DANIEL; PIZARRO, MANUEL

Lab. Invest. Fisiol. Exp. Facultad de Bioquímica y Cs. Biol. UNL

La intoxicación con aluminio (Al) ha sido asociada a alteraciones en el metabolismo del calcio (Ca), siendo la vía digestiva una de las principales rutas de acceso al organismo. CaBP28k y CaM son proteínas citosólicas que desempeñan un rol clave en la regulación de la concentración intracelular de Ca, tanto en células epiteliales que transportan Ca como en tejidos que no transportan Ca. Con el objetivo de analizar los efectos de la administración oral crónica de Al sobre la expresión de CaBP28k y CaM en tejidos del sistema digestivo, pollos raza White leghorn fueron tratados desde el hatching con 60 mg Cl3Al/kg peso corporal por día, disuelto en el agua de bebida, por el término de 10 semanas. Controles (C) recibieron agua destilada. Se midieron en duodeno, hígado y páncreas el contenido de CaBP28k y CaM por western blot usando anticuerpos monoclonales específicos, así como el nivel tisular de Al por espectrometría de absorción atómica. El tratamiento con Al redujo significativamente el nivel de CaBP28k en mucosa duodenal (un 41%) y páncreas (un 28 %) respecto de C (n=5, P < 0,05). En hígado, CaBP28k resultó indetectable. La inmunoreactividad para CaM no fue modificada por el Al en ningún tejido. El contenido de Al de todos los tejidos analizados resultó ser significativamente mayor en el grupo tratado con Al, respecto de C (P < 0,05). Los resultados sugieren que la administración crónica de Al modificaría el metabolismo del Ca en intestino delgado y páncreas del pollo, reduciendo los niveles de CaBP28k.

238. (12400) EVALUACION IN VITRO DE UN MINIBIO-REACTOR FUNCIONAL PARA HÍGADO BIOARTIFICIAL. COMPARACIÓN DE PARÁMETROS DE EFICIENCIA PARA DETOXIFICACIÓN DE AMONIO. RODRIGUEZ, JOAQUIN; SCANDIZZI, ANGEL; ALMADA, LUCIANA; MAMPRIN, MARÍA E.; GUIBERT, EDGARDO (2); GIRAUDI, PABLO

Farmacología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Biología Molecular

Se desarrolló un prototipo de minibio-reactor con funciones de hígado bioartificial para optimizar parámetros de función en escala mínima. El sistema consta de dos compartimientos, a- el plasmático (Cp) que es perfundido con sangre entera de conejo, circulante a través de fibras huecas (140 fibras, polímero de poliéster (PEPA), d=210 um, Vol sangre=20 mL) a un flujo de 9 mL/min y b- el compartimiento celular (Cc) que contiene 70-90.10(6) hepatocitos de rata (Viabilidad: 82-91%) en un volumen máximo de 9.7±1.1 mL. Se estudiaron dos grupos experimentales de minibioreactores: I- sin células y II- minibioreactor cargado con hepatocitos de rata recién aislados. En ambos casos se administró una carga de Amonio que produjo una conc. plasmática de 0.700 ±0.182 mM (n=8). Durante 120 min se recolectaron muestras de sangre y medio celular (Cc) y se determinaron las conc. de amonio (AMc). Se compararon: a-el balance de masas: BM (% de carga de amonio detoxificado en 120 min) versus dos

parámetros obtenidos de las AMc plasmáticas: b- clearance: CL=carga amonio/AUC y c- relación de reducción de dosis de amonio: RR=(1- [post]/[pre]).100, siendo; [post]= AMc post tratamiento con el minibioreactor (t=120 min) y [pre]= AMc pretratamiento (t=0). Los resultados obtenidos mostraron: Gpo I: CL:15.1±2.1 mL/h; RR:35.1±12.5 % y BM:22.9±5.8 % (p<0.05 vs RR)(n=5), Gpo II: CL:22.8±2.3 mL/h; RR:83.5±9.2 % y BM: 78.6±7.5 % (p<0.05 vs RR)(n=5). El Clearance sobreestima la capacidad de detoxificación de amonio en el minibioreactor sin células. La Relación de Reducción de dosis también la sobreestima tanto en el minibioreactor sin células como en el cargado con hepatocitos. El Balance de Masas es el parámetro más apropiado ya que considera en el cálculo los movimientos de amonio en ambos compartimientos del mini-bioreactor.

239. (12404) CAMBIOS HISTOLÓGICOS Y FUNCIONALES EN EL HÍGADO PRENEOPLÁSICO DE RATAS TRATADAS CON INTERFERON ALFA-2B . PISANI, GERARDO (1); QUINTANA, ALEJANDRA (1); ALVAREZ, MARIA (2); LUGANO, MARIA C. (1); CARNOVALE, CRISTINA (2); CARRILLO, MARIA CRISTINA (1,2)

Área Morfología - FCByF - UNR. (1) Área Morfología; (2) IFISE (CONICET). FCByF. UNR

En pacientes con hepatitis B o C crónicas se ha descrito la presencia de fibrosis hepática, proliferación ductular y además se ha observado una mayor incidencia de desarrollo de hepatocarcinomas (HCC). En trabajos previos demostramos que el interferon alfa-2b (IFN) tiene un efecto en estadios muy tempranos del desarrollo de HCC, incrementando la apoptosis en focos preneoplásicos hepáticos. En este trabajo se estudió la acción del IFN sobre el flujo biliar, el número de conductos biliares y la fibrosis en hígados preneoplásicos. Se utilizaron ratas Wistar machos adultos y se compararon los siguientes grupos (n=5 c/u): ratas sujetas a un modelo de iniciación-promoción (G1) y ratas tratadas IFN durante las 2 fases (G2). Al cabo de los tratamientos se colectó bilis en todos los grupos determinándose: flujo biliar y sales biliares totales e individuales. En secciones coloreadas con H&E se determinó el número de conductos biliares por campo microscópico (400X). La fibrosis se determinó en secciones coloreadas con Rojo Sirio-Acido Pírico para colágeno y se evaluó cuantitativamente por análisis digital. La densidad de área ocupada por las fibras colágenas se expresó en cm²/cm². El flujo biliar (µl. min⁻¹.g hígado⁻¹) se encontró significativamente disminuido en los tratados con IFN (G2=1,380±0,082 vs G1=1,798±0,240, p<0,05). El número de conductos biliares disminuyó en el grupo tratado con IFN (G2=2,31±0,81 vs G1=3,87±0,81, p<0,05). El grupo tratado con IFN mostró una disminución de la densidad de área ocupada por fibras colágenas (G2=0,005±0,001 vs G1=0,025±0,011, p<0,05). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de sales biliares totales e individuales entre grupos. Nuestro estudio demuestra que el tratamiento con IFN tiende a producir un restablecimiento de la histología normal en el hígado preneoplásico con una disminución en el flujo biliar cuya causa está siendo estudiada.

240. (12448) PÉRDIDA ÓSEA ALVEOLAR EN UN MODELO DE SUBMANDIBULECTOMÍA Y PERIODONTITIS EXPERIMENTAL. ELVERDIN (1), JUAN C; CHIARENZA, ANA P (2); LUCHELLI, MARÍA A (2); VACAS, MARÍA I (2)

Cát. de Fisiología. Fac. Odontología. UBA. Cát. Fisiología¹ y Bioquímica General y Bucal², Fac. Odontología, UBA

En trabajos previos, en secciones mesio-distales de mandíbulas de rata con submandibulectomía (GSMx) y periodontitis experimental (PE), hemos observado la mayor pérdida relativa de volumen óseo en la zona apical inter-radicular. Esto podría reflejar el avance de la pérdida ósea desde las corticales alveolares. Objetivo: estudiar el efecto de la GSMx y PE sobre la pérdida ósea de la cortical alveolar lingual y vestibular y la aparición de lesión de furcación. Metodología: Ratas Wistar adultas (300 g) fueron

sometidas a SMGx. Dos semanas después de extirpar las glándulas o de la operación simulada, se indujo unilateralmente la PE colocando una ligadura con hilo de algodón alrededor del cuello del primer molar inferior derecho (el molar contralateral se usó como control). La ligadura se dejó en la boca por 1 semana. Los animales se sacrificaron 3 semanas después de iniciado el experimento y la pérdida ósea se evaluó en la zona vestibular y lingual de los primeros molares inferiores midiendo la distancia entre el límite amelo-cementario y la cresta alveolar en tres puntos: mesial, central y distal (técnica de Crawford). Resultados: a) todos los animales, independientemente del tratamiento, presentaron pérdida ósea por lingual y vestibular siendo mayor por lingual. A su vez en ambos sectores la pérdida fue mesial > central > distal ($p < 0.01$); b) la GSMx y la PE incrementaron estas pérdidas en todos los niveles en forma significativa ($p < 0.001$) c) al superponer ambos tratamientos la pérdida fue mayor ($p < 0.01$); c) la GSMx no indujo lesión de furcación y si la presentaron todos los molares con PE. Conclusión: estos resultados sugieren que en la rata adulta la glándula submandibular es necesaria para el mantenimiento de las corticales alveolares lingual y vestibular, fundamentalmente la primera probablemente a través de la secreción de factores tróficos como EGF, bFGF. La GSMx incrementaría la pérdida ósea inducida por PE pero no induciría lesión de furcación.

241. (12494) PRESENCIA DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA GLÁNDULA SUBMAXILAR. PRESTIFILIPPO, JP(1); FERNÁNDEZ-SOLARI, J(1); DE LA CAL, C(2); RETTORI, V(1); MCCANN, SM(1); ELVERDIN, JC(2)

(1)Centros de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET (PICT 03-14264), Facultad de Medicina, UBA.
(2) Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA

El mayor volumen de la saliva proviene de la glándula submaxilar (GSM), regulada por el SNA. Por otra parte se han descrito dos tipos de receptores cannabinoides (rCB), tipo 1 principalmente en SNC y 2 en periferia. Es bien conocido que el uso de marihuana disminuye la salivación y que los cannabinoides, interaccionan con los rCB. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de los rCB en la GSM por inmunohistoquímica y su rol en la salivación. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM, analizados por test-t Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Se determinó la presencia CB1 y CB2 por técnicas de inmunohistoquímicas en GSM de ratas Wistar macho adultas (300gr). Además se evaluó la colocalización entre actina y rCB. Se estudió el efecto del endocannabinoide, "anandamida" (AEA) inyectado intraglandularmente solo o junto a antagonistas de CB1 (AM251) y CB2 (AM630) sobre la secreción salival mediante curvas dosis respuesta a noradrenalina (NA 1, 3, 10y30ug/kg) y metacolina (MC 1, 3 y 10ug/kg). Los estudios inmunohistoquímicos mostraron la presencia tanto de CB1 como de CB2 en la GSM y se observó una colocalización de actina con el CB2. La inyección intraglandular de AEA ($6 \times 10^{-5}M$) inhibió la secreción salival estimulada por MC en todas las dosis, excepto en la menor (1ug/kg: 5.0 ± 1.4 a 2.0 ± 1.1 ; 3ug/kg: 15.8 ± 1.4 a $6.3 \pm 1.1^{**}$; 10ug/kg: 37.0 ± 2.2 a $18.3 \pm 0.8^{***}$). Resultados similares fueron observados con las diferentes dosis de NA (1ug/kg: 3.5 ± 0.7 a $0.4 \pm 0.2^{**}$; 3ug/kg: 7.0 ± 0.6 a $1.7 \pm 0.3^{***}$; 10ug/kg: 2.8 ± 0.3 a $11.0 \pm 0.9^{**}$; 30 ug/kg: 8.3 ± 2.0 a $42.8 \pm 4.3^{***}$). El efecto inhibitorio de AEA fue bloqueado cuando fue inyectado junto con AM251 (6×10^{-4}) o AM630 (6×10^{-4}). Se demostró la presencia tanto de CB1 como CB2 en la glándula submaxilar y se encontró una colocalización de los CB2 con actina de las células mioepiteliales. Además se demostró que AEA inhibe la secreción salival estimulada por metacolina y noradrenalina a través de receptores CB1 y CB2.

242. (12638) NEUTRALIZACIÓN DE LA ACCIÓN DE LA TOXINA SHIGA POR UN PÉPTIDO DE STX2B QUE NO TIENE EFECTO CITOTÓXICO PER SE. CASTRO-PARODI,

MAURICIO; LEVI, LORENA NATALIA; IBARRA, CRISTINA

Lab Fisiopatogenia, Depto Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

E.coli enterohemorrágicas (EHEC) productora de toxina Shiga (Stx) coloniza el colon humano y causa diarrea acuosa, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Recientemente se demostró que la subunidad B de Stx2 (Stx2B) altera la viabilidad, inhibe la síntesis de proteínas, produce apoptosis y disminuye la absorción de agua del epitelio intestinal. Nuestro objetivo es encontrar péptidos capaces de bloquear estos efectos para usarlos como nutraceúticos o como antifactores de virulencia que podrían reducir la acción de la toxina Shiga. Previamente clonamos y purificamos un péptido de una secuencia conservada de distintas variantes de la subunidad B de Stx2 (Stx2B cons) que mantiene la estructura pentamérica y los sitios de unión al receptor Gb3. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto citotóxico y la capacidad neutralizante de Stx2Bcons en epitelio intestinal de rata. Para ello se montó un sistema de cultivo de rata Sprague Dawley en una cámara de Ussing modificada y se registró la absorción neta de agua (Jw) en ausencia y presencia de 300 ng/ml de Stx2B agregada en el lado mucoso. La subunidad B inhibió el Jw en un 60 % ($n = 3$, $P < 0.05$) al cabo de 30 min de incubación. La preincubación del tejido durante 30 min con Stx2Bcons (300 ng/ml) no modificó el Jw y neutralizó la acción de Stx2B. Los resultados demuestran que el péptido en estudio no altera la funcionalidad del epitelio intestinal y es capaz de neutralizar la acción citotóxica de la toxina.

243. (12676) ESTADO TIROIDEO Y BALANCE DE MICRONUTRIENTES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS EN RELACIÓN A LA INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI (HP). KLECHA, ALICIA J (1); GOLDMAN, CINTHIA (1); JANJETIC, MARIANA (2); BALCARCE, NORMA (3); SALGUEIRO, JIMENA (1); ZUBILLAGA, MARCELA (1,2); BOCCIO, JOSÉ (2); BARRADO, ANDRÉS (2); GENARO, ANA M (1,4); CREMASCHI, GRACIELA (1,4)

(1) Laboratorio Radioisótopos, FFyB, UBA. (2) Laboratorio de Isótopos Estables, FFyB, UBA (3) Servicio de Gastroenterología, Hospital "Sor María Ludovica", La Plata, Buenos Aires (4) CEFYBO, CONICET

La infección por Hp, agente etiológico de gastritis crónica, úlcera péptica y factor de riesgo para cáncer gástrico, ha sido relacionada a alteraciones del metabolismo de micronutrientes siendo causa de anemia ferropénica. Además, se han asociado ciertas cepas de la bacteria, al desarrollo de tiroiditis autoinmune. En este trabajo se estudió en una población pediátrica con dolores abdominales recurrentes, la incidencia de infección (por test de ((13))C-UBT y PCR) y su posible relación con alteraciones del balance mineral y del estado tiroideo. Se analizó una muestra de 135 niños (edad 10.2 ± 3.0 años) atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital "Sor M Ludovica" (La Plata), de los cuales 77 fueron negativos (-) y 58 positivos (+) en el test de ((13))C-UBT. Los test + se correlacionaron con enfermedad gástrica y 16/21 de las biopsias disponibles fueron Hp+ por PCR, siendo el 62.5% + para el subtipo s1 de Vac A y 37.5% para el s2. Además el 56.3% de las biopsias dieron + para la expresión de CagA, característica de las cepas con alto potencial inflamatorio. Respecto al estado tiroideo y de micronutrientes se hallaron los siguientes valores séricos en pacientes - vs + respectivamente: T3 (ng/dl): 128.2 ± 25.3 vs 133.0 ± 19.4 ; T4 (ug/dl): 7.3 ± 1.6 vs 7.8 ± 1.6 ; TSH (uIU/ml): 2.7 ± 1.0 vs 2.6 ± 1.0 ; ferritina (ng/ml): 51.5 ± 17.1 vs 43.2 ± 26.0 ; Cu (ug/dl): 128.7 ± 32.0 vs 131.0 ± 27.3 ; Zn (ug/dl): 125.6 ± 27.1 vs 132.5 ± 18.6 ; sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos. Podemos concluir que en la población Hp+ en estudio no se ha encontrado una mayor incidencia de enfermedad tiroidea ni alteración de la absorción de micronutrientes. Estos resultados apoyarían aquellas evidencias que sugieren que tales manifestaciones podrían ser simplemente coincidentes sin estar relacionadas con la infección del Hp.

244. (12713) EFECTO DE LA DAPSONA (DDS) SOBRE LA INTEGRIDAD CELULAR DE HEPATOCITOS AISLADOS DE RATA: ACCIÓN ANTI Y PRO-OXIDANTE. VEGGI, LUIS; OCHOA, ELENA; ROMA, MARCELO; MOTTINO, ALDO

Instituto de Fisiología Experimental- Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (CONICET-UNR)

El fármaco DDS produce alteraciones hepáticas asociadas a estrés oxidativo cuando se administra subcrónicamente. Para evaluar su hepatotoxicidad aguda, estudiamos en hepatocitos aislados el efecto de DDS (2,5; 5; 10; 20 mM; 120 min) sobre la integridad celular, midiendo viabilidad celular (test de azul tripán) y liberación de LDH al medio, así como su capacidad para producir estrés oxidativo, determinando lipoperoxidación (especies reactivas de ácido tiobarbitúrico, TBARS) y en el medio extracelular glutatión total (GSht) y oxidado (GSSG, Método de Tietz). Los resultados se muestran como promedio \pm SD (* $p < 0.05$ por ANOVA). DDS disminuyó la viabilidad y aumentó la lisis celular de manera dosis dependiente. Este efecto no fue debido a estrés oxidativo, ya que la lipoperoxidación fue disminuida por DDS, aunque su efecto antioxidante decreció con la dosis. DDS estimuló la exportación de GSSG, ya que sus valores se mantuvieron iguales o incluso mayores al control, a pesar de un estrés oxidativo disminuido.

	CONTROL	DDS (2.5 mM)	DDS (5 mM)	DDS (10 mM)	DDS (20 mM)
Viabilidad (%)	77.9 \pm 3.3	73.0 \pm 0.4	73.9 \pm 4.6	69.2 \pm 2.3(*)	68.1 \pm 1.4(*)
Actividad LDH (U/L)	3.75 \pm 0.69	2.94 \pm 0.21	3.91 \pm 0.60	3.96 \pm 0.50	6.58 \pm 1.12(*)
TBARS (nmol/mg proteína)	0.93 \pm 0.35	0.18 \pm 0.12(*)	0.20 \pm 0.08(*)	0.29 \pm 0.07(*)	0.52 \pm 0.26
GSSG (μ M)	2.0 \pm 0.3	1.6 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3	2.7 \pm 0.5	4.5 \pm 1.7(*)
% GSSG/GSht	5.9 \pm 1.0	4.2 \pm 1.0	4.6 \pm 0.8	6.1 \pm 0.4	10.6 \pm 3.6(*)

Se concluye que DDS produce lisis hepatocelular por un mecanismo independiente de estrés oxidativo. El efecto antioxidante de DDS, evidente a bajas concentraciones, disminuye a concentraciones mayores, probablemente debido a la formación de su metabolito N-hidroxilado, de reconocido efecto pro-oxidante. La exportación de GSSG, depletando los niveles de GSht, contribuiría también al efecto pro-oxidante de DDS.

245. (12715) EL FACTOR NATRIURÉTICO DE TIPO C (CNP) ESTIMULA LA LIBERACIÓN DE AMILASA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR NPR-C EN ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS. SABBATINI, MARIA EUGENIA (1); DI CARLO, BEATRIZ (2); YAPUR, VIVIANA (2); VATTA, MARCELO (3); BIANCIOTTI, LILIANA (1)

(1) Cátedras de Fisiopatología, FFyB, UBA (2) Dpto Bioq Clínica, FFyB, UBA (3) Cátedra de Fisiología-IQUIMEFA-CONICET, FFyB, UBA

En trabajos anteriores demostramos que el CNP in vivo estimula de manera dosis dependiente la secreción pancreática exocrina y la excreción de proteínas en la rata a través del receptor NPR-C. En el presente trabajo se estudiaron los efectos del CNP en comparación con otros secretagogos como carbachol (CC) y colecistoquinina (CCK) sobre la liberación de amilasa pancreática y los mecanismos involucrados. Los estudios se realizaron en acinos pancreáticos aislados (Am J Physiol., 235:E517, 1978). Los resultados se expresaron como liberación fraccional de amilasa \pm SEM (*: $p < 0.05$ vs control (C)). La CCK incrementó la liberación de amilasa (C:4.60 \pm 0.35; CCK: 10 pM:5.33 \pm 0.47; 100 pM:11.48 \pm 1.34*; 1 nM: 8.9 \pm 1.09*) como así también el CC: (C:4.60 \pm 0.35; CC: 100 nM:5.7 \pm 0.41; 1 μ M:12.2 \pm 0.9*; 10 μ M: 11.7 \pm 1.06*; 100 μ M: 14.0 \pm 1.2*). El CNP estimuló asimismo la liberación de amilasa, observándose el máximo efecto a la dosis de 1 pM (C:4.60 \pm 0.35; CNP: 1 pM:13.1 \pm 1.2*; 100 pM:10.2 \pm 1.0*; 1 nM: 7.1 \pm 0.7*; 10 nM: 8.1 \pm 1.16*;100 nM: 7.0 \pm 0.6*). El agonista del receptor NPR-C, ANF-(4-23), también incrementó la excreción de amilasa (C:4.60 \pm 0.35; ANF-(4-23): 1 pM:9.06 \pm 0.6*; 100 pM:16.56 \pm 2.0*; 1 nM: 13.2 \pm 1.3*). Los resultados muestran que el CNP incrementa la liberación de amilasa en acinos pancreáticos

aislados, siendo su efecto similar al de los otros secretagogos pancreáticos estudiados. El efecto estimulador de CNP estaría mediado por receptores NPR-C, lo que sugiere una acción directa del péptido sobre las células acinares pancreáticas.

246. (12722) VÍAS INTRACELULARES QUE MEDIAN LOS EFECTOS DEL FACTOR NATRIURÉTICO ATRIAL (ANF) EN LA GLÁNDULA SUBMAXILAR (GS) DE RATA. SABBATINI, MARÍA EUGENIA; RODRÍGUEZ, MYRIAN; DAVIO, CARLOS (1); VATTA, MARCELO (2); BIANCIOTTI, LILIANA

Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA. (1) Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA (2) Cátedra de Fisiología-IQUIMEFA-CONICET, UBA

En trabajos anteriores demostramos que el ANF potencia la secreción salival inducida por agonistas sialogogos en GS y modifica el patrón de excreción de electrolitos. En el presente estudio se investigaron los receptores y vías intracelulares estimuladas por ANF 0.01, 1 y 100nM en cortes de GS de rata incubados in vitro. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. El ANF estimuló de manera dosis dependiente la hidrólisis de fosfoinosítidos (% vs control (C), *** $p < 0.001$ vs C): C:100 \pm 5%; ANF: 0.01nM:170 \pm 15%***; 1nM: 150 \pm 10%***; 100nM: 140 \pm 9%***, siendo el efecto mimetizado por dosis equimolares de ANF-(4-23) (agonista selectivo del receptor NPR-C). El efecto estimulador de ANF fue inhibido por U-73122 (U) (inhibidor de fosfolipasa C) C:100 \pm 5%; ANF: 0.01nM+U:105 \pm 12%; 1nM+U:102 \pm 14%; 100nM+U:99 \pm 12%. El ANF disminuyó los niveles de AMPc basales (pmol/mg, ** y *** $p < 0.01$ y 0.001 vs C): C: 23.3 \pm 2.8; ANF: 0.01nM: 9.20 \pm 0.8***; 1nM:11.35 \pm 1.68***; 100nM: 17.1 \pm 1.30**, pero no los estimulados por forskolina 20 μ M o isoproterenol 100nM. El efecto inhibitorio sobre los niveles de AMPc fue mimetizado por dosis equimolares de ANF-(4-23). Estos resultados sustentan que ANF modula la respuesta secretora de la GS a través de la estimulación de receptores NPR-C acoplados a la activación de fosfolipasa C e inhibición de adenilato ciclasa, vías intracelulares involucradas en la formación de la saliva.

247. (12740) LA ENDOTELINA-1 (ET-1) POTENCIA, A TRAVÉS DE RECEPTORES ETA, LA SECRECIÓN SALIVAL INDUCIDA POR AGONISTAS MUSCARÍNICOS Y ADRENÉRGICOS. VENTIMIGLIA, MARIA SILVIA; RODRIGUEZ, MYRIAN; SABBATINI, MARÍA EUGENIA; ELVERDÍN, JUAN CARLOS (1); VATTA, MARCELO (2); BIANCIOTTI, LILIANA

Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA. (1) Cátedra de Fisiología, Fac. Odontología, UBA (2) Cátedra de Fisiología-IQUIMEFA-CONICET, FFyB, UBA.

La ET-1 es un importante regulador de la función cardiovascular pero posee efectos a nivel de la función digestiva. En trabajos previos demostramos su papel modulador de la secreción biliar en la rata. En el presente trabajo se estudiaron los efectos de ET-1 sobre la secreción salival en rata. Se canularon los conductos excretorios de la glándula submaxilar y se recogieron muestras de saliva cada 3 min. Los resultados se expresan como μ l/3 min \pm SEM. Se realizaron curvas dosis respuesta a metacolina (MC) (1, 3, 10 y 30 μ g/kg) (1:3.9 \pm 0.3; 3:15.3 \pm 1.2; 10:32.5 \pm 1.8; 30:58.2 \pm 1.8) y a noradrenalina (NA) (3, 10 y 30 μ g/kg) (3:3.0 \pm 0.4; 10:27.5 \pm 2.7; 30:71.1 \pm 2.6) y las mismas en presencia de ET-1 (1nM) administrada intraglandularmente. Los resultados mostraron que ET-1 no induce secreción salival per se, pero potencia la secreción salival inducida por MC (* $p < 0.05$ vs MC): 1: 8.1 \pm 0.5*; 3: 21.8 \pm 1.7*; 10: 41.2 \pm 2.4*; 30:75.0 \pm 3.1* así como también por NA (* $p < 0.05$ vs NA): 3: 6.0 \pm 0.3*; 10: 40.2 \pm 3.2*; 30:94.0 \pm 3.9*. El efecto de ET-1 sobre la secreción salival inducida por MC y NA se inhibió en presencia de BQ-610 (BQ), antagonista selectivo del receptor ETA. (* $p < 0.05$ vs MC+ET-1) (MC+BQ: 1:3.5 \pm 0.3; 3:17.5 \pm 1.4; 10: 29.5 \pm 1.9; MC+BQ+ET-1: 1:4 \pm 0.3*; 3: 16.5 \pm 1.5*; 10:27.5 \pm 1.2*); (* $p < 0.05$ vs NA+ET-1) (NA+BQ: 3:6.5 \pm 0.4;

10:33.5±1.0; 30:72±3.6; NA+BQ+ET-1: 3: 6.7±0.3*; 10:34.0±1.5*; 30:67.0±1.1*). Los resultados muestran que la ET-1 no es un agonista sialogogo per se pero modula, a través de receptores ETA, la respuesta secretora inducida por agonistas muscarínicos y adrenérgicos en la glándula submaxilar de rata.

248. (12759) LA ENDOTELINA 3 (ET-3) INDUCE EFECTO COLERÉTICO EN LA RATA MEDIADO POR EL NERVI VAGO Y EL OXIDO NÍTRICO. RODRIGUEZ, MYRIAN ROXANA; SANTELLA, GISELA; VATTA, MARCELO (1); BIANCIOTTI, LILIANA

Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA. (1) Cátedra de Fisiología-IQUIMEFA-CONICET, FFyB, UBA.

La ET-3 administrada a nivel central ejerce efecto colerético o colestático en la rata dependiendo de la dosis administrada involucrando receptores y vías diferentes. En el presente trabajo estudiamos en ratas el efecto de ET-3 administrada por vía endovenosa para evaluar si tenía el mismo comportamiento. A los animales se les canuló el conducto hepático común para la recolección de muestras de bilis a distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 min) y la vena yugular para la infusión de salina (controles (C)) o de ET-3 (1,5 y 10 ng/kg/min). Los resultados se expresan como $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ peso corporal \pm SEM. La ET-3 estimuló la secreción biliar de manera dosis dependiente. Se muestra solo resultados de ET-3 5 ng/kg/min (* $p < 0.05$ vs C) (C vs ET-3): 30: 5.04 \pm 0.17 vs. 5.61 \pm 0.26*; 60: 4.79 \pm 0.32 vs 5.58 \pm 0.22*; 90: 4.67 \pm 0.29 vs 5.89 \pm 0.22*; 120: 4.58 \pm 0.32 vs 5.73 \pm 0.16*. El antagonista del receptor ETB (BQ-788) no afectó la secreción biliar pero inhibió el efecto estimulador de ET-3 (* $p < 0.05$ vs ET-3): 30: 4.01 \pm 0.54*; 60: 4.39 \pm 0.40*; 90: 4.69 \pm 0.43*; 120: 4.77 \pm 0.19*. La vagotomía troncular anuló el efecto colerético de ET-3 (* $p < 0.05$ vs ET-3): 30: 4.2±0.34*; 60: 4.00±0.39*; 90: 3.91±0.28*; 120: 3.99±0.47* así como también lo hizo el L-NAME (inhibidor de óxido nítrico sintasa) (* $p < 0.05$ vs ET-3): 30: 5.04 \pm 0.42*; 60: 4.87 \pm 0.25*; 90: 4.05 \pm 0.29*; 120: 3.9 \pm 0.34*. Los resultados muestran que la ET-3 administrada periféricamente induce efecto colerético en la rata a través de la activación de receptores ETB acoplados a la formación de óxido nítrico y estimulación vagal.

249. (12810) PREVENCIÓN DE LA FIBROGENESIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SPARC (SECRETED PROTEIN, ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE). MAZZOLINI, GUILLERMO; CAMINO, ALEJANDRA; PRADA, FEDERICO; PODHAJECER, OSVALDO; SALVATIERRA, EDGARDO; SILVA, MARCELO

Facultad de Ciencias Biomedicas. Universidad Austral. OP, FP y ES: Fundación Instituto Leloir

Antecedentes: SPARC (secreted protein acidic, and rich in cysteine) es una glicoproteína involucrada en numerosos procesos biológicos. Posee un papel destacado en la síntesis y remodelación de la matriz extracelular. SPARC aumenta significativamente en la fibrosis hepática. Objetivo: valorar los efectos de la administración de un adenovirus que expresa una secuencia antisentido para SPARC (AdasSPARC) en un modelo de fibrosis hepática en ratas. M&M: la inducción de fibrosis hepática se estableció en ratas Sprague-Dawley inyectando tioacetamida (TAA). Para inhibir la expresión de SPARC se empleó un adenovirus que expresa una secuencia antisentido para SPARC. Como vector control se empleó un adenovirus que expresa β -galactosidasa (Ad β gal). Grupos: TAA, ratas que solo recibieron TAA durante 6 semanas; Ad β gal: ratas que recibieron Ad β gal por vía i.v. al inicio de la inducción de la fibrosis y a día 7 por vía intrahepática. AdasSPARC: ratas que recibieron AdasSPARC siguiendo el mismo esquema. Los tres grupos recibieron TAA desde el día 0 hasta la 6ª semana. Control: los animales recibieron solución salina. A 6ª semana: valoración semicuantitativa de la fibrosis mediante score de Metavir; evaluación de la inflamación y necrosis hepática mediante índice de Knodell. El análisis morfométrico computarizado y el contenido hepático de hidroxiprolina se utilizaron para cuantificar el depósito tisular de matriz extracelular. Resultados: la TAA induce un aumento de la expresión de SPARC en tejido hepático. El porcentaje del área de fibrosis en el grupo AdasSPARC fue significativamente menor al resto ($p < 0.04$). Los animales del grupo AdasSPARC presentaron menos fibrosis, actividad necroinflamatoria (índice de Knodell) y contenido hepático de hidroxiprolina ($p < 0.05$). La transferencia génica de una secuencia antisentido para SPARC disminuye la intensidad de la fibrosis hepática y atenúa el proceso necroinflamatorio.

METABOLISMO Y NUTRICION A

250. (12079) PROTEINAS DESACOPLANTES (UCPS), ADIPOSIDAD Y RESISTENCIA INSULINICA (RI). CHICCO, A (1); ROSSI, A (1); LOMBARDO, YB (1); LACORTE, JM (2); ROUAULT, C (2); SLAMA, G (2); RIZKALLA, S (2)

(1) Dpto. Cs. Biol. UNLitoral. Santa Fe. Argentina. (2) INSERM U 505 y 465. Department of Diabetes, Hotel Dieu, Hospital, Paris, France.

Los ácidos grasos n-3 (PUFA) previenen y/o mejoran: obesidad, RI, dislipemia y alterados niveles de leptina y adiponectina inducidos por ingesta crónica de dieta rica en sacarosa (63% p/p: DRS). Las UCPs son importantes en el manejo de la termogénesis y la utilización de sustratos energéticos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar: 1- si la adiposidad y dislipemia podría afectar las expresión de las UCPs en tejidos adiposos blanco (TAB) y marrón (TAM) y en músculo gastrocnemio (MG), 2) Si la administración de n-3PUFA dietarios podrían regular la expresión de las UCPs. Estudios realizados: I) Prevención: ratas alimentadas con DRS (grasa: aceite de maíz -AM- 8%) y ratas alimentadas con DRS donde el AM se sustituyó por 7% aceite de pescado + 1% AM (DRS+AHB), durante 22 días. II) Mejoramiento: ratas alimentadas con DRS por 180 días y posteriormente divididas en dos grupos: uno continuó con la DRS y el otro con DRS+AHB, ambos hasta los 240 días de ingesta. En paralelo se alimentaron ratas con dieta control (almidón 63% p/p) por ambos períodos de ingesta (DC). En cada lote se analizó: a) Plasma: glucosa, insulina, triglicéridos (Tg), AGNE, leptina y adiponectina, b) Expresión de las UCPs en TAB y TAM y MG. Resultados: En el estudio de prevención y mejoramiento se observó una normalización de Tg y AGNE, leptina y adiponectina plasmáticos, y de la sensibilidad insulínica periférica en presencia de n-3PUFA. En ambos períodos de dieta se observa una mayor expresión ($p < 0.01$) de la UCP2 en TAB y un moderado incremento en la expresión de la UCP1 en TAM sin cambios en las otras UCP estudiadas. La administración de n-3 PUFA previene y mejora la expresión de las UCPs en TAB mientras induce un significativo incremento en la expresión de UCPs en TAM y MG. Los resultados sugieren que las UCPs estarían involucradas en el desarrollo de la adiposidad y la RI y que el tipo de ácidos grasos dietarios parecen jugar un rol tejido-específico en la regulación de las UCPs.

251. (12093) EFECTOS DE L-TIROXINA SOBRE MARCADORES DE ADIPOGENESIS EN UN MODELO DE TUMORES EN GLÁNDULA MAMARIA DE RATAS. ALVAREZ, CECIL; *EZQUER, MARCELO; *JAHN, GRACIELA; VARAS, SILVIA

*Área de Química Biológica. Dpto de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNSL. * IMBECU- CONICET-Mendoza*

El excesivo aumento tejido adiposo es un factor asociado al incremento de la incidencia de cáncer mamario. Factores secretados por adipocitos (adipoquinas) inducen distintos programas transcripcionales involucradas en la promoción de la tumorigénesis (lyengar y col. (2003). En trabajos previos hemos demostrado que el HT produce alteración en la expresión de marcadores de diferenciación de adipocitos en glándula mamaria de ratas lactantes (Ceci, ML y col., 2004). El objetivo de este trabajo es analizar los

efectos de las hormonas tiroideas sobre marcadores de diferenciación de adipocitos en un modelo experimental de carcinogénesis por DMBA en glándula mamaria. Ratas hembras vírgenes de 55 días de edad de la cepa OFA (hr/hr) recibieron una única dosis de 15 mg de 7,12 dimetilbenzotraceno (DMBA) vig. Los animales se dividieron en dos lotes: uno control (Co) tomaron solo agua y el otro HT recibieron L-Tiroxina en el agua de bebida (5 mg/L). Los animales se sacrificaron luego de 9 semanas. Se examinaron las glándulas mamarias (GM-T) y los tumores de ratas que habían (T) y no desarrollado el tumor (NT). Se midieron los niveles de RNA por RT-PCR de los siguientes genes Acetil CoA Carboxilasa (ACC), SRBP1c, aP2, PPARgamma, ADRP y PQC (alfa) x BCL2/ BAD como índice anti-apoptótico. Los valores fueron normalizados en relación al gen control β -actina y son expresados como la media \pm SEM. La administración de DMBA produjo a las 9 semanas un desarrollo de tumores en el 21% de los animales HT comparados con el 71% de los Co. En los animales HT respecto a los Co se observó: en los T una disminución de expresión de PPAR y aP2 (1.18 ± 0.09 vs 0.87 ± 0.04 y 0.74 ± 0.01 vs 0.37 ± 0.02); en los NT una disminución de PPAR y SREBP1c (1.2 ± 0.03 vs 1.07 ± 0.02 y 0.65 ± 0.05 vs 0.5 ± 0.02). El HT produce una expresión diferencial de genes que actúan como moduladores en el metabolismo de los lípidos.

252. (12115) EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS N-3 DE ORIGEN VEGETAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DISLIPEMIA Y RESISTENCIA INSULÍNICA (RI). D'ALESSANDRO, ME; CHICCO, A; FORTINO, A; LOMBARDO, YB

Dpto. Cs. Biológicas. Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas. U.N. del Litoral

Ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan hiperglucemia, RI y dislipidemia. En este modelo la administración de ácidos grasos n-3 (origen marino) normaliza los parámetros mencionados. Las semillas del vegetal *Salvia hispánica* L.var. *alba* (*Salba*) contiene una de las mayores fuentes de ácidos grasos n-3 (linolénico 19% p/p), además de ser rica en fibras y proteínas. Objetivo: analizar en este modelo experimental si un cambio parcial isocalórico en la composición de la grasa de la dieta -semillas de *Salba* por aceite de maíz (AM)- pueden prevenir (ingesta de 3 semanas) o mejorar (5 meses) las alteraciones inducidas por una DRS. Ratas macho Wistar fueron divididas al azar en 5 lotes. Prevención: Lote1:DRS (sacarosa 61%, AM 12%, proteínas 19%). Lote 2:Idem a Lote 1 pero la fuente grasa fue: AM1%+*Salba* 11%). Mejoramiento: Lote 3:Idem a Lote 1. Lote 4: Idem a Lote 3 pero a partir de los 3 meses de dieta la fuente grasa fue AM1%+ *Salba* 11%). Lote 5 (control) Idem a Lote 1 donde almidón reemplaza a sacarosa, la mitad de este lote fueron sacrificados a las 3 semanas y el resto a los 5 meses. Determinaciones: Plasma: Glucosa, insulina, AGNE, colesterol (Ct), triglicéridos (Tg). Hígado y gastrocnemio: Tg. Resultados: Prevención: La ingesta de *Salba* previene significativamente ($p < 0.05$) el incremento de Tg, Ct, AGNE y Tg hepáticos inducido por la DRS. No altera los niveles de glucosa e insulina. Mejoramiento: La sustitución parcial de AM por *Salba* durante 2 meses disminuye significativamente ($p < 0.05$) los niveles plasmáticos de Glucosa, Tg, AGNE y Ct, alcanzando valores semejantes al Lote control. No modifica los niveles de insulina y decrece significativamente ($p < 0.05$) el contenido de Tg hepático y muscular. Estos resultados sugieren que los ácidos grasos n-3 de origen vegetal presente en la semilla de *Salba* probablemente junto con su contenido en fibras podrían ejercer un efecto beneficioso en la dislipidemia y anormal homeostasis de la glucosa en este modelo experimental.

253. (12123) LOCALIZACIÓN DE LA HEMO OXIGENASA I EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS: MODULACIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE HEMO Y EL METABOLISMO MITOCONDRIAL. CONVERSO, DANIELA PAOLA; TAILLÉ (2),

CAMILLE; CARRERAS (1), M. CECILIA; BOCZKOWSKI (2), JORGE; PODEROSO (1), JUAN J.

Laboratorio Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires, ARGENTINA. INSERM-U700 y IFR 02, Faculté X. Bichat, Paris, FRANCIA.

La hemo oxigenasa (HO) participa en la degradación del grupo hemo a CO₂, hierro y bilirrubina y presenta dos isoformas: inducible (I) y constitutiva (II) con localización microsomal. En los últimos años, se describió el efecto del óxido nítrico (NO) en la activación de la HO-I, y cómo ésta puede modular negativamente la producción de NO, pero no se ha establecido aún una relación entre la HO-I y la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS). El objetivo de este trabajo fue analizar si HO-1 es translocada a mitocondrias, y si tiene posibles efectos sobre el metabolismo oxidativo. Se utilizó hígado de rata. Se purificaron mitocondrias, citosol y microsomas. Se determinaron: actividad y expresión de HO, biliverdina reductasa (BvR), NOS y citocromo oxidasa (COX) en presencia de hemo (H, inductor de HO) o de protoporfirina IX (SnPP IX, inhibidor de HO). Se determinó el consumo de oxígeno mitocondrial, la producción de peróxido de hidrógeno y el contenido de hemo. Se observó que en presencia de H, aumenta la expresión (3.5 y 7 veces) y la actividad (5 y 3 veces) de la HO-I (diferencia sig., $p < 0.05$) en microsomas y mitocondrias, respectivamente. La expresión de HO-I en la mitocondria se asoció a la disminución del 50% en el contenido de hemo mitocondrial y a una reducción en la expresión de la subunidad I de la COX, produciendo modificaciones en el espectro de absorción y en la actividad (de 0.45 ± 0.02 a 0.35 ± 0.02 nmoles/mg prot, $p < 0.05$) de esta enzima. Asimismo, se observó que la HO regula negativamente la expresión (-40%) y actividad (-43%) de la mtNOS; el tratamiento con SnPP revirtió estos fenómenos. En conclusión, se demuestra la localización mitocondrial de HO-1; esta enzima puede tener un importante papel biológico en la regulación de la producción de hemoproteínas mitocondriales, y probablemente, participa en la protección de enfermedades en las que aumentan substancialmente la producción de NO y de oxidantes.

254. (12192) IMPACTO DEL DESEQUILIBRIO NUTRICIONAL SOBRE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS T EN VELLOSIDAD INTESTINAL E IGA EN FLUIDOS INTESTINALES EN MODELO EXPERIMENTAL. ESTUDIO PRELIMINAR. VIDUEIROS, SM*; MONTERO, V; ROUX, ME**; FERNANDEZ, I*; PALLARO, A*

*Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina. *Cátedra de Nutrición. **Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina. simavidu@ffyb.uba.ar. *Financiado por UBACYT B120 y PIP02855*

En estudios previos de nuestro grupo se observó disminución en las poblaciones de linfocitos B IgA+ y T totales CD5+ en la vellosidad intestinal de ratas alimentadas con dieta a base de proteína de maíz. Objetivo: 1) estudiar subpoblaciones linfocitarias T (sLT) en la vellosidad intestinal y 2) determinar niveles de IgA en fluidos intestinales. Ratas Wistar fueron alimentadas desde el destete y durante 18 días con dieta al 6.5% de proteína de maíz (M). Un grupo control de igual edad recibió dieta stock (C). Los intestinos fueron removidos y procesados por la técnica de Saint Marie y las sLT TCRa β +, TCRgd+, CD8aa+, CD8a β + y CD4+ en lámina propia (LP) e intraepitelio (LIEi) se caracterizaron por IFI. Se leyó el N° linfocitos en 30 campos. Los fluidos intestinales se recogieron con 3.5 ml de solución fisiológica con inhibidores de proteasas. Los niveles de IgA se determinaron por ELISA. Resultados M vs C ($X \pm SD$, n=6/grupo): Los niveles de IgA total (mg/ml) de M en los fluidos intestinales tendieron a valores menores respecto de C (0.12 ± 0.05 vs 0.33 ± 0.26). Se observó disminución estadísticamente significativa en las sLT tanto en LP como LIEi: 1) TCRa β + LP: 35.73 ± 7.55 vs 106.67 ± 37.48 ; $p < 0.0001$ 2) TCRa β + LIEi: 1.64 ± 1.43 vs 3.33 ± 2.31 ; $p < 0.05$ 3) TCRgd+ LP: 49.73 ± 15.15 vs 100.85 ± 17.78 ; $p < 0.0001$ 4) TCRgd+ LIEi: 2.82 ± 1.25 vs

5.38±3.82; p<0.05 5) TCD4+ LP: 59.53±20.37 vs 97.38±19.28; p<0.0001 6) TCD4+ LIEI: 0.53±1.06 vs 1.69±1.9; p<0.05 7) TCD8aa+ LP: 46.88±13.84 vs 110.07±25.1; p<0.0001 8) TCD8aa+ LIEI: 0.44±0.63 vs 2.79±2.2; p<0.002 9) TCD8aβ+ LP: 52.64±17.6 vs 131.67±20.76; p<0.0001 10) TCD8aβ+ LIEI: 0.43±0.65 vs 2.00±2.04; p<0.03. Los resultados indicarían que los niveles de IgA en el fluido intestinal podrían verse afectados por el desequilibrio nutricional provocado por la dieta a base de harina de maíz. Esto se relacionaría con el deterioro en las subpoblaciones linfocitarias T y en las poblaciones linfocitarias B IgA+, previamente demostrado.

255. (12254) FRACCIONES PLASMÁTICAS ESPECÍFICAS EN PACIENTES ADULTOS HIV+/SIDA. FELIU, MARIA SUSANA; STAMBULLIAN, MARCELA (1)(2); BOLOGNA, ROSA(2); CASSETTI, ISABEL(2); SLOBODIANIK, NORA

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (1) Becaria UBA, (2) Helios Salud Financiado por UBA (B-060)

Las proteínas plasmáticas son de potencial utilidad en los estudios de nutrición. Se analiza la concentración de fracciones proteicas en adultos HIV+/SIDA. Se estudiaron 21 pacientes HIV+ y 24 SIDA (26 - 44 años de edad), con tratamiento antirretroviral de alta eficacia. Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas y sobre el plasma se determinó la concentración de fracciones plasmáticas específicas (mg/dL) de: 1) potencial utilidad en estudios de nutrición: Transtirretina (TTR), Apolipoproteína B (ApoB) y Fibrinógeno; 2) fase aguda: Ceruloplasmina, Haptoglobina y Proteína C Reactiva (PCR). Se determinaron por inmunodifusión radial cuantitativa sobre placas (Diffuplate, Biocientífica SA. y The Binding Site Limited, UK). Los resultados (mg/dL) expresados en X±DE se presentan en la tabla (*p<0.001).

Grupo	TTR	ApoB	Fibrinogeno	Ceruloplasmina	Haptoglobina	PCR
HIV+	34.1±8.9	163.9±51.1	387.7±119.3	65.6±18.9	119.2±58.3	0.33±0.29
SIDA	29.5±8.9	182.5±41.1	469.6±149.3	70.8±14.8	134.4±88.7	0.64±0.94
HIV+/SIDA	31.9±9.1	173.8±46.5*	432.4±141.1*	68.3±16.9*	127.0±74.9*	0.50±0.73
Referencia	33.7± 9.2	105.0±29.0	287.5±91.4	44.0±8.0	123.0±52.0	<0.5

No se observan diferencias significativas, entre HIV+ y SIDA, en las fracciones estudiadas. Al agrupar los pacientes y comparar los valores con los de referencia, se observa que sólo la TTR no presenta diferencia significativa; el resto de las fracciones muestra aumento estadísticamente significativo. El aumento en las fracciones de fase aguda es compatible con el proceso infeccioso. Es interesante señalar que el 16% de la población global presenta niveles de TTR inferiores a 20 mg/dL, valor relacionado con malnutrición proteica. El aumento en la concentración de ApoB y fibrinógeno estaría relacionado con la distorsión en el perfil lipídico y conduciría a un mayor riesgo cardiovascular.

256. (12376) METABOLISMO DEL HEMO DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIPERTENSION INDUCIDA POR LA INHIBICION DE OXIDO NITRICO. CABALLERO, FABIANA; GUOLO, MARCELO; BATLLE, ALCIRA

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), Hospital de Clínicas, CONICET - UBA

El grupo prostético hemo es sustrato de muchas proteínas, como la hemoglobina y las hemoenzimas óxido nítrico sintetasa, guanilato ciclasa soluble y hemo oxigenasa (HO). La HO es responsable de la degradación del hemo en cantidades equimolares de biliverdina, hierro y monóxido de carbono, este último participa en la regulación de las funciones cardiovasculares incluida la hipertensión (HT). La actividad de HO se asocia con etapas diferentes del desarrollo de la HT en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Hemos observado que en SHR jóvenes ocurre una correlación negativa entre las enzimas regulatorias de la síntesis (5-aminolevulínico sintetasa, ALA-S) y el catabolismo (HO) del hemo, en cambio en SHR adultas esta reacción compensatoria está normalizada. Con el fin de investigar si dichas anomalías

des se deben al desarrollo de la HT, estudiamos las actividades de las enzimas hepáticas ALA-S, HO, 5-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) y deaminasa (DEAM) durante la HT inducida por la administración crónica de N-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME). Se trataron ratas Wistar (100-150g) con L-NAME (50 mg/kg/día) en el agua de bebida durante un período de 8 semanas. En la primer semana de tratamiento la actividad de ALA-S se incrementó un 50% (V[N/1]=0,112±0,019U/mg), mientras que las de HO y ALA-D disminuyeron un 45% (V[N/1]=0,584±0,027U/mg) y 30% (V[N/1]=18,6±4,4U/mg), respectivamente. En la segunda semana ALA-S y HO recuperaron los niveles basales mientras que el ALA-D los recuperó en la tercer semana. Al final del tratamiento (semana 8), la actividad del ALA-S se incrementó un 25% (V[N/8]=0,114±0,015U/mg) y la de HO decayó un 35% (V[N/8]=0,662±0,031U/mg). La actividad de DEAM estuvo dentro de los valores normales a lo largo de todo el tratamiento (V[N/1-8]=12,5±2,5U/mg). Las alteraciones observadas en el metabolismo del hemo se deberían a mecanismos involucrados en el desarrollo de la HT, durante la cual las distintas respuestas de la actividad de HO garantizarían un importante rol a favor de la homeostasis celular.

257. (12433) COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y SENSIBILIDAD A LA PEROXIDACION LIPIDICA EN MICROSOMAS DE HIGADO, CORAZON Y CEREBRO DE LONCHURA STRIATA. GUTIÉRREZ, ANA MARÍA (1,2); REBOREDO, GUILLERMO R. (1,2); MOSCA, SUSANA M. (1); CATALÁ, ANGEL (3)

Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. (2) Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, (3) INIFTA-CONICET, CIC, UNLP

Las aves poseen mayor longevidad y consumo de oxígeno que los mamíferos con similares tasas metabólicas, no obstante producen radicales de oxígeno a un valor mucho más bajo que las mitocondrias de hígado de rata. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el perfil de ácidos grasos y la sensibilidad a la peroxidación lipídica en microsomas de hígado, corazón y cerebro en un ave con alta tasa metabólica como es el manón de rabadilla blanca (*Lonchura striata*). Los microsomas fueron obtenidos por filtración en Sepaharose 4B de sobrenadante posmitocondrial de los diferentes tejidos e incubados en un sistema ascorbato-Fe²⁺ in vitro, midiendo quimioluminiscencia y composición de ácidos grasos. El contenido de los ácidos grasos no saturados fue de 50% en los microsomas de hígado y de 30% en microsomas de corazón y cerebro, con predominio del C18:1n9 (25%) en los órganos estudiados. El contenido de polinosaturados fue de 18%, 5% y 10%, en microsomas de hígado, corazón y cerebro, respectivamente. El índice de no saturación (UI) fue 2 y 1,5 veces mayor en los microsomas de hígado que en corazón y cerebro. Los microsomas de hígado fueron los más afectados por el proceso de peroxidación lipídica, con disminución de aproximadamente 70% de los ácidos araquidónico y docosahexaenoico. Los microsomas de corazón y cerebro no fueron sensibles a la lipoperoxidación, no observándose cambios en la composición de los ácidos grasos. Estos resultados muestran que la presencia de niveles elevados de ácidos grasos no saturados en los microsomas de hígado serían los responsables de una mayor sensibilidad a la peroxidación lipídica. La disminución del grado de no saturación observada en microsomas de corazón y cerebro podría proteger a estos órganos contra el daño oxidativo.

258. (12478) ISÓMEROS DEL ACIDO LINOLEICO CONJUGADO: SU ACCIÓN SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN. PALACIOS, ALEJANDRO; LEADEN, PATRICIO JOSÉ; PIERGIACOMI, VIVIANA ANGÉLICA

Cát. de Bioquímica.Fac. de Cs Veterinarias, UNLP

El Acido Linoleico Conjugado (ALC) está formado por varios tipos de ácidos grasos, muchos de los cuales difieren en su rol

fisiológico. La mayoría de los efectos fisiológicos del ALCson producidos por mezclas de isómeros que contienen principalmente cis-9, trans-11 y trans-10, cis-12. Se ha demostrado que los mismos tienen diferentes efectos: cambios de la composición corporal en ratón, tales como reducción de grasa, aumento de agua y de proteína corporal fueron asociados a la alimentación con isómeros trans10-cis12. En células adiposas este mismo isómero reduce la actividad de la lipoproteína lipasa, y la concentración de triacilgliceroles y glicerol. En contraste el isómero cis-9-trans11 no afecta estas actividades bioquímicas. En este trabajo se analizó el efecto antioxidante de dos isómeros del ALC: c9-t11 y t10-c12 sobre la lipoperoxidación de microsomas de hígado de rata, se trabajó con tres lotes de ratas Wistar AH/HOK de 7 semanas de vida: dos grupos recibieron vía oral durante 10 días, una dosis diaria de 30 mg de ALC c9-t11, y ALC t10-c12 respectivamente, se utilizó un tercer grupo control. La peroxidación se realizó en un sistema in vitro no enzimático, su cuantificación se realizó midiendo quimioluminiscencia (QI) durante 180 minutos. Analizando QI se observó que la emisión lumínica de la organela tratada con los isómeros del ALC fue más baja cuando se comparó con el grupo control, y que el isómero C9-t11 presentó valores más bajos de quimioluminiscencia respecto al isómero t10-c12. Estudiando la composición de ácidos grasos nativos vs peroxidados, se observó disminución de los porcentajes de C18:2n-6, C18:3n-3 y C20:4n-6 en grupo de animales control, en los grupos ALC c9-t11 y t10-c12 solo disminuyó C20:4n-6. El análisis de los resultados parciales expuestos permite concluir que la peroxidación lipídica fue menor en microsomas de ratas que recibieron las dosis de isómeros del ALC respecto al grupo control y que el efecto fue mayor en el caso del isómero c9-t11 respecto al isómero t10-c12.

259. (12698) EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE SEMILLAS O ACEITE DE CHÍA SOBRE EL PERFIL DE LÍPIDOS SÉRICOS. FERNANDEZ, I*; AYERZA (H), R**; COATES, W**; VIDUEIROS, SM*; SLOBODIANIK, NH*; PALLARO, AN*

*Cátedra Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Argentina. *Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Argentina. **Office Of Arid Lands Studies. The University Of Arizona, Tucson, Arizona. USA.*

Las propiedades nutricionales de la chía (ácidos grasos omega-3, fibra y antioxidantes) hicieron de ella un alimento básico en las dietas de las civilizaciones de América Central. Considerando el rol hipolipemiente atribuido a los ácidos grasos omega-3 en este trabajo se estudia el efecto de administrar semillas o aceite de chía sobre el perfil de lípidos séricos de ratas. Ratas Wistar reciben al destete y durante 30 días: a) Grupo C dieta de caseína al 20% de proteína; b) Grupo Chía -CH- dieta con 15% de semillas enteras de Chía completando con caseína para llegar al 20% de proteína; c) Grupo Chía aceite -A- dieta preparada con aceite de chía en una cantidad igual a la aportada por el 15% de las semillas de chía y al 20% de proteína usando caseína. Al finalizar el experimento se extrae sangre midiéndose en suero: Colesterol total (CHO), Triglicéridos (TG), HDL y LDL colesterol y la relación CHO:HDL. Se realiza test de Anova-Mínima Diferencia Significativa-considerando las diferencias de $p < 0.05$. El CHO está significativamente disminuido en CH con respecto a C (95.88 vs 108.11, MDS[0.05]: 7.77). Los TG están significativamente disminuidos en ambos grupos experimentales (CH:69.67, A:82.50, C:206.83, MDS[0.05]: 27.08). La fracción HDL está significativamente aumentada en CH y A (CH:31.92, A:39.56, C:26.19, MDS[0.05]: 4.16). Los valores de LDL no presentan diferencias. La relación CHO:HDL es significativamente menor para CH y A con respecto a C (CH:3.03, A:2.67, C:4.17, MDS[0.05]: 0.37). La complementación de la dieta habitual con chía, en sus distintas formas, provocaría un efecto hipolipemiente, que podría deberse al contenido de ácidos grasos de la familia omega 3.

Financiado UBA-B120, Laboratorios Dr. Madaus y Cia. S.A., Functional Products S.A.

260. (12788) UTILIDAD DE LOS NUEVOS VALORES DE REFERENCIA OBTENIDOS EN UNA POBLACIÓN DE NIÑOS DE COMODORO RIVADAVIA PARA EVALUAR ALTERACIONES DEL CRECIMIENTO. PONCE, GRACIELA MABEL; FAJARDO, MARÍA (1); SOMOZA, JULIA (2); ZENI, SUSANA (3); RODRÍGUEZ, PATRICIA (3); FRIEDMAN, SILVIA (3)

(1) Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico-Tecnológico (CRIDECIT). UNPSJB. 2 Hospital de Clínicas- Fac. Medicina- UBA 3 Cátedra de Bioquímica General y Bucal, FOUBA

Resulta indispensable contar con valores de referencia nacionales para evaluar alteraciones del crecimiento en niños en Argentina. El propósito de este trabajo fue obtener valores de % de grasa corporal, fosfatasa alcalina total y ósea (FAT y FAO) e IGF-I agrupados por edad en niños con indicadores antropométricos adecuados (OMS 2001), que concurren a un centro de promoción barrial de Comodoro Rivadavia (Chubut). Los mismos se utilizaron para evaluar niños con ZTE < -2 . Se estudiaron transversalmente 44 niños (23 varones y 21 niñas), clínicamente sanos, amamantados (mínimo tres meses) y se registró la estatura de los padres. El crecimiento corporal expresado como puntaje Z de peso y talla para la edad (ZPE y ZTE, respectivamente) y peso para la talla (ZPT), los ubicaron dentro de los puntos de corte de normalidad ± 2 DE. Se midió la composición corporal por bioimpedancia (Maltron BF-900). Se extrajo sangre para la determinación de FAT y FAO (método colorimétrico) e IGF-I (ELISA, DSL). Los resultados se expresaron como media \pm DE:

Edad	2-4 años	5-6 años	7-8 años
Grasa corporal %	16.17 \pm 6.01	15.24 \pm 4.42	17.41 \pm 7.24
FAT (U/l)	492.3 \pm 193.8	473.9 \pm 174.5	524.8 \pm 136.9
FAO (U/l)	235.3 \pm 96.2	253.5 \pm 102.6	280.8 \pm 96.3
IGF-I (ng/ml)	146.1 \pm 125.3	143.1 \pm 85.7	212.4 \pm 135.3

Un 4% de niños presentó bajo ZTE (-2.03 \pm 0.17) y ZPE (-2.20 \pm 0.36) pero ZPT (-1.41 \pm 0.58) y grasa % (13.67 \pm 6.61), FAO (154.5 \pm 123.0 U/l) e IGF-I (78.0 \pm 51.9 ng/ml), mostraron DS en FAO e IGF-I ($p = 0.02$ y $p = 0.06$, respectivamente). Estos valores de referencia, de niños entre 2 y 8 años de edad, Tanner I, podrían ser utilizados para evaluar alteraciones del crecimiento.

METABOLISMO Y NUTRICION B

261. (12485) EVOLUCIÓN DEL PATRÓN DE ACTIVIDAD NORADRENÉRGICA HIPOTALÁMICA POST-REALIMENTACIÓN DE RATAS CON DESNUTRICIÓN ARMÓNICA. COMPAGNUCCI, CV(1); COMPAGNUCCI, GE(1); ROIG, MC(1); HOPE, SI(2); MORGAZO, C(2); BIANCIOTTI, L(3); ELVERDIN, JC(1); VATTA, MS(2); BOYER, PM(1)

Cátedra de Fisiología, FOUBA. (1) Cátedra de Fisiología, FOUBA. Cátedras de (2) Fisiología y (3) Fisiopatología (IQUIMEFA-CONICET), FFyB, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Existe evidencia de que la desnutrición pre y postnatal incrementa la actividad del sistema catecolaminérgico central, la cual puede permanecer aumentada aún luego de un período prolongado de recuperación nutricional. En estudios previos observamos un desbalance de la actividad noradrenérgica en el hipotálamo anterior en un modelo animal de desnutrición armónica (ED), el cual podría ser responsable, en parte, del retraso puberal del ED. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el grado de normalización de la actividad noradrenérgica en hipotálamo de ratas macho ED durante 4 (T8) y 8 (T12) semanas de realimentación. Ratas macho Wistar al destete se dividieron en 2 grupos: Control (C) y ED (18 animales/grupo). C recibió una dieta equilibrada ad libitum. ED recibió un 80% de la dieta consumida por C el día previo, durante 4 semanas (T4). Luego los

ED fueron realimentados hasta alcanzar la talla de C. Resultados: 1) A T4, la reducción del peso y de la longitud corporales fue de 60% y de 25%, respectivamente ($p < 0,001$). ED cursó entre las categorías antropométricas de adecuado y de delgado durante la fase de depleción nutricional; 2) A T4, la captación y liberación neuronal de ((3)H-NA) y la actividad de TH de ED vs C fueron: hipotálamo anterior (HA) $79,05 \pm 3,56\%$, $67,00 \pm 10,00\%$ y $164,26 \pm 16,58\%$ ($p < 0,05$), respectivamente; hipotálamo medio $78,38 \pm 7,13\%$ ($p < 0,05$), $114,00 \pm 9,00\%$ ($p > 0,05$), $114,00 \pm 5,86\%$ ($p > 0,05$), respectivamente; e hipotálamo posterior (HP) $80,65 \pm 5,92\%$ ($p < 0,05$), $147,00 \pm 11,00\%$ ($p < 0,01$), $152,42 \pm 19,30\%$ ($p < 0,05$), respectivamente. Todos los parámetros se normalizaron a T12. Los resultados obtenidos evidencian una disminución de la actividad del centro simpatoinhibidor localizado en HA, y un incremento de la actividad del centro simpatoestimulador ubicado en HP en el modelo animal de ED. El sistema noradrenérgico central adquiere el patrón de actividad del adulto normal post-realimentación.

262. (12528) INTERLEUQUINA-6 EN PACIENTES CRÍTICOS CON NUTRICIÓN PARENTERAL TOTAL: SU RELACIÓN CON EL ZINC DE LAS FÓRMULAS Y CON ZINC PLASMÁTICO Y ERITROCITARIO. ZENI, SUSANA N (1); MENENDEZ, ANA MARIA (2); MONTEMERLO, HUGO (2); WEISSTAUB, ADRIANA (1); GUIDONI, MARIA ELISA (2); DE PORTELA, MARIA LUZ (1)

Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA (2) Centro de Mezclas Intravenosas, UNANUT. Bs. As. Argentina

La Interleuquina 6 (IL-6), es una citoquina liberada como respuesta a la fase aguda de procesos inflamatorios. Se ha postulado que el Zinc juega un rol importante en su producción. El exceso de Zinc puede exacerbar la fase aguda del proceso inflamatorio, por lo cual se aconseja que su aporte, en los pacientes que reciben Nutrición Parenteral Total (NPT), oscile entre 1.5 y 5 mg/día. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta de la IL-6 sérica en relación a los niveles de Zinc en plasma y eritrocitos. Se estudiaron 10 pacientes adultos, durante 10-14 días, luego de una cirugía abdominal mayor (pancreatitis aguda, cáncer de páncreas o fístula intestinal). Al inicio de la NPT (To) y a su finalización (Tf) se determinó: IL-6, por ELISA (EASIAM, BioSource International, USA); Zn (Espectrometría de Absorción Atómica) en plasma (ZnPI), en eritrocitos (ZnE) y en las NPT. El aporte de Zn por la NPT fue de 6.9 ± 1.7 (mg/día) (rango 4.8 a 10.8). Los resultados (promedio \pm desvío estándar y rangos) fueron: To: ZnE ($\mu\text{g/ml}$): 16 ± 6 (7-27); ZnPI ($\mu\text{g/dl}$) 118 ± 59 (35-226); A Tf: ZnE ($\mu\text{g/ml}$): 16 ± 6 (7-27); ZnPI ($\mu\text{g/dl}$) 122 ± 57 (39-225). La IL-6 (pg/mL) disminuyó desde To a Tf: 134 ± 98 (48-465) vs 101 ± 30 (49-150). Sólo se observó correlación entre la variación de IL-6 y la de ZnE ($r = 0.50$; $p = 0.05$). Estos resultados evidencian que, en los pacientes estudiados, no se produjo un incremento indeseable de la respuesta de la IL-6, pese a que recibieron entre el máximo y el doble de la cantidad de Zn aconsejada para las NPT. Financiado por SubCyT, UBA, B 103.

263. (12565) DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN UN MODELO DE OBESIDAD. BARREYRO, FJ; FINOCCHIETTO, PV; PODEROSO, JJ

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires

La obesidad presenta una prevalencia creciente, sin embargo la causa primaria de este trastorno se desconoce. Ha sido descrito un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), descenso de enzimas antioxidantes y disfunción mitocondrial en tejidos insulino sensibles en la obesidad. En la mitocondria la Óxido Nítrico Sintasa (mtNOS) sintetiza óxido nítrico (NO) modulando la transferencia de electrones, el estado redox de los componentes de la cadena respiratoria (CRM), la producción de ROS y la captación de O₂. Objetivo: estudiar la actividad de mtNOS y de los Complejos (C) de la CRM en tejidos insulino sensibles:

hígado (L), músculo esquelético (M) y tejido adiposo blanco (WAT) en ratones Ob^{-/-} y controles (9-12 meses). Materiales y Métodos: las mitocondrias fueron aisladas y purificadas por centrifugación diferencial. La actividad de mtNOS se determinó por fluorescencia de DAF por citometría de flujo. Por Western Blot se determinó la expresión de mtNOS como la nitrosilación de proteínas, y el mRNA por RT-PCR. Se midió por espectrofotometría la actividad del C I por consumo de NADH, C II-III por reducción de citocromo c y C IV por descenso de citocromo c reducido. Resultados: los ratones Ob presentan un aumento de la actividad de mtNOS con respecto a los controles sin cambios en su expresión. La actividad de C I en los Ob se encuentra disminuida -81% en WAT ($p < 0,001$), -72% en M ($p < 0,001$) y -61,2% en L ($p = 0,006$) observándose un aumento de nitrosilación de proteínas en estos tejidos. Conclusión: el aumento de la actividad de mtNOS con un incremento de NO alteraría por nitrosilación de proteínas la actividad del C I en L, M y WAT. Esto expresaría disfunción mitocondrial en tejidos insulino sensibles en este modelo de obesidad.

264. (12573) ESTUDIO BIOMECÁNICO NO-INVASIVO DE RELACIONES OSTEOMUSCULARES POR PQCT COMO REFERENCIA EN ADULTOS NORMALES. CAPOZZA, RICARDO(1); COINTRY, GR(1); FELDMAN, S(2)(3); MOROSANO, M(3); MASSONI, A(3); FERRETTI, S(1); FRACALOSI, NM(2)(3); FERRETTI, MV(1); FERULLO, MC(1); REINA, P(1)(2); MARCHIETTI, G(1); TOZZINI, R(3); FERRETTI, JL(1)

CEMFoC Hosp Cent-Fac Cs Med UNR. (1) Quím Biológ Fac Cs Médicas Univ Nac de Rosario (2) Quím Biológ Méd UNR (3) Serv Ginecol Hosp Centenario

Para establecer relaciones funcionales entre indicadores óseos (tibias) y musculares (pantorrilla), se analizaron scans de pQCT de 4 sitios standard en las piernas (4, 14, 38 y 66% distal) de 21 hombres, 40 mujeres pre-menopáusicas (pre-MP) y 90 post-menopáusicas (post-MP). La relación positiva entre el momento de inercia (MI, indicador de diseño arquitectónico, y) y el área cortical de la sección (x; curva de distribución/masa) pteó más alto en los hombres y más a la izquierda en las post-MP que en las pre-MP (ANCOVA, ambas $p < 0,001$), cuantificando la eficiencia de distribución del material compacto disponible. La relación negativa entre el MI (y) y la densidad mineral volumétrica cortical (Ct-vDMO) cortical (x; curva de distribución/calidad, siempre $p < 0,001$) cuantificó el desplazamiento "anti-anabólico" (a la izquierda y abajo) de las mujeres post-MP respecto del resto. Las relaciones positivas entre el Stress-Strain Index (SSI, indicador mecánico) y el MI o la Ct-vDMO ($p < 0,001$ ambas) cuantificaron la participación independiente de factores geométricos (MI) y materiales (vDMO) en la determinación de la resistencia a la fractura. Las relaciones positivas entre contenido mineral, MI o SSI (y) y el área seccional muscular (x; curvas de masa, distribución o resistencia vs fuerza, siempre $p < 0,001$) cuantificaron las relaciones músculo-hueso mostrando pendientes menores para las post-MP (ANCOVA, siempre $p < 0,001$). Siguiendo criterios biomecánicos modernos, la z-scorización de esas curvas permitiría establecer una referencia normal independiente de la edad para evaluar cualquier desviación, con especificidad de sexo y de estado reproductivo, para calificar biomecánicamente las osteopenias en forma original.

265. (12607) EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS DIETARIOS SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA Y FLUIDEZ DE MEMBRANAS HEPÁTICAS. BERNAL, C.(1); COLANDRÉ, M.E.(1); RODI, P.(1); GENNARO, A.M.(1); AVELDAÑO, M.(2)

Fac. Bioq. y Cs. Biol. UNL. (1) FBCB-UNL-CONICET, CC 242 (3000) Santa Fe y (2) INIBIBB, UNS-CONICET, Bahía Blanca.

El objetivo del presente trabajo fue investigar los efectos de dietas ricas en ácidos grasos trans (AG-t) sobre la composición lipídica y fluidez de membrana hepática, comparándolos con die-

tas ricas en AG saturados (AG-s) o en AG cis. Ratas Wistar macho recibieron durante 30 días, dietas ricas en: a) AG cis (C), b) AG-s ó c) AG-t. La fluidez de membrana de hepatocitos se determinó por resonancia paramagnética electrónica y sus resultados ($X \pm SD$, $n > 4$; * $p < 0.05$) se expresaron en función del parámetro de orden (S). Las distintas clases de fosfolípidos (FL) (PC, PE, PS, PI, CL y SM) se separaron por TLC y se cuantificaron. Los AG presentes en FL y triglicéridos (TG) se analizaron por GC. Los principales cambios en la composición de AG fueron:

	FL C	FL AG-t	FL AG-s	TG C	TG AG-t	TG AG-s
18:0	21.0±1.3	12.6±0.8*	25.8±1.6	1.6±0.1	2.3±1.3	7.1±3.2*
18:1t		19.3±2.5*	0.7±0.1		11.4±0.9*	2.8±0.1
18:1c	8.4±1.1	8.4±1.1	10.4±1.3	26.5±3.6	28.8±2.5	38.4±0.4*
18:2t		3.2±0.2*			7.5±0.6*	0.4±0.1
18:2c	12.0±0.9	10.2±0.8	10.8±0.8	38.9±2.9	17.8±1.6*	15.1±2.2*
20:4	25.7±2.7	23.1±2.4	22.7±2.4	5.7±0.6	0.6±0.2*	1.5±0.3*

Los AG de las distintas fracciones de FL mostraron variaciones siguiendo el mismo perfil de los FL totales y se correlacionaron con modificaciones en S (C: 0.651±0.017; AG-t: 0.543±0.009* y AG-s: 0.530±0.013*). Concluimos que dietas ricas en AG-t producen alteraciones en la composición lipídica de los hepatocitos diferentes a las de los AG-s, asociadas a cambios en la fluidez de membrana, las que podrían estar vinculadas a profundas alteraciones metabólicas.

266. (12624) EL CONTAMINANTE ALIMENTARIO DI (2-ETIL HEXIL) FTALATO ALTERA LA TOLERANCIA Y EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. BERNAL, CLAUDIO; MARTINELLI, MARCELA; MOCCHIUTTI, NORBERTO

Fac. Bioq. y Cs. Biol. UNL. Fac. Bioq. y Cs. Biol. -UNL- CC 242 (3000) Santa Fe.

Ha sido demostrado que exposición crónica al contaminante alimentario Di (2-Etil Hexil) Ftalato (DEHF) produce alteraciones en el metabolismo intermedio de animales de experimentación. El objetivo fue evaluar el efecto del DEHF sobre la utilización de glucosa y su relación con el metabolismo de la glucosa en hígado y músculo de animales de experimentación. Ratas Wistar macho fueron alimentadas (21 días) con dieta control (DC) o suplementada con DEHF (2%) (DEHF). Animales ayunados recibieron una sobrecarga oral de glucosa (1g/kg) y se tomaron muestras de sangre a 0, 30, 60, 120 y 180 min para la determinación de glucosa. En hígado y músculo gastrocnemio de otros animales se cuantificaron los niveles de metabolitos glucolíticos y glucogéno. Se estimó el flujo de sustratos a través de distintos pasos reguladores claves en el metabolismo de la glucosa. Los valores se expresan como $X \pm SEM$, $n=6$ y * $p < 0.05$ vs DC. Los resultados muestran una disminuida tolerancia a la glucosa (Área Bajo la Curva; mg/dl/min x 103:- 35.0±2.4 en DEHF* vs 27.3±2.0 en DC) asociada a alteraciones en el flujo glucolítico muscular y hepático, siendo:

Músculo	Músculo DC	Hígado DEHF	Hígado DC	DEHF
G-6 P/ Glucosa	0.31 ± 0.05	0.15 ± 0.03 *	0.057 ± 0.007	0.024 ± 0.002*
F-1,6 P2/F 6-P	11.2 ± 2.4	12.6 ± 1.2	0.29 ± 0.05	0.42 ± 0.03
Lactato/Piruvato	3.5 ± 0.5	4.4 ± 0.7	4.4 ± 0.3	3.4 ± 0.3 *
Glucógeno / G 1-P	920 ± 254	851 ± 88	4301 ± 469	2708 ± 166 *

Concluimos que el DEHF altera el flujo de sustratos a través de algunas enzimas claves del metabolismo de la glucosa en hígado y músculo esquelético de animales de experimentación, pudiendo ser responsable de la reducción en la utilización periférica de la glucosa.

267. (12655) RELACIÓN ENTRE VLDL Y COMPOSICIÓN DE GRASA CORPORAL EN UN MODELO DE INSULINO-RE-

SISTENCIA. ZAGO, VALERIA; MACRI, VANESA(1); FRIEDMAN, SILVIA(1); SCHREIER, LAURA

Lab Lípidos y Lipoproteínas- Dto Bioq Clínica - FFyB-UBA (1) Cat Bioquímica Gral y Bucal Fac Odontología - UBA

El síndrome de resistencia insulínica (SRI) se asocia con un excesivo flujo hacia el hígado de sustratos para la síntesis de VLDL. La esteatosis hepática es una alteración asociada a SRI. La regulación de producción de VLDL y los determinantes que influyen en su composición no son bien conocidos. Objetivo: Evaluar la relación entre los cambios en el % de grasa corporal –en especial hepática- y las características de VLDL en un modelo de ratas con SRI y controles (C). Wistar macho adultos recibieron dieta con sacarosa 66% (SRI n=5), o dieta isocalórica con maltodextrina 66% (C n=4), durante 15 semanas. El consumo semanal fue: SRI:5.7±1.3 vs C:5.6±0.9 g/100g rata/día, $p > 0.05$. Ratas SRI mostraron aumento de peso: 183±26 vs 131±15 g, $p=0.006$ y tendencia de aumento en insulínemia, SRI: percentilos 90th:0.66 ng/ml y 50th:0.28; en C 90th:0.27, 50th:0.18, manteniendo glucemias sin diferencias. La composición grasa corporal (DXA) fue mayor en SRI: 25±4 vs 19±3, $p=0.017$, al igual que el peso del hígado (Ph), 16.4±1.7 vs 12.9±2.6 g, $p=0.033$ correlacionándose con el aumento de grasa corporal, $r=0.80$ $p=0.02$; sugiriendo acumulación de grasa en hígado. Triglicéridos (TG) no alcanzó diferencias significativas, 124±71 y 77±11 mg/dl $p=0.12$, pero VLDL aislada mostró mayor proporción de lípidos en SRI, expresado como lípidos/proteína:22.8±6.8 vs 15.3±2.4 $p=0.04$, y mayor tamaño, según el indicador TG/proteína: 18,7±6.6 vs 11.6±2.2 $p=0.042$. El aumento de Ph correlacionó con incremento de lípidos en VLDL $r=0.78$ y con mayor tamaño $r=0.77$, $p < 0.01$. La correlación inversa entre Ph y colesterol/TG de VLDL ($r=-0.8$ $p < 0.01$) indicaría una producción de VLDL sobrecargadas en TG. La acumulación de grasa hepática se asociaría con síntesis de VLDL alteradas, que tendrían mayor potencialidad aterogénica, aún con niveles de TG normales en circulación. UBACyT O004 y B069.

268. (12659) MODELO PARA ESTUDIAR LA CAPTACION DE HEMINA EN TRYPANOSOMA CRUZI. CICCARELLI, ALEJANDRA (1); ARAUJO, LIDIA (2); LOMBARDO, ELISA (1,2); BATTLE, ALCIRA (1)

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, Hospital de Clínicas, UBA – CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA)

Los trypanosomátidos presentan un estricto requerimiento de compuestos hémicos durante su crecimiento. Nuestro objetivo final es bloquear la captación de estos compuestos para producir la muerte del parásito. Se presentan aquí los resultados obtenidos para establecer un modelo que nos permita estudiar la captación de hemina. El sistema a emplear parte de epimastigotes cultivados in vitro en medio líquido, las células se cosechan por centrifugación, se lavan y resuspenden en buffer fosfato de sodio 0,05M pH 7,4 adicionando la hemina. Se mantiene el sistema viable durante el tiempo que dura la captación, luego las células se separan por centrifugación y se cuantifica la cantidad de hemina remanente, espectrofotométricamente. Observamos al optimizar el modelo que: a) el parásito no deben crecer más de 5-6 días (a los 7 días la velocidad de captación disminuye entre un 60-70 %); b) las células deben resuspenderse en buffer en relación tal que la concentración de proteínas totales varíe entre 0,018 ± 0,005-0,29 ± 0,01 mg/ml para que la velocidad de captación/mg de proteína se mantenga constante; c) variando la concentración de hemina entre 7,67-61,35 μM, la cantidad captada por la célula sigue una relación lineal con el tiempo hasta los 20 y 60 minutos respectivamente (seleccionamos 15 minutos como tiempo óptimo); d) graficando la velocidad de captación en función de la concentración de hemina observamos un aumento progresivo hasta 30,67-38,34 μM, alcanzando luego la saturación. Si representamos el gráfico de inversos correspondiente, se obtiene una recta

(pendiente: $5,63 \pm 0,24 \mu\text{M} \cdot \text{seg} \cdot \text{mg} / \text{nmoles}$; intersección: $0,44 \pm 0,05 \text{ seg} \cdot \text{mg} / \text{nmoles}$), lo que arroja una V_{max} de captación de $2,29 \pm 0,09 \text{ nmoles} / \text{seg} \cdot \text{mg}$ y una constante de afinidad para la hemina de $12,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$. Los resultados obtenidos muestran que nuestro modelo es adecuado para llevar a cabo estudios de captación ya que corrobora la participación de receptores en la incorporación de hemina por *Trypanosoma cruzi*.

269. (12666) EVALUACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO EN UN MODELO DE GLAUCOMA EXPERIMENTAL. FERREIRA, SANDRA MARÍA; LERNER, FABIÁN; EVELSON, PABLO; LLESUY, SUSANA

Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

El glaucoma es una neuropatía óptica multifactorial caracterizada por la pérdida progresiva de las células ganglionares retinales y atrofia del nervio óptico. Los mecanismos de daño propuestos incluyen la excitotoxicidad, isquemia, falta de factores tróficos y estrés oxidativo. Hay varias determinaciones que se pueden llevar a cabo para evaluar el daño oxidativo, una de ellas es la medida de quimioluminiscencia (QL) in vivo y otra es la capacidad antioxidante total (TRAP). El objetivo del trabajo fue evaluar el daño oxidativo en un modelo crónico de glaucoma experimental en función del tiempo de evolución. El modelo de glaucoma se generó a partir de la cauterización de dos de las cuatro venas episclerales del ojo izquierdo, según modelo de Mc Govern, mientras que el ojo derecho fue utilizado como control. Se utilizaron ratas Wistar de 250 g. Se determinó la QL del ojo in vivo en un contador de fotones Johnson Foundation. Los resultados se expresan en cuentas por segundo (cps) en cm de superficie. El TRAP del humor acuoso y del humor vítreo se determinó por luminiscencia. Los resultados se expresaron en μM de trolox por mL de humor acuoso o vítreo. A los sesenta días se observó un aumento significativo del 23% de la QL del ojo izquierdo. El TRAP del humor acuoso fue de $192 \pm 4 \mu\text{M}$ de trolox/mL (control $142 \pm 7 \mu\text{M}$ $p < 0,01$) y el TRAP del humor vítreo fue de $92 \pm 8 \mu\text{M}$ de trolox (control $219 \pm 24 \mu\text{M}$ $p < 0,001$). Estos resultados sugieren que en estadios tardíos del glaucoma, el daño oxidativo está presente en la progresión del glaucoma. Hay una disminución significativa de las defensas antioxidantes en el humor vítreo y acuoso que sería responsable del desbalance oxidativo.

270. (12699) EVALUACION DEL COSTO-BENEFICIO DEL REEMPLAZO A LARGO PLAZO DE CARBOHIDRATOS POR LIPIDOS DE LA DIETA. MACRI, ELISA; ZAGO, VALERIA(1); RAMOS, CECILIA; SCHREIER, LAURA(1); FRIEDMAN, SILVIA

Cátedra de Bioquímica General y Bucal, FOUBA. Cátedra de Bioquímica General y Bucal, FOUBA. 1-Lab Lípidos y Lipoprot, Dto. Bioq Clín, FFyB-UBA

Dado que una dieta elevada en carbohidratos (CH) induce hipertrigliceridemia, se ha postulado el reemplazo de CH por grasas como medida dietoterápica. Resulta necesario investigar si este aumento en el porcentaje de grasa dietaria podría inducir un perfil lipídico aterogénico. El propósito de este trabajo fue evaluar el costo-beneficio del consumo crónico de dos dietas hipergrasas de diferentes fuentes sobre el perfil lipídico-lipoproteico, en ratas en crecimiento. Cuarenta ratas Wistar macho al destete fueron divididas en 8 grupos, de acuerdo al tipo de grasa (relación w6/w3) y al % de energía proveniente de la misma (40 o 54 Cal /100 Cal/dieta). Las dietas se administraron ad libitum durante 8 semanas. A t_{final} se extrajo sangre por punción cardíaca para las determinaciones de colesterol (C), triglicéridos (TG), C-VLDL, C-HDL y C-NO-HDL (mg/dl), indicador de las lipoproteínas aterogénicas con apoB. Se realizó un ANOVA-Test de SNK, ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$; vs 40) y los resultados fueron (media+ DE):

Grupo	Soja40	Maiz40	Lino40	Vaca40	Soja54	Maiz54	Lino54	Vaca54
ú6/ú3	7	37	0.24	G.saturada	7	37	0.24	G.saturada
C	70.2±3.5	66.0±9.0	50.2±5.0	65.4±14.1	58.4±16.1	54.8±12.7	41.0±14.2	63.0±1.8
TG	80.0±15.2	66.0±12.3	64.6±8.8	118.8±10.8	45.0±15**	57.2± 25.7	29.8±5.1**	101.6±7.6**
C-HDL	54.0±4.8	56.6±6.8	37.0±4.1	42.0±12.8	45.2±10.0	48.6±11.2	33.2±11.9	41.6±2.6
C-NO-HDL	16.2± 2.1	9.4±2.7	14.0±3.0	23.0±4.2	13.2±6.2	6.2±4.3	7.8±3.4*	21.4±4.2
C-VLDL	24.4±4.4	17.8±3.3	23.8±4.1	29.5±5.1	21.8±8.4	15.4±4.5	14.0±6.1*	30.0±2.0

El consumo crónico de dieta con mayor porcentaje grasa en soja, lino y vaca, mostró un efecto favorable sobre TG. El aceite de lino, a su vez, disminuyó C-VLDL y C-NO-HDL evidenciando un efecto beneficioso. La mayor concentración de grasa no afectó C-HDL ni C-VLDL.

UBACyT O-004 y Campo Claro, Bs As

METABOLISMO Y NUTRICION C

271. (12488) ASOCIACIÓN ENTRE DIFERENTES FACTORES DE RIESGO EMERGENTES EN ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR ATROSCLEROTICA. BERG, GABRIELA; MUZZIO, L; LOPEZ, G; MIKSZTOWICZ, V; PANDOLFO, M; CALABRO, M; SCHREIER, L; WIKINSKI, R

LabLípidos-Lipoproteínas-Depto Bioq Clínica-FacFarmacia y Bioquímica-Universidad de Buenos Aires

La asociación entre factores de riesgo lipídico-lipoproteico y la enfermedad cerebrovascular aterosclerótica aún no se ha definido. Sin embargo la emergencia de nuevos factores de riesgo jugaría un rol significativo en la incidencia y desarrollo de accidente cerebrovascular (ACV) isquémico. El objetivo de este trabajo fue investigar la asociación entre factores injuriantes, marcadores de inflamación y de inestabilidad de la placa en pacientes con ACV. Se estudiaron 17 pacientes (81±9 años) con diagnóstico de ACV de menos de 48hs de evolución. Se determinó en suero luego de 12hs de ayuno: colesterol (Col), triglicéridos (TG), Col-HDL, Col-LDL, apoB, homocisteína (Hcy), Lp(a), y PCR-hs. En plasma se midió MMP-9 y MMP-2 por zimografía. Resultados: los valores del perfil lipídico-lipoproteico se encontraron dentro de los límites deseables (media±DS, mg/dl) Col: 209 ± 49 , TG: 103 ± 41 , Col-HDL: 45 ± 10 , Col-LDL: 144 ± 43 , apoB: 109 ± 26 . Los demás parámetros presentaron los siguientes valores, Hcy: $14.2 \pm 5.8 \mu\text{mol/l}$, Lp(a): $33 \pm 27 \text{ mg/dl}$, en ambos casos por encima del P90 de referencia, PCR-hs: $46.5 \pm 56.5 \text{ mg/l}$, valor correspondiente a un evento inflamatorio agudo. La actividad de MMP-9 y proMMP-2 se encontró dentro de los valores de referencia: Area Relativa (AR) 0.39 ± 0.054 y 0.43 ± 0.32 respectivamente. La actividad de proMMP-2 correlacionó con PCR-hs ($r=0.63$, $p < 0.05$) y con Lp(a) ($r=0.50$, $p < 0.05$). PCR-hs correlacionó con Lp(a) ($r=0.42$, $p < 0.05$). El significativo aumento de PCR-hs refleja el proceso inflamatorio agudo que presentan estos pacientes dentro de las 48hs del evento isquémico. El aumento de factores de riesgo emergentes como Hcy y Lp(a) condicionaría el desarrollo de ACV, la correlación de Lp(a) con PCR-hs evidenciaría su efecto injuriantes. La asociación entre la forma latente de MMP-2 y PCR-hs sugiere que estas enzimas podrían ser marcadores adicionales y/o consecuencia del proceso inflamatorio.

272. (12692) ESTUDIOS MOLECULARES Y BIOQUIMICOS DE LA GLUTATION - S - TRANSFERASA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO I. GEREZ (1), ESTHER; OLIVERI (1), LEDA; MEISS (2), ROBERTO; VAZQUEZ (3), ELBA; BATTLE (1), ALCIRA

Hospital de Clínicas CIPYP-CONICET. (1) CIPYP-Hospital de Clínicas, (2) Academia Nacional de Medicina, (3) Depto Química Biológica FCEN-UBA

La diabetes es la primera causa mundial de mortalidad y morbilidad. Las complicaciones resultantes de esta enfermedad se han atribuido en parte a un aumento del estrés oxidativo. Las Glutathion-S-Transferasas (GSTs) intervienen en las reacciones de fase II del metabolismo de drogas y en los sistemas antioxidantes.

Su expresión es afectada por el estrés oxidativo. Sin embargo, los efectos de la diabetes sobre la actividad y expresión de las GSTs son ambiguos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de la GST hepática en un modelo de diabetes mellitus tipo I. Se trabajó con ratones macho CF1 (20 gr, n=6) diabetizados con una única dosis de STZ (170mg/kg ip). La diabetes se confirmó a los 15 días de iniciado el tratamiento. Los animales que alcanzaron niveles de glucemia mayor a 300 mg/ml se separaron en los siguientes grupos: un grupo recibió el agente hipoglucemiante vanadato (V) (0,2 mg/ml, en el agua de bebida) durante 16 días, mientras que a otro grupo se le administró vitamina E (Vit E) ip (60 mg/kg) durante el mismo período. Los grupos que recibieron solamente el vehículo durante los 16 días se utilizaron como los respectivos controles. A los 32 días de iniciado el tratamiento, la glucemia en los animales diabéticos fue de 800 mg/ml, la actividad de GST disminuyó 63% (VC: 22939,0 +/- 3363,6 nmol/mg p< 0,01) y la expresión del ARNm de la GST-P hepática disminuyó 75%. El tratamiento con V normalizó la glucemia, restaurando parcialmente la actividad enzimática y completamente los niveles de ARNm. La Vit E no produjo cambios en los niveles de ARNm, restauró parcialmente (50% p< 0,05) la actividad enzimática. Estos resultados demuestran que en el estado diabético, la GST sufre modificaciones y sugiere que la expresión de la GST-P podría considerarse como un marcador del estrés oxidativo asociado a la diabetes mellitus de tipo I.

273. (12745) LDL PEQUEÑA Y Densa. MECANISMO DE FORMACIÓN EN PACIENTES HEMODIALIZADOS. GONZALEZ, ANA INES; MUZZIO, L; BRITES, F; ELBERT, A; GOMEZ ROSSO, L; BERG, G; SCHREIER, L; WIKINSKI, R

Lab Lípidos y Lipoproteínas, FFyB-Universidad de Buenos Aires. CEREHA

Los pacientes hemodializados (HD) presentan incremento del riesgo cardiovascular. Es frecuente el aumento de triglicéridos (TG) y disminución de HDL. En estudios previos demostramos aumento de LDL rica en TG que correlacionó con la menor actividad de lipasa hepática en HD. Menos estudiada es la formación de LDL pequeña y densa (pd) en relación con el papel de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP). Objetivo: determinar la proporción de LDLpd y actividad de CETP en HD y controles (C). Se estudiaron 31 HD (25 a 66 años) y 14 C (21 a 60 años) de ambos sexos. En suero se determinó el perfil lipídico y lipoproteico, % LDLpd por ultracentrifugación y actividad de CETP con 3H-col-HDL3 como sustrato. Los HD presentaron (media±DS) col-LDL 80±28 mg% sin diferencias con C y mayor proporción de LDLpd 32.±17% que C 18±6%, p<0.01. LDLpd correlacionó con CETP (r=0.42), TG (r=0.65) y negativamente con Col-HDL r=-0.48, p<0.01. La producción de LDLpd se asoció con mayor actividad de CETP posiblemente inducida por aumento en TG-VLDL, aceptora de colesterol. La correlación negativa entre LDLpd y Col-HDL, también explicaría los intercambios de col y TG entre lipoproteínas, favoreciendo la formación de LDLpd. El predominio de esta subfracción, aún con niveles de col-LDL bajos, contribuiría al mayor riesgo aterogénico en HD.

274. (12747) CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE CARGA DE FERRITINA ANIMAL. ROUSSEAU, IVAN; PUNTARULO, SUSANA.

Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, 1113, Buenos Aires, Argentina

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la exposición a Fe sobre la estructura proteica de la ferritina de bazo de caballo. La apoferritina de origen comercial fue expuesta a FeSO₄ en una relación ferritina/Fe de 1:100 durante 30 min a 37°C. Las muestras fueron purificadas por cromatografía HPLC, llevadas a sequedad total, hidrolizadas y sujetas al análisis de aminoácidos. La apoferritina control mostró un contenido de 149 residuos de tirosina, 39 cisteínas y 80 metioninas. Luego de producida la carga con Fe los valores hallados fueron de 139, 22 y 32, respectivamente. Siendo que la suplementación de Fe para la carga de ferritina en condiciones fisiológicas depende del contenido celu-

lar de Fe lábil que se encuentra como complejos de 'bajo peso molecular', se procedió a estudiar la alteración de la proteína cuando es expuesta al complejo Fe-His (1:5) bajo condiciones menos drásticas. La apoferritina previamente pasada por columna sephadex G-25 para eliminar posibles trazas de Fe adventicio, fue expuesta a Fe-His a 25°C con una relación ferritina/Fe-His 1:50. La velocidad de carga de Fe en la ferritina, determinada mediante el aumento de la densidad óptica (310 nm) fue de 0.90±0.01 U DO/min. El contenido de triptofanos de la proteína fue registrado fluorométricamente (exc=285 nm y em=345 nm) durante el proceso de carga. La velocidad de desaparición de los residuos Trp y la disminución de la fluorescencia intrínseca de Trp fueron no detectables para ferritina no expuesta a Fe-His. Para la ferritina expuesta a Fe-His estos valores fueron de 180±2 UF/min y 24±1 UF, respectivamente. La aparición de residuos bitirosina durante el proceso de carga de Fe en estas condiciones experimentales no resultó detectable en concordancia con la falta de efecto sobre el contenido total de tirosinas ya indicado. Los resultados presentados sugieren que durante el almacenamiento de Fe en la ferritina se producen alteraciones en el contenido de aminoácidos de la propia proteína como efectos laterales del adecuado funcionamiento a nivel celular.

Financiado por CONICET, UBA y ANPCyT.

275. (12760) PARAMETROS INFLAMATORIOS EN PULMÓN DE RATA DEFICIENTE DE ZINC. BIAGGIO, VERÓNICA; GOMEZ, NIDIA N.; GIMENEZ, MARÍA SOFÍA

Bioquímica Molecular, Univ. Nacional de San Luis. ngomez@unsl.edu.ar

El Zinc es un oligoelemento esencial que es requerido en humanos y animales para numerosas funciones fisiológicas, incluyendo la función antioxidante. El NO (óxido nítrico) puede participar en la progresión de la injuria aguda en el pulmón (Cruz y col.) y esta vinculado a distintos procesos inflamatorios, como por ejemplo en el asma. El objetivo fue evaluar la expresión de distintos parámetros inflamatorios en pulmón de ratas deficientes en Zinc. Se trabajó con ratas Wistar macho de (200 ± 20 g), separados en 2 lotes: Grupo Control (Co) con un contenido de Zn de 30 mg/Kg de dieta y un lote con una dieta deficiente de Zinc (ZD) conteniendo 5mg/Kg. Las dietas se prepararon siguiendo las normas del Instituto Americano de Nutrición. Luego de dos meses los animales fueron sacrificados. Se determinó el contenido de Zinc tanto en suero como en pulmón, como así también se determinaron los niveles de ARNm de MT I y II, iNOS, PPARgama, TNFalfa por RT-PCR. TGFB-1se determinó por western blot. El RNA total fue obtenido del pulmón usando la técnica del TRizol. 1µg de RNA fue transcrito a cDNA a 42°C usando como primers random hexámeros y RT-MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Se separaron alícuotas que se amplificaron por PCR usando primers específicos. Se usó como gen control β-actina. Las proteínas de pulmón se separaron en gel SDS-PAGE 8% y se identificaron por Western Blot. Las bandas se cuantificaron por densitometría. El contenido de Zn está disminuido tanto en suero como en pulmón (p<0.01). No se observaron cambios significativos en MTI, pero sí un aumento significativo de MTII. (p<0.001). Se observó una disminución del PPARgama (p<0.05) en ZD, aumento del TGFB-1 (p<0.01) y TNFalfa (p<0.05). La deficiencia de Zinc induce un estado inflamatorio en pulmón que se ve reflejado en la expresión de los distintos parámetros medidos.

276. (12765) DEFICIENCIA DE ZINC EN PULMÓN: PARTICIPACIÓN DE LA VIA DEL NF-KB. BIAGGIO, VERÓNICA; DAVICINO, ROBERTO; ALVAREZ, SILVINA; BIANCO, GERMAN (1); GOMEZ, NIDIA; RABINOVICH, DANIEL (1); GIMÉNEZ, SOFÍA

Bioquímica Molecular - Univ. Nacional de San Luis. ngomez@unsl.edu.ar. (1) Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA

Trabajos previos demostraron la existencia de un cuadro inflamatorio, con marcado daño oxidativo en pulmón de rata como

consecuencia de una deficiencia moderada de Zinc (ZD). El objetivo de nuestro estudio fue corroborar si la expresión de iNOS y COX-2 se modifican cuando se realimentan los animales ZD con una dieta control. Así como, determinar si NFkB es el responsable de la expresión coordinada de iNOS y COX-2 en condiciones de estrés oxidativo intenso. Se utilizaron ratas Wistar macho de (200 ± 20 g), separados en tres lotes: Grupo Control (Co) con un contenido de Zn de 30 mg/Kg de dieta, un lote con una dieta deficiente de Zinc 5mg/Kg y un tercer lote que recibió una dieta ZD y se realimentó luego por 10 días con una dieta Control. Se determinó el contenido de Zinc y la producción de NO (reacción de Griess) tanto en suero como en pulmón. En pulmón se determinó la expresión de iNOS, COX-2 e IκBα. Las proteínas se separaron en gel SDS-PAGE 8% y se identificaron por Western Blot y las bandas se cuantificaron por densitometría. El contenido de Zinc disminuyó significativamente en ZD en suero ($p < 0.05$) y pulmón ($p < 0.01$) y el contenido de NO aumentó significativamente tanto en suero como en pulmón ($p < 0.01$). La expresión de iNOS y COX-2 fueron significativamente mayores en ZD ($p < 0.05$) y mientras que IκBα disminuyó significativamente ($p < 0.01$). Concluimos que los niveles de NO tanto en suero como en pulmón de ZD están positivamente relacionados con una mayor expresión de iNOS y COX-2 en pulmón, situación que revierte al dar a los animales ZD una dieta Control. Además, el análisis por Western blot revela un incremento de la degradación de IκBα, un indicador de la activación de NFkB en pulmón ZD.

277. (12773) EFECTOS DOSIS Y TIEMPO-DEPENDIENTES DE LA INTOXICACIÓN CON CADMIO SOBRE LA HISTOARQUITECTURA DE LA PRÓSTATA DE RATA. ALVAREZ, SILVINA; GOMEZ, NIDIA; SCARDAPANE, LUIS (1); GIMENEZ, SOFÍA

Bioquímica Molecular-Proyecto 8104-CONICET. Histol. y Embriol. UNSL.

El cadmio (Cd) es un metal tóxico ampliamente distribuido en el ambiente. Previamente se mostró que la intoxicación produce estrés oxidativo y altera el perfil lipídico de la próstata. El objetivo fue estudiar el efecto en la histoarquitectura prostática con diferentes tiempos y dosis de exposición. Ratas Wistar macho de 21 días de edad se separaron de la siguiente forma: grupo Cd1, sometido a 15 ppm de Cd; grupo Cd2, que recibió 100 ppm y grupo control (Co) que no recibió Cd, durante 10 días. Animales de los mismos grupos fueron sometidos a un tratamiento crónico durante tres meses, conformando los grupos Cd1 crónico, Cd2 crónico y Co crónico respectivamente. El cadmio se administró en el agua de bebida. Las próstatas se fijaron en líquido de Bouin. Secciones de 5-6 μm de espesor se colorearon con H-E. Se fotografiaron con un microscopio óptico Leitz provisto de una cámara Leica. Grupo Co: epitelio normal, con células principalmente cilíndricas. Los núcleos son redondos y basales, se ve claramente el nucléolo. Alrededor de los acinos se observa una delgada capa adventicia con fibroblastos muy alargados y picnóticos. Cd 1: disminución significativa de la altura del epitelio. Hipertrofia del diámetro del lumen glandular. Cd 2: el epitelio de los acinos está formado por células cúbicas en lugar de cilíndricas. El lumen es hipertrófico y no presenta las típicas invaginaciones. El intersticio ha perdido su integridad estructural. Co crónico: muestra un epitelio normal y activo con profundas invaginaciones y abundante secreción en el lumen. Cd1 y Cd2 crónicos: mantienen las características observadas a los 10 días; alturas disminuidas e hipertrofia de los lúmenes. La secreción glandular ha perdido las características coloidales normales. Aparente ausencia de funcionalidad glandular. El cadmio produce un efecto tóxico sobre la histoarquitectura glandular, en una forma principalmente dosis-dependiente, más que tiempo dependiente. Asistencia técnica: Sra. Angelina Bernardi.

278. (12781) DENSIDAD MINERAL OSEA E INGESTA DE CALCIO EN ESCOLARES CON ALTA PREVALENCIA DE SOBREPESO Y OBESIDAD. UN APORTE A LA TEORÍA

DE ZEMEL1. RIO, MARÍA ESTHER; PIAZZA, NORMA; LINARI, MARIA AMELIA; DUPRAZ, HERNÁN; ZAGO, LILIANA; SARCHI, MERIA INÉS

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. (2) Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. (3) Epidemiología, Vicente López. (4) CONICET. Argentina.

A principios de 2000 MB Zemel postuló una teoría según la cual altas ingestas de calcio ejercerían un efecto antiobesidad. La teoría ha sido demostrada en adultos pero se desconocen los límites de su aplicabilidad a los niños. Aquí avanzamos sobre resultados preliminares en escolares de 5° grado que señalan que el efecto solo se manifestaría con ingestas de Ca por encima de las recomendadas (Rio y Col, 2004). Sobre una población de 623 escolares asistentes a los grados 1° a 4° (EGB) en escuelas públicas del partido de Vicente López (GBA); se evaluaron sobrepeso y obesidad por Índice de Masa Corporal según tablas de la International Obesity Task Force y densidad mineral ósea por ultrasonido de calcáneo (QUI); el indicador Ca/ Creatinina (Ca/C) -estimador de ingesta de Ca- se determinó en muestras de orina basal por los métodos de EAA para Ca y Jaffe para Creatinina, respectivamente. En el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 12.0, SSPS INC, Chicago. USA, 2004. Los datos pareados de 215 niños, permitieron detectar 12% de sobrepeso (S) y 7% de obesidad (O). El Ca/C cubrió un amplio rango sin diferencias relacionadas con el peso; solo 12% de los niños presentó valores de Ca/C compatibles con ingestas de Ca por encima de las recomendadas, todos ellos en el grupo N. La QUI media fue 94 en los normales (N), 86,8 en S y 85,9 en O siendo QUI significativamente menor en S y O respecto de N ($P < 0,05$). En O se encontró una correlación negativa, significativa, para QUI vs Ca/C ($p < 0,05$). Los resultados confirman que el efecto antiobesidad del Ca se manifiesta en los niños a ingestas por encima de las recomendadas y sugieren que el peso anormalmente alto se asocia con trastornos del proceso normal de mineralización ósea. UBACyT. Urgencia Social (B703)

279. (12792) CONTRIBUCIÓN DE TNF-ALFA Y DE NOX-2 AL ESTRÉS OXIDATIVO PRESENTE EN AORTA DE RATAS DEFICIENTES EN VITAMINA A. GATICA, LAURA; ALVAREZ, SILVINA; OLIVEROS, LILIANA; GIMÉNEZ, SOFÍA

Bioquímica Molecular - Proyecto 8104- CONICET. UNSL.

Es conocido que la inflamación y el estrés oxidativo en modelos animales de aterosclerosis se encuentran mediados por sustancias reactivas del oxígeno. En trabajos previos evaluamos el ambiente prooxidante y proinflamatorio en aorta de ratas deficientes en vitamina A, donde comunicamos la activación de NF-κB y la disminución de la actividad de la enzima superóxido dismutasa. En el presente trabajo continuamos el estudio analizando la contribución del factor de necrosis tumoral- alfa (TNF-alfa) y de otra fuente importante de anión superóxido, la subunidad catalítica de NAD(P)H oxidasa Nox-2, a dicho proceso. Se trabajó con ratas machos Wistar mantenidas por tres meses con dieta libre de vitamina A (grupo -A) y la misma dieta con 8 mg/kg. dieta de retinol palmitato (grupo control +A). Quince días previos al sacrificio, un grupo de animales -A fue alimentado con dieta control (grupo -A realim.). La deficiencia en vitamina A fue confirmada en el suero por HPLC. La expresión de TNF-alfa, Nox-2, y del receptor del ácido retinoico-alfa (RAR-alfa) se midió por RT-PCR, previa extracción de ARNm por el método del TRIzol. En aorta de animales -A se observó incremento en los niveles de ARNm de TNF-alfa ($p < 0.001$) y de Nox-2 ($p < 0.01$), como también del ARNm de RAR-alfa ($p < 0.001$), comparado con animales +A. La restitución de vitamina A a la dieta revirtió tales efectos. En respuesta a la deficiencia de vitamina A in vivo a nivel de la aorta, se observa un aumento en la expresión del gen de RAR-alfa y de factores relacionados al estrés oxidativo e inflamación. El TNF-alfa y el anión superóxido, producido entre otros por Nox-2, podrían inducir la activación de NF-κB contribuyendo al ambiente prooxidante y proinflamatorio.

280. (12795) AMARANTHUS CRUENTUS: ¿UNA NUEVA ALTERNATIVA PARA DISMINUIR EL RIESGO CARDIOVASCULAR?. ESCUDERO, NORA; GOMEZ, NIDIA; MUCCIARELLI, SARA; GIMÉNEZ, SOFÍA

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.

La hipertrigliceridemia es uno de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. La incorporación de cereales a la dieta constituye un factor de prevención y tratamiento. Más del 2% de la población adulta de los países desarrollados son celíacos, la implementación en la dieta de pseudocereales, como los amarantos libres de gluten y con bondades similares a los cereales, sería una alternativa para estos pacientes. Nuestro objetivo fue evaluar la acción de un concentrado proteico de *Amaranthus cruentus* (CPAc), sobre el metabolismo de los triglicéridos en ratas. 16 ratas macho Wistar adultos fueron alimentadas con dietas adicionadas de 1% de colesterol y 12% de proteína; grupo control: caseína (DC); grupo experimental: CPAc (DCPac). Durante 28 días. Recolección de heces en la última semana. Las ratas se anestesiaron con éter etílico y fueron decapitadas. Se determinó, en suero: triglicéridos; en hígado: triglicéridos, lípidos totales, actividad de Ácido Graso Sintetasa (AGS), medida de la incorporación de [14C]-acetato en la fracción saponificable, medida de la expresión de AGS y en heces: lípidos totales. Ratas DCPac muestran una disminución de triglicéridos séricos respecto a las que se les suministro DC ($p < 0,001$). Lo mismo ocurrió con los triglicéridos hepáticos. AGS en hígado disminuyó en ratas alimentadas con dieta experimental respecto a la control ($p < 0,01$). La incorporación de [14C]-acetato disminuyó en ratas alimentadas con DCPac respecto a DC ($p < 0,01$). La expresión de mRNA de AGS disminuyó significativamente en ratas alimentadas con dieta experimental ($p < 0,01$). La excreción de lípidos totales en heces fue más alta en ratas alimentadas con DCPac respecto a DC ($p < 0,001$). Se muestra la acción hipotrigliceridémica del CPac. Ya que la hipertrigliceridemia es un factor de riesgo en las enfermedades coronarias, el consumo del mismo podría inducir efectos beneficiosos. Por otra parte, este producto también podría ser considerado como un potencial sustituto de los cereales en pacientes celíacos.

REPRODUCCION A

281. (11896) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA 2 (COX2) EN EL TESTÍCULO. FRUNGERI, MONICA BEATRIZ; GONZALEZ-CALVAR, SILVIA; MAYERHOFER, ARTUR; CALANDRA, RICARDO

IBYME, CONICET; Medicina, UBA. LMU, Munich, Alemania; IMBICE, La Plata

Previamente hemos descripto que, la isoforma inducible de la enzima ciclo-oxigenasa (COX2), clave en la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), se expresa en biopsias testiculares de pacientes con infertilidad idiopática; mientras que, se halla ausente en biopsias con morfología normal (Frungeri y col, Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:15072-7). En este trabajo se evaluó, por inmunohistoquímica y RT-PCR, la presencia testicular de COX2 en diferentes especies de roedores y mamíferos. COX2 no se expresa en testículo de ratón, rata, cerdo o mono. Sin embargo, se detectó COX2 en células de Leydig de hámsteres Dorados de 36, 45, 60 y 100 días de edad expuestos a fotoperíodo normal (FN, 14h luz: 10h osc). En cambio, COX2 no se expresa en testículos de hámsteres prepúberes mantenidos en FN, ni en adultos expuestos a fotoperíodo corto (FC, 8 h luz: 16h osc) durante 16 semanas a fin de alcanzar el máximo grado de regresión testicular fotodependiente. Estudios in vitro realizados con células de Leydig purificadas seguidos por RT-PCR demostraron que, la expresión de COX2 es inducida por hCG, testosterona (T) y 5alfa-androstano 3alfa,17beta-Diol (Diol); en cambio, melatonina (mel) bloquea dicho efecto estimulador. Resultados similares fueron obtenidos al

determinar la producción de PGF2alfa (fmoles/ millón de células de Leydig) mediante un inmunoensayo colorimétrico (basal: 102.69 ± 5.01 , hCG 100 mIU/ml: 144.17 ± 3.55 , T 1µM: 156.94 ± 5.87 , Diol 1µM: 148.32 ± 5.71 , $P < 0.05$; hCG 100 mIU/ml + mel 1nM: 99.36 ± 6.00). Además, por inmunohistoquímica, detectamos la presencia del receptor de andrógenos no sólo en células de Sertoli y mioides, sino también en células de Leydig de hámsteres. En resumen, COX2 se localiza en células de Leydig del hámster Dorado, y su expresión sería regulada durante el desarrollo puberal y en la adultez por hCG, T, Diol y mel. Así, el hámster Dorado se convierte en un modelo experimental ideal para la realización de estudios fisiológicos relacionados con el rol de las PGs en infertilidad masculina.

282. (12085) REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASA (NAG) EN EL TRACTO REPRODUCTOR MASCULINO. MENENDEZ HELMAN, RENATA; MIRANDA, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

La NAG es la glicosidasa más abundante en epidídimo y ha sido relacionada con la maduración de los espermatozoides y la fertilización. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la NAG de epidídimo tiene la particularidad de ser activable por TritónX100. Esta característica es compartida con la enzima de espermatozoides, pero se pierde luego del aumento de actividad que tiene lugar durante la capacitación. Estos resultados sugieren que la NAG podría sufrir algún tipo de regulación relacionada con su función en la fertilización. En el presente trabajo estudiamos la posible modulación de NAG a lo largo del tracto masculino. Muestras de PS fueron obtenidas de semen de donantes normales o vasaectomizados (PSV). El CEP se obtuvo por perfusión del vas deferens de epidídimos provenientes de pacientes sometidos a orquidectomía terapéutica por carcinoma de próstata. La actividad de NAG fue medida utilizando un sustrato fluorométrico específico en presencia o no de 0.1% TritónX100. La actividad de NAG en PSV no cambió por agregado de detergente ($99 \pm 2\%$ respecto del control tomado como 100). El PS de donantes normales tampoco mostró estimulación (106 ± 5), a diferencia de lo que ocurre en CEP. El agregado de PS o PSV al CEP bloqueó el efecto del TritónX100 sobre la enzima epididimaria (168 ± 6 vs 119 ± 11 y 106 ± 24 para CEP solo o suplementado con PS y PSV respectivamente, $p < 0.05$). El agente causante de este efecto resultó ser insensible al calentamiento y tener un peso molecular entre 3.5 y 12 kD. Por otro lado, al combinar CEP y PS la actividad obtenida en ausencia de TritónX100 fue mayor a la suma de las actividades ($60 \pm 12\%$ de aumento, $p < 0.01$). Detectamos la presencia de la proteína activadora de NAG en PS humano por inmunoblot. Los resultados presentados apoyan la existencia de un mecanismo regulador de la actividad de NAG a lo largo del tracto reproductor masculino.

283. (12086) DIFERENCIAS ENTRE EL CALCIO Y EL ESTRONCIO DURANTE LA REACCIÓN ACROSOMAL. BACHMANN, SANDRA; ZITTA, KARINA; MIRANDA, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

Los espermatozoides de mamífero deben capacitarse y sufrir la reacción acrosomal (RA) antes de poder fertilizar un ovocito. El Ca cumple un papel fundamental en estos procesos ya que es requerido para la motilidad, la capacitación, la RA y la interacción con el ovocito. El Sr puede reemplazar al Ca en la capacitación y la unión a la zona pelúcida, pero no en la RA. La señalización a través de Ca involucra diversos pasos: activación de canales por depolarización, aumento de la concentración intracelular y liberación de la reserva acrosomal. En este trabajo se analizó en que etapa/s del proceso de RA el Sr difería del Ca. Espermatozoides de hamster fueron purificados e incubados en medio TALP suplementado con 3 mg/ml de BSA para su capacitación. En algunos casos, luego de 3 hs de incubación las células fueron resuspendidas en medio TALP común o modificado (en el cual el

Ca fue reemplazado por Sr) y la RA medida 3 hs después. Para el tratamiento con ionóforo, las células incubadas por 3 hs fueron tratadas con 1 μ M A23187 y la RA medida 30 minutos más tarde. En los experimentos de depolarización, las células se incubaron en medio carente de NaCl y suplementado con 60 mM KCl, y la RA fue medida 30 min después del comienzo de la incubación. En medio con Sr, la RA espontánea no ocurrió independientemente de que la capacitación se haya hecho en Ca (29 \pm 7%) o Sr (15 \pm 2%, $p < 0.001$ vs control=86 \pm 4%). El tratamiento con ionóforo indujo la RA en espermatozoides incubados todo el tiempo en Sr, aunque el resultado fue menor al obtenido con Ca (63 \pm 11% vs. 79 \pm 6% RA para Sr y Ca, respectivamente, $p < 0.05$). En cambio, la inducción de RA por depolarización fue indistinguible en medio con Ca (30 \pm 2 vs 9 \pm 3% RA para el control sin K, $p < 0.01$) o Sr (25 \pm 3 vs 7 \pm 1, $p < 0.01$). Estos resultados sugieren que el Sr difiere del Ca en su capacidad de atravesar la membrana plasmática.

284. (12089) N-ACETILGLUCOSAMINIDASA (NAG) EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS: LOCALIZACIÓN EN MEMBRANA PLASMÁTICA Y POSIBLE ORIGEN EPIDIDIMARIO. MENENDEZ HELMAN, RENATA; PEREZ MARTINEZ, SILVINA; MIRANDA, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental – CONICET

La NAG es la glicosidasa más activa en epidídimo y espermatozoides. Resultados previos de nuestro laboratorio apoyan su participación en la unión primaria a la zona pelúcida y sugieren su localización en membrana y relación con la maduración de los espermatozoides. En el presente trabajo quisimos verificar la presencia de NAG en la membrana plasmática del espermatozoide humano y su posible origen epididimario. Espermatozoides purificados por swim-up a partir de semen de donantes fueron utilizados para extracción con BWW, ensayos de unión de NAG o inmunocitoquímica. Enzima recombinante humana (hrNAG) fue biotinilada y utilizada para ensayos de unión a espermatozoides. La actividad enzimática se midió con un sustrato fluorométrico específico. Epidídimos humanos se obtuvieron de pacientes sometidos a orquiectomía terapéutica por carcinoma de próstata. Citosol de tejido o fluido luminal del cauda obtenido por perfusión del vas deferens (CEP), fueron usados como fuente de enzima epididimaria. La inmunocitoquímica reveló la presencia de NAG en la membrana plasmática de la región acrosomal de espermatozoides no permeabilizados (negativos para el marcador intracelular SP-10). La NAG extraída de los espermatozoides fue activada por agregado de 0.1% TritonX100 (291 \pm 41% vs control=100, $p < 0.05$). Esto no ocurrió con la NAG de otras fuentes (sueño: 96 \pm 1, hrNAG: 101 \pm 1, citosol de testículo: 103 \pm 2) pero sí con la actividad proveniente del epidídimo (142 \pm 21 y 142 \pm 2% para CEP y citosol respectivamente, $p < 0.05$). Por último, los experimentos de unión de hrNAG sugirieron que la enzima puede unirse a los espermatozoides. Estos resultados apoyan la presencia de NAG en la membrana plasmática de los espermatozoides humanos, muestran una característica común entre la enzima epididimaria y la de espermatozoides y su habilidad para unirse a los mismos. En conjunto, los datos mostrados sugieren que la NAG podría incorporarse a los espermatozoides durante la maduración epididimaria.

285. (12133) SEROTONINA REGULA LA EXPRESION DE TGF β 1 EN CÉLULAS DE LEYDIG DE HAMSTER VIA ACTIVACION DE MAPK. DEGESE, MARIA SOL; FRUNGIERI, MONICA; CALANDRA, RICARDO; GONZALEZ CALVAR, SILVIA

IBYME. Fac. Medicina, UBA; IMBICE

En trabajos previos describimos el rol de serotonina (5-HT) como modulador local de la esteroidogénesis testicular en el hámster Dorado (Neuroendocrinology, 76:53, 2002). En este trabajo se analizó el rol de 5-HT en la modulación de la expresión de TGF- β 1, factor involucrado en el desarrollo y diferenciación de las células de Leydig. Testículos provenientes de hámsteres Dorados adultos (90 días de edad) mantenidos en fotoperíodo nor-

mal (FN:14 h luz:10 h osc.) fueron colagenizados y las células intersticiales purificadas en un gradiente de Percoll (90-40%). La fracción de células de Leydig purificadas fue utilizada para la extracción de ARNm total y por RT-PCR con primers específicos se confirmó la presencia de receptores serotoninérgicos tipos 1A y 2A, determinándose la homología con otras especies por secuenciación del ADNc obtenido. Además, las células de Leydig fueron incubadas en condiciones basales (Control) y estimuladas con hCG (100mUI/ml) (20 min) en ausencia y presencia de 5-HT y se determinó por RT-PCR la expresión de TGF- β 1. Los resultados obtenidos muestran que 5-HT induce la expresión de TGF- β 1 en condiciones basales y estimuladas con hCG (determinación semicuantitativa con el software Scion). Además, 5-HT en condiciones basales incrementó la fosforilación de p42/p44 (erk1/2) evaluada por Western blot. Un bloqueante de la fosforilación de erk (P98059) inhibió el efecto estimulador de 5-HT sobre la expresión de TGF β 1. En conclusión, los presentes resultados muestran que, en una especie fotosensible como el hámster, la 5-HT modifica la expresión de TGF- β 1, a través de la activación de MAPK.

286. (12244) ACTIVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE DE ANFIBIOS: ROL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR. KRAPF, DARIO; O'BRIEN, EMMA D; ARRANZ, SILVIA E.; CABADA, MARCELO O.

IBR-CONICET, Área Biología, FCByF, UNR, Rosario, Argentina. E-mail: dkrapf@fbiof.unr.edu.ar

Los ovocitos de Bufo arenarum (Anfibio) poseen una matriz extracelular constituida por la envoltura vitelina (EV) y una cubierta gelatinosa (CG). La EV está formada mayoritariamente por glicoproteínas de la serie ZP y dos proteínas de 115kDa (HVA) y 106kDa (HVB), aún no caracterizadas, presentes sólo en la hemicubierta vegetal de la EV (el espermatozoide ingresa por el hemisferio animal). Se ha propuesto que la CG podría capacitar al espermatozoide para la fecundación. El objetivo de nuestro trabajo es analizar el rol de la CG en la activación del espermatozoide y caracterizar bioquímica y molecularmente de las HVs. Se estudió el efecto que ejerce el Difundido total (DT, extracto soluble obtenido a partir de CG) sobre el colesterol de espermatozoides incubados 15 min a 22 °C. La cantidad de colesterol (método enzimático) remanente descendió en un 21,1 \pm 6,7% (n=3), hallándose un 88,7 \pm 1,5% (n=3) de espermatozoides íntegros, evaluado con Azul de Tripán. Esta salida de colesterol fue dependiente de la concentración del DT. Por otro lado, la incubación de espermatozoides en presencia de DT indujo la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Esta fosforilación fue dependiente tanto del tiempo como de la concentración del DT en el medio de incubación. Mediante análisis SDS/PAGE se determinó la presencia de las HVs en la cubierta celómica y en la de fecundación mostrando un patrón similar al de EV. Se realizó un cross-linking de EV, resultando, al menos una de ellas (HVB), íntimamente relacionada con dos de las glicoproteínas ZPs. Además, se encontraron condiciones de solubilidad para ambas proteínas (6M Guanidina + CHAPS 5% y 6M Guanidina + DTT 50mM), ya que las mismas son insolubles en las condiciones de solubilidad de las ZPs. Nuestros datos sugieren que los componentes de la CG podrían desencadenar un proceso de capacitación del espermatozoide con características similares a lo que ocurre en mamíferos. Se desconoce aún si la presencia de las HVs se relaciona con la asimetría en la penetración del espermatozoide.

287. (12385) CARACTERIZACION DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA CAPACITACION DE ESPERMATOZOIDES DE XENOPUS LAEVIS. COUX, GABRIELA (1); CABADA, MARCELO O. (1); VISCONTI, PABLO E. (2)

(1) Area Biología. Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR. División Biología del Desarrollo. IBR (CONICET-UNR). (2) Vet. & Animal Sci., Universidad de Massachusetts

Para poder ser fecundante el espermatozoide de mamíferos debe atravesar el proceso de capacitación que se caracteriza por

producir hiperpolarización, aumento del AMPc y aumento de la fosforilación de proteínas entre otros eventos. El anfibio *Xenopus laevis* posee fecundación externa, pero sus espermatozoides requieren de un medio de baja osmolaridad para ser motiles y de factores difusibles (FD) de las envolturas de los ovocitos para poder tener éxito en la fecundación. Nuestro objetivo fue analizar si la adquisición de motilidad y de capacidad fecundante del espermatozoide de *X. laevis* se asocia con alguno de los eventos descritos para la capacitación de mamíferos. Se midió el potencial de membrana de los espermatozoides mediante el uso del fluoróforo DiSC3(5), valinomicina y KCl y no se detectaron cambios con la dilución (concentrado= 89.2+/-5.7, diluido =99.2+/-6.9 mV, n=3-5). Se analizó el nivel de fosforilación en tirosina mediante western blot. Se observó un aumento de la fosforilación en tirosina en proteínas de entre 30 y 50 kDa al pasar los espermatozoides a un medio diluido. La adición de FD al medio diluido provocó aparición de una banda fosforilada de aproximadamente 20kDa. Esta banda no se detectó cuando los FD se incorporaron a los espermatozoides en medio concentrado y además, esta banda fue detectable cuando los FD se sembraron en ausencia de espermatozoides. La inclusión de dibutilil-cAMP e IBMX en los medios no produjo cambio respecto de lo observado. Finalmente se analizó la fosforilación de proteínas en treonina y serina mediante western blot. Se vio el aumento en fosforilación de proteínas de entre 75-100 kDa y la desaparición de bandas fosforiladas entre los 37-50 kDa al pasar los espermatozoides a medio diluido. Nuestros datos sugieren que los espermatozoides de *X. laevis* comparten algunos de los cambios asociados a la capacitación de mamíferos, como el aumento de la fosforilación de proteínas pero que esto no estaría mediado por hiperpolarización o cAMP.

288. (12389) EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (AR) EN TESTÍCULO HUMANO PREPUBERAL. GONZALEZ, CANDELA; BERENSZTEIN, ESPERANZA; SARACO, NORA; RODRIGUEZ, JORGE; RIVAROLA, MARCO; BELGOROSKY, ALICIA

Hospital de Pediatría Garrahan

Estudiando el modelo de testículo humano prepuber (THPP) previamente hemos descrito una fuerte expresión de aromatasa en células intersticiales (CI) y células germinales (CG), ausencia de expresión del receptor de estrógenos (ER) alfa y fuerte expresión del ER beta en CI, CG, células peritubulares (CP) y de Sertoli (CS), postulando que los estrógenos locales tendrían un rol en el THPP (Berensztein et al, SAIC 2004). Dentro del intersticio del THPP se encuentran fibroblastos, células mesenquimáticas precursoras de Leydig (CL), macrófagos y CL fetales remanentes. Dentro de los cordones seminíferos hay CS inmaduras, gonocitos y espermatogonias. Aún no se conoce la expresión de AR en THPP. Por lo tanto, analizamos la inmunexpresión de AR en tejidos de THPP en función de la edad. Muestras de testículo normal provenientes de necropsias fueron divididas en tres grupos etarios (Gr): Gr1, neonatal (1-21 días, n=7); Gr2, activación postnatal testicular (1-7 meses, n=7) y Gr3, prepubertad temprana (12-36 meses, n=6). Los resultados fueron evaluados según el porcentaje de células positivas mediante el siguiente score: negativo (0-10%), moderado (10.1-33%), fuerte (33.1-66%) y muy fuerte (66.1-100%). Fuerte expresión de AR fue observada en CI y CP en Gr1 y Gr2 y moderada expresión en Gr3. En las CL fetales, identificadas por sus características histológicas, no se observó expresión de AR. La expresión de AR en CS fue negativa en los tres grupos, en contraste con un control adulto. En las CG de los tres grupos no se detectó expresión de AR. Se concluye que en THPP, las CI y CP serían blanco para la acción de los andrógenos, los cuales podrían modular su propio receptor y ejercer un rol en la diferenciación de las células precursoras a CL. En los cordones seminíferos la ausencia de AR en CG concuerda con lo reportado previamente, mientras que la falta de expresión en CS impediría la acción de los andrógenos, principalmente, la estimulación de la espermatogénesis antes de la pubertad.

289. (12420) ROL DE PTP1B EN LA REACCIÓN ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS. ZARELLI, VALERIA; ROGGERO, MARCELO; MAYORGA, LUIS; TOMES, CLAUDIA

Laboratorio de Biología Celular y Molecular. IHEM-CONICET. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

La fertilización depende, entre otras cosas, de la fusión del acrosoma con la membrana plasmática del espermatozoide, conduciendo al proceso exocítico llamado reacción acrosomal (RA). En una variedad de sistemas, la exocitosis depende significativamente de la fosforilación de proteínas, un proceso dinámico en el cual el estado de fosforilación refleja la acción competitiva entre quinasas y fosfatasa. Por medio de inhibidores y anticuerpos específicos, vimos que proteínas fosfatasa y quinasas de tirosina (PTP y PTK, respectivamente) juegan un rol central en la reacción acrosomal. Utilizando anticuerpos monoclonales específicos, demostramos por primera vez la presencia de PTP1B, una PTP soluble, en extractos de espermatozoides humanos y de ratón. Por inmunofluorescencia indirecta se detectó que PTP1B se localiza en la pieza media del flagelo y en el segmento ecuatorial del espermatozoide humano. Nuestro laboratorio ha desarrollado un modelo de espermatozoides humanos donde la membrana plasmática se permeabiliza con estreptolisina O. Este tratamiento permite ingresar libremente dentro de la célula moléculas a las cuales la membrana plasmática es normalmente impermeable, como por ejemplo iones, proteínas y anticuerpos. Tanto calcio como Rab3A recombinante persistentemente activada con GTP-gamma-S inducen la RA en espermatozoides humanos permeabilizados. Observamos inhibición de la misma, ya sea disparada por calcio o por Rab3A, cuando utilizamos un anticuerpo anti-PTP1B o una mutante de PTP1B carente de actividad catalítica. PTP1B es necesaria para la exocitosis. Inhibidores fotosensibles ubican el requerimiento de la misma a posteriori del tethering dependiente de Rab3 y previo a la salida del calcio acrosomal. En este momento nos hallamos abocados a la identificación de sustratos de esta fosfatasa, así como a su regulación durante la exocitosis.

290. (12491) CAMBIOS MORFOLÓGICOS OBSERVADOS DURANTE LA REACCIÓN ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS. ZANETTI, NATALIA; MAYORGA, LUIS S.

Laboratorio de Biología Celular y Molecular. IHEM-CONICET. Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo, Mendoza.

Durante la reacción acrosómica (RA) en el espermatozoide, la membrana acrosomal externa (MAE) se fusiona en múltiples puntos con la membrana plasmática (MP), dando lugar a la vesiculización y a la liberación del contenido acrosomal hacia el exterior. A nivel molecular, el este proceso de fusión requiere la presencia las proteínas Rab3A, SNAREs y también la salida de Ca²⁺ desde el acrosoma por canales sensibles a IP₃. Nuestros principales objetivos son: determinar los cambios morfológicos y observar los múltiples puntos de fusión que se producen entre ambas membranas durante la RA. Para ello se utilizaron técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y réplicas de superficies en muestras de espermatozoides tratados con 2APB (bloquea los canales de Ca²⁺ sensibles a IP₃) y luego con un ionóforo de calcio A23187 para inducir la RA, deteniendo la misma a diferentes tiempos con ácido tánico, que estabiliza las membranas y estructuras internas. Los resultados obtenidos nos permiten determinar la presencia de notables cambios morfológicos a nivel del acrosoma. Observamos un aumento en el volumen acrosomal y marcadas ondulaciones sobre la MAE, que contactan la MP, lo que genera los múltiples puntos de fusión entre ambas membranas. También se observa la presencia de un gran número de vesículas en el interior del acrosoma, de las que se desconoce su origen y naturaleza. A tiempos mayores, se observó la completa vesiculización entre las MP y MAE.

Los resultados obtenidos sugieren que el uso de ácido tánico en esta técnica nos ha permitido observar de manera secuencial los cambios morfológicos que se producen en el acrosoma y también la presencia de múltiples puntos de fusión entre ambas membranas durante el proceso de reacción acrosomal.

291. (12495) ESTUDIO DE LA IDENTIDAD DE LOS SITIOS DE UNIÓN PARA LA PROTEÍNA ESPERMÁTICA "DE" EN EL OVOCITO. BUSSO, DOLORES; CARBONE, VERÓNICA; CUASNICU, PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Las evidencias sobre las moléculas involucradas en el proceso de fusión de gametas en mamíferos son muy escasas. Resultados de nuestro grupo indican que la proteína espermática de rata DE participa en el proceso de fusión asociándose a sitios complementarios localizados en la superficie del ovocito. Con el fin de identificar dichos sitios, ovocitos de ratón sin zona pellucida fueron expuestos a proteínas, glicosidasas y lipasas bajo diferentes condiciones experimentales, evaluándose luego, por inmunofluorescencia indirecta (IFI), el efecto de las mismas sobre la unión de DE al ovocito. Mientras que los tratamientos afectaron la fusogenicidad de los ovocitos, no se observaron diferencias en la unión de DE. El siguiente paso consistió, entonces, en la realización de ensayos bioquímicos para aislar un posible complejo entre DE y un receptor de origen proteico (R). Ni la inmunoprecipitación de proteínas de ovocitos (PO) incubadas con DE, ni la incubación con DE, de PO acopladas a nitrocelulosa (ligand blot) permitieron aislar al receptor, sugiriendo la disociación del complejo DE-R por baja afinidad. La posterior utilización del crosslinker disuccinildisuberoato (DSS), que une covalentemente proteínas asociadas por fuerza iónica, permitió identificar una banda de alto peso molecular, no detectada en muestras controles (en ausencia de ovocitos, o de proteína, o de crosslinker), que podría corresponder al complejo DE-R. Considerando que la tetraspanina CD9 es la única molécula del ovocito de mamífero esencial para la fusión, investigamos si la misma era capaz de interactuar con DE. Ensayos de IFI en los que se evaluó la competencia entre anti-CD9 y DE por el sitio de unión en el ovocito, indicaron que no existiría una interacción directa entre CD9 y DE. En conjunto, estos estudios sugieren que el sitio de unión de DE en el ovocito sería una proteína o complejo proteico de alto peso molecular, resultado acorde con las evidencias halladas tanto en mamíferos como en invertebrados.

292. (12540) CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES DE CERDO CAPACES DE INTERACCIONAR CON SPERM BINDING GLYCOPROTEIN. TEIJEIRO, JUAN M.; CABADA, MARCELO O.; MARINI, PATRICIA E.

Area Biología. Fac de Cs. Bioq y Farm. UNR. División Biología del Desarrollo. IBR-CONICET

En mamíferos la fecundación es interna. Millones de espermatozoides ingresan al tracto reproductivo de la hembra, de los cuales solo unos miles ingresan al istmo oviductal donde, por unión a las células epiteliales ciliadas, generan un reservorio. Al momento de la ovulación los espermatozoides unidos al epitelio oviductal se liberan del mismo y se dirigen hacia el ámpula, sitio donde ocurre la fecundación. En cerdo hemos identificado y purificado una glicoproteína de células epiteliales de oviducto capaz de unirse a espermatozoides, SBG (sperm binding glycoprotein). SBG tiene una masa molecular, luego de ser deglicosilada, de 67,5 kDa en condiciones no reductoras y de 85 kDa en condiciones reductoras. SBG expone grupos Gal β 1-3GalNac terminales, y tanto ella como su forma deglicosilada presentan pI de 3,6 y 3,8. Las proteínas de superficie de membrana de espermatozoides (PSME) candidatas para la unión al oviducto se asocian al mismo durante su tránsito por el epidídimo o durante la eyaculación. Estas proteínas se denominan espermadhesinas, y constituyen

una familia de proteínas capaces de reconocer y unirse a carbohidratos. El objetivo del presente trabajo fue identificar cuáles PSME podrían estar involucradas en la interacción con SBG. Para ello hemos aislado PSME y purificado mediante cromatografía de afinidad aquellas que fueron capaces de interactuar con SBG. Posteriormente dichas proteínas fueron resueltas y caracterizadas parcialmente a través de electroforesis bidimensional. Como resultado se identificaron al menos 10 proteínas cuyos pI varían entre 6,6 y 8,4 y sus masas moleculares entre 6 kDa y 66 kDa. SBG, una glicoproteína de oviducto, interacciona directa o indirectamente con al menos 10 proteínas de espermatozoides. Esto indicaría que su unión a espermatozoides es un proceso complejo, acorde a las características de las interacciones entre células involucradas en el proceso de reproducción.

293. (12547) ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD GENÓMICA DE ESPERMATOZOIDES COINCUBADOS CON MEDIO CONDICIONADO DE TEJIDO OVIDUCTAL HUMANO. ROBERT, MARIA CELESTE; CAILLE, ADRIANA; MUNUCE, MARÍA; GHERSEVICH, SERGIO

Laboratorio de Estudios Reproductivos, Área Bioquímica Clínica, Fac. de Cs. Bioq. y Farmac., UNR

Durante el proceso de capacitación los espermatozoides (esp) generarían especies reactivas del oxígeno (ERO) involucradas en los pasos iniciales del mismo, aunque su exceso también puede dañar estructuras espermáticas. La secreción oviductal podría modular la acción de las ERO. En este trabajo evaluamos la integridad genómica de esp incubados en condiciones capacitantes (CAP) en presencia o ausencia de secreción de tejido oviductal. El tejido, obtenido de pacientes (n=5) premenopáusicas sometidas a histerectomía por causa no oncológica, se cultivó en medio Ham-F12/DMEM (48 h, 37°C, 5% CO₂) colectándose el medio condicionado (MC). Los esp móviles de donantes normozoospermicos (seleccionados por gradiente de Percoll, n= 5) se incubaron en CAP durante 4 y 22 h, con o sin MC, [proteínas]MC = 0,2 µg/µl. La viabilidad de los esp se evaluó con Eosina Y (según OMS). La integridad del ADN espermático se evaluó mediante el ensayo del cometa, mediante electroforesis en condiciones alcalinas. Se midió la distancia de migración del ADN en µm (DM) teñido con plata, evaluándose 200 células por tratamiento. Los datos se expresaron como media \pm SEM y se analizaron por ANOVA. En ausencia del MC la viabilidad fue significativamente menor luego de 22 h en CAP respecto de la suspensión post Percoll (76.7 \pm 4.5 % vs. 90.7 \pm 2.5 %; P<0.05). En todos los tratamientos la DM media fue siempre significativamente mayor que en la muestra post Percoll inicial (P<0.001). La DM de esp incubados con el MC fue significativamente menor que en su ausencia tanto a las 4 hs (49.0 \pm 0.1 vs. 50.9 \pm 0.2; P<0.001) como a las 22 hs (47.3 \pm 0.2 vs. 48.5 \pm 0.3; P<0.01). Los resultados indicaron que el MC preservó la viabilidad de los esp aun después de 22 h de incubación. La incubación en CAP resultó siempre en aumentos de la DM, aunque en presencia del MC el daño al ADN fue menor que en su ausencia. Este efecto podría deberse a una acción antioxidante del MC, lo cual modularía al proceso de capacitación de los esp.

294. (12622) SYNAPTOTAGMINA VI ES DESFOSFORILADA DURANTE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL. OGGERO, MARCELO; CASTILLO, JIMENA; TOMES, CLAUDIA; DE BLAS, GERARDO; MAYORGA, LUIS

IHEM-CONICET, Fac. de Medicina, U.N.Cuyo Mendoza.

La reacción acrosomal (RA) es una exocitosis regulada, dependiente de calcio, que sufre el espermatozoide como proceso indispensable para la fecundación del ovocito. Las synaptotagminas (syt) constituyen una gran familia de proteínas transmembranas que poseen dos dominios citosólicos de unión a calcio y fosfolípidos (C2A y C2B); a estas proteínas se les atribuye la función de sensores de calcio involucrados en la exocitosis. Previamente demostramos que syt VI se encuentra pre-

sente en espermatozoides humanos, observamos que ambos dominios citosólicos C2A y C2B purificados inhiben la RA en espermatozoides humanos permeabilizados y que este efecto es anulado ante la fosforilación de los mismos. En este trabajo estudiamos la regulación por fosforilación de la Syt VI endógena. Para lo cual se creó un anticuerpo que reconoce la proteína fosforilada (antiPP), este anticuerpo en IFI mostró una clara inmunomarcación en la región acrosomal de espermatozoides no estimulados. AntiPP fue utilizado en ensayos funcionales de RA en espermatozoides permeabilizados mostrando un efecto inhibitorio similar a datos obtenidos con anticuerpo específico antiSyt VI. Esto indicaría que Syt se encuentra fosforilada en espermatozoides no estimulados. Cuando estos ensayos se realizaron en espermatozoides estimulados con calcio, se observó un descenso en la inmunomarcación en la IFI y una anulación del efecto inhibitorio de la RA en ensayos funcionales; indicando una desfosforilación de Syt. Estos resultados nos permiten concluir que Syt VI se encuentra fosforilada en espermatozoides en reposo, inhibiendo la interacción de Syt con efectores específicos. Cuando el espermatozoide es estimulado la proteína se desfosforilaría permitiendo que se produzca la RA. La fosforilación tendría, entonces, un papel regulatorio en la función de Syt en la exocitosis acrosomal.

295. (12639) UNA MUTACIÓN DE ALFA-SNAP EN UNA CEPA DE RATONES HIDROCEFÁLICOS (HYH) AFECTA LA REACCIÓN ACROSÓMICA. DE BLAS, G; BATIZ, LF²; OLIVER, C²; TOMES, CN; RODRÍGUEZ, EM²; MAYORGA, LS

Lab. de Biología Celular y Molecular. IHEM. Fac. de Ciencias Médicas. Univ. Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina. ² Instituto de Histología y Patología. Fac. de Medicina. Univ. Austral de Chile. Valdivia. Chile gdeblas@fcm.uncu.edu.ar.

La reacción acrosómica (RA) es una exocitosis regulada calcio dependiente, fundamental para la fecundación, en el que la membrana plasmática se fusiona en múltiples puntos con la membrana acrosomal externa. La RA es un proceso que involucra un grupo de proteínas altamente conservadas que participan en todos los fenómenos de fusión de membranas. Una de las proteínas implicadas es alfa-SNAP que desempeña un papel clave en la fusión de membranas, participando en la activación de los SNAREs. Nuestro grupo ha caracterizado su presencia y función durante la exocitosis acrosomal de espermatozoides humanos. Recientemente se ha demostrado que una cepa de ratones con hidrocefalia congénita (hyh) presenta una mutación en el gen que codifica para la proteína alfa-SNAP. Es interesante destacar que estos ratones son infértiles, y que la causa de su infertilidad no ha sido todavía estudiada. El objetivo de este trabajo es estudiar si la mutación de alfa-SNAP en esta cepa de ratones, afecta la reacción acrosomal y por consiguiente si es la causa de infertilidad. En nuestros experimentos empleamos muestras de espermatozoides obtenidos de cauda de ratones mutados [hyh/hyh], ajustamos la concentración final a 5-10 x 10⁶ espermatozoides/ml. Nuestros resultados indican que no existe diferencia significativa en los parámetros funcionales – cantidad, motilidad, viabilidad- de los espermatozoides entre ratones normales [hyh/+ o +/+] y ratones mutados [hyh/hyh] Por otra parte, se observa que en ensayos funcionales de reacción acrosomal no responden al estímulo con progesterona o ionóforo de calcio (A23187). Estos resultados sugieren que el problema de infertilidad se vincula con un defecto en el mecanismo de fusión de membranas que ocurre durante la reacción acrosomal.

296. (12643) REGULACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSOMAL MEDIADA POR ÁCIDO GLUTÁMICO. SORIA, MARIANA G; SELTZER, ALICIA M; FORNÉS, MIGUEL W

IHEM (Instituto de Histología y Embriología de Mendoza) FCM-UNCuyo

El Ácido Glutámico (Glu) es un aminoácido que actúa como neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central utilizando dos tipos de receptores (Rc): Ionotrópicos (AMPA/Ácido Kaínico

y NMDA) y Metabotrópicos (mGluRs). Si bien los Rc no han sido descritos en espermatozoides, hemos informado en comunicaciones previas las acciones del Glu en esta célula por lo que nos interesa la detección de sus Rc. El Glu promueve la reacción acrosomal (RA) en concentraciones μM . Utilizamos anticuerpos anti mGluR2/3 y anti mGluR5/1, dentro de la serie de los Rc metabotrópicos; y anti pan-NMDA NR1 y anti NMDAR-2C para localizar los distintos segmentos de los receptores del Glu en homogenados de espermatozoides de ratón por Western Blot. Como controles se utilizaron homogenados de Corteza Cerebral (CC) e Hipocampo (Hipo) de ratas. Se detectaron: dos bandas en espermatozoides para el anticuerpo anti NMDAR2C, que coinciden en CC e Hipo, tres bandas para el anticuerpo anti mGluR2/3, vistas en CC, dos bandas para el anticuerpo anti mGluR5/1 expresado en CC e Hipo. No se observaron bandas para NMDAR1 en los espermatozoides, pero sí en cerebro. Con inmunohistoquímica se localizó NMDAR-2C en el dorso del acrosoma y en forma dispersa en la totalidad del acrosoma para los receptores mGluR2/3 y mGluR5/1. Se demostró la presencia de subunidades de los Rc ionotrópicos y metabotrópicos del Glu en espermatozoides sosteniendo la idea de que los efectos del Glu sobre la RA serían específicos y estimulatorios. En la porción ampular de las trompas de Falopio de las hembras se produce generalmente la fecundación, por lo cual se realizaron pruebas de recaptación de Glu en esa zona, que dieron positivas. Para tal fin se usó glutamato 3-H. La RA fue estimulada con Glu. La movilización de Ca^{2+} intracelular luego del agregado de Glu a los espermatozoides, fue significativa. La estimulación de la RA con AMPA fue más notable que con Ácido Kaínico. Los espermatozoides comparten Rc para Glu con el Sistema Nervioso Central. El tejido ampular respondió a la liberación de Glu intracelular.

297. (12651) GENERACIÓN DE RATONES KNOCK OUT PARA LA PROTEÍNA EPIDIDIMARIA "DE/CRISP-1" QUE PARTICIPA EN EL PROCESO DE FERTILIZACIÓN. DA ROS, V (1); MALDERA, J (1); WILLIS, W (2); GOULDING, E (2); GELMAN, D (3); RUBINSTEIN, M (3); EDDY, EM (2); CUASNICU, P (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Bs As, Argentina. (2) National Institute of Environmental Health Science, NIH, NC, USA. (3) Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular, Bs As, Argentina

La proteína epididimaria "DE/CRISP-1" participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios de unión en el ovocito. Con el fin de investigar su relevancia para la fertilidad, iniciamos un proyecto de generación de ratones knock out para DE/CRISP-1. Para ello, se construyó un vector conteniendo dos regiones homólogas al gen *crisp-1*, ambos fragmentos obtenidos a partir de una biblioteca genómica de ratón de la cepa 129/Sv. El vector contuvo, además, dos genes que confieren selección negativa y positiva, este último insertado entre ambos brazos de homología. La construcción obtenida fue electroporada en células embrionarias totipotenciales de ratón 129/Sv seleccionándose las células resistentes a G418 y ganciclovir. La ocurrencia de recombinación homóloga entre el vector y el gen *crisp-1*, y por ende la interrupción del gen, fue determinada mediante Southern Blot y PCR sobre ADN genómico aislado de dichas células. Se obtuvieron 2 clones independientes, los cuales fueron microinyectados en blastocistos de ratón C57BL/6, que luego fueron transferidos al útero de hembras pseudopreñadas. Como resultado, nacieron 12 quimeras, de las cuales 3 machos, apareados con hembras C57BL/6, generaron animales heterocigotas para la mutación de *crisp-1*. La cruzada entre ratones heterocigotas produjo animales knock out, en los cuales se corroboró la ausencia de DE/CRISP-1 en el epidídimo por ensayos de Western Blot. La obtención de estos animales, que representa la primera generación de animales knock out para una proteína identificada en nuestro país, no sólo permitirá en breve esclarecer la relevancia de DE/CRISP-1 para la fertilidad, sino que contribuirá al futuro desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad y de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad.

REPRODUCCION B

298. (11996) EL ESTIMULO COLINÉRGICO MODULA LA LIBERACIÓN DE ESTEROIDES OVÁRICOS EN RATAS EN DIESTRO. VEGA, ADRIANA; SOSA, ZULEMA YOLANDA; RASTRILLA, ANA MARIA

Lab. de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis

Al ovario llegan troncos nerviosos constituidos por axones de neuronas postganglionares que se originan en su mayoría en la cadena simpática vertebral y constituyen entre otros el Plexo nervioso ovárico (PNO) que acompaña a la arteria ovárica e inerva los vasos sanguíneos. El objetivo del presente trabajo fue a) estudiar el efecto colinérgico sobre el Ganglio Mesentérico superior (GMS) respecto a la liberación de esteroides ováricos, en el sistema ex-vivo GMS-PNO-Ovario en ratas en Diestro I y II (DI y II) y b) comprobar la viabilidad del sistema mediante estudio histológico. Para ello se utilizó una cuvetta con dos compartimientos. Se adicionó Acetilcolina como agonista colinérgico en concentración final $10(-6)M$ en el compartimiento ganglionar y se determinaron Progesterona (P4), androstenediona (A2) y estradiol (E2) en el medio de incubación ovárico por RIA a los 15, 30, 60, 120 min. Estadística: test de Student y ANOVA-Duncan con una significancia de $p < 0.05$. Los resultados se expresan en pg/mg ovario \pm SEM. DI: sistema izquierdo P4 y A2 aumentaron significativamente en todos los tiempos estudiados ($p < 0.001$). Sistema derecho en iguales condiciones solo aumentó E2 ($p < 0.05$). DII, sistema izquierdo: P4 aumentó en todos los tiempos estudiados ($p < 0.001$) e inhibió en el sistema derecho a los 120 min ($p < 0.05$) y sin modificaciones de A2 y E2, en todos los casos respecto al control. Conclusión: Los sistemas derechos e izquierdos responden diferente al estímulo colinérgico ganglionar, progesterona es el esteroide más sensible y estradiol, el menos afectado por factores neurales en la etapa de diestro en el sistema en estudio.

299. (12142) MECANISMO DE ACCIÓN DE LA METFORMINA EN EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO. ELIA, EVELIN; LUCHETTI, CAROLINA; SANDER, VALERIA; SOLANO, MARIA EMILIA; DI GIROLAMO, GUILLERMO; GONZALEZ, CLAUDIO; MOTTA, ALICIA BEATRIZ

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO), Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de acción de la metformina (M) en el tratamiento del Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS). Se utilizó un modelo de PCOS inducido en ratones hembras prepúberes BALB/c, mediante hiperandrogenización con dehidroepiandrosterona (DHEA: 120 mg/Kg por día, sc) por 20 días. Ya que en estudios previos vimos que el tratamiento con M (50 mg/100 g peso, administrada en forma oral por cánula) de ratones con PCOS inducida: i) normalizaba parámetros endocrinos e inmunes alterados ii) disminuía el estrés oxidativo ovárico y las prostaglandinas (PGs) incrementados por DHEA y aumentaba la sensibilidad a insulina, disminuida por DHEA y dado que iii) en otros tejidos la M actúa vía la quinasa activada por AMPc (AMPK), analizamos la expresión de las enzimas ováricas: óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la ciclooxigenasa inducible (COX2, que sintetiza PGs) y la AMPK. Mediante la técnica de Western Blot vimos que la DHEA inducía un aumento del 46% en la expresión de iNOS (115+3 en unidades arbitrarias de intensidad/área:ua; vs control: 79 + 4ua) mientras que el tratamiento con M revirtió parcialmente este efecto (33%, 105+4ua). La expresión de COX2, aumentó con DHEA (20%, 154+4ua vs controles 128+3ua), mientras que el tratamiento con M inhibió la expresión de la proteína COX2 (117+5ua). Finalmente, la DHEA incrementó la expresión de AMPK ovárica (17%:94+2ua, controles: 80+2ua) mientras que la M amplificó el efecto (26%, 101+2ua). La M, tal como se vió en otros tejidos, mo-

dula especies reactivas del nitrógeno del ovario mediante regulación de la expresión de la proteína iNOS. Modula las PGs por acción sobre la COX2, e incluso podríamos sugerir que interveniría en la retroalimentación negativa por la cual las PGs regulan su propia síntesis. Finalmente, como en otros sistemas, la M utilizaría la vía de AMPK mediante la cual incrementa la sensibilidad a insulina por el ovario.

300. (12255) ACTIVIDAD ENDOCRINA Y REGULACIÓN HORMONAL DE FOLÍCULOS ANTRALES TEMPRANOS EN CULTIVO. ANDREONE, LUZ (1); VELÁSQUEZ, ETHEL(3); PARBORELL, FERNANDA(2); ABRAMOVICH, DALHIA(2); AMBAO, VERÓNICA(1); CROXATTO, HORACIO(3); TESONE, MARTA(2); CAMPO, STELLA(1)

(1) CEDIE, (2) IBYME, Buenos Aires, Argentina; (3) ICMER, Santiago, Chile.

El cultivo de folículos ováricos es un buen modelo para estudiar su regulación hormonal, ya que mantiene intacta su arquitectura y relación entre los distintos tipos celulares. El objetivo de éste trabajo fue evaluar la capacidad de producir estradiol (E[2]), activina A (actA) e inhibinas: Pro-alfaC (Pro-aC), A (inhA) y B (inhB) en folículos antrales tempranos. Folículos de ratas prepúberes tratadas con DES se aislaron por microdissección y se cultivaron durante 24 hs en condiciones basales y en presencia de androstenediona (A, 25 μM), progesterona (P, 10 $\mu g/ml$), 25OH-colesterol (25OH-col, 10 $\mu g/ml$), FSHrh (25 y 50 ng/ml) y sus isoformas con diferente estructura de oligosacáridos (DR y FR, 25 ng/ml) aisladas en Concanavalina A. Se determinó E[2] por RIA; actA, Pro-aC, inhA e inhB por ELISAs específicos. En condiciones basales, la producción fue: E[2]= 75 \pm 18 pg/ml y aumentó significativamente con A, P, FSHrh (50 ng/ml) y DR (P<0.001, 0.01, 0.05 y 0.01, respectivamente); actA= 1.1 \pm 0.1 ng/ml y aumentó significativamente con FSH y sus isoformas DR y FR (P<0.05); Pro-aC= 2320 \pm 261 pg/ml y aumentó significativamente con DR (P<0.01); inhA= 695 \pm 30 pg/ml y aumentó significativamente con FSHrh; DR y FR (P<0.05); inhB= 3486 \pm 726 pg/ml y no se modificó con FSHrh o sus isoformas. El 25OH-col fue el estímulo más potente para la producción de todas las inhibinas (Pro-aC, inhA e inhB= 2.3, 2 y 1.9 veces respecto del basal respectivamente, P<0.05); FSHrh y sus isoformas no aumentaron este efecto. Conclusión: en folículos antrales tempranos en cultivo la producción de E[2], Pro-aC, e inhA es estimulada por FSH dependiendo de su biopotencia. La A y P son sustratos eficientes de la producción de E[2] basal y estimulada con FSH, no observándose este efecto con 25OH-col. Por el contrario, en ausencia de FSH, el 25OH-col o un derivado esteroideo no identificado estimula la producción de inhibinas.

301. (12329) MECANISMOS DE REGULACION DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBUROS (AHR) EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA (GC) DE RATA. BUSSMANN, URSULA; BARAÑO, LINO

Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET.

El AHR está involucrado en varios procesos celulares y juega un importante rol en el ovario. Hemos reportado que la expresión de la proteína AHR es disminuida por el agonista β -naftoflavona (β -NF) y por señales mitogénicas en GC de rata. El objetivo de este trabajo fue determinar los mecanismos por los que dichos compuestos regulan la expresión del AHR en ese sistema. Para esto, se evaluó sus niveles por WB en cultivos de GC tratados por distintos tiempos con β -NF (10 μM) sola o en combinación con el antagonista a-naftoflavona (a-NF 1 μM) o con el inhibidor proteosomal lactacistina (20 μM), tanto en condiciones control (C) como con FSH (F 2ng/ml) y estradiol (E2 100ng/ml). Se determinó la acción de dichas hormonas sobre el mismo parámetro. A su vez, se evaluó por RT-PCR semicuantitativa el efecto de estos tratamientos sobre la expresión del mRNA del Ahr. β -NF disminuyó drásticamente los niveles de proteína AHR, produciendo a las 48h de estimulación disminuciones del (97.86 \pm 0.46)% en

condiciones C, (93.7±1.8)% en presencia de F y (83.5±2.0)% en presencia de F+E2 ($p<0.001$). Esta acción no se modificó por el co-tratamiento con α -NF, fue reproducida por ésta y fue revertida por lactacistina. Efectos comparables pero de menor magnitud se observaron ya a las 6h de cultivo con β -NF ($p<0.001$). F y E2 inhibieron la expresión de la proteína AHR sólo a las 48h de estimulación: (58.1±4.3)% de inhibición con F y (83.7±8.1)% con F+E2 ($p<0.001$). A nivel del mRNA para el Ahr solo existieron diferencias significativas ($p<0.05$) a las 48h de cultivo, donde β -NF estimuló su expresión (1.8±0.3) veces (efecto reversible por α -NF) y F+E2 disminuyeron los niveles de los mismos un (45.8±4.2)%. Estos resultados indican que β -NF disminuye rápidamente la expresión de proteína AHR por degradación proteosomal gatillada por ligando, a la vez que estimula la expresión del mRNA a tiempos largos. En cambio, la inhibición de expresión del AHR por hormonas mitogénicas en GC de rata se da sólo a tiempos largos y es por disminución de sus transcritos.

302. (12484) PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LA LUTEÓLISIS EN LA RATA: EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO. HAPON, MARÍA BELÉN; MOTTA, ALICIA BEATRIZ (1); EZQUER, MARCELO EDUARDO; JAHN, GRACIELA ALMA

LARLAC-IMBECU, CRICYT, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)

El desencadenamiento del parto se produce luego de la caída de progesterona (Pg) circulante. El cuerpo lúteo, única fuente de Pg en la rata durante la preñez, expresa la enzima 20 hidroxisteroide deshidrogenasa (20aHSD) que convierte la Pg a un metabolito biológicamente inactivo, 24 hs antes del parto, desencadenando la luteólisis funcional. Recientemente encontramos que el hipotiroidismo (hipoT) retrasa la caída de Pg circulante, el aumento en la expresión de RNAm de 20aHSD luteal y el parto. Nuestro objetivo fue estudiar el mecanismo por el que el hipoT retrasa la luteólisis, determinando la expresión de factores involucrados en la síntesis y degradación de Pg y los niveles intraluteales y séricos de Pg, prostaglandinas F2a (PGF2a) y E2 (PGE2). Se usaron ratas Wistar tratadas crónicamente con el antitiroideo propiltiouracilo (PTU) (0,1 g/L en el agua de bebida) en los días 19 (G19) y 21 (G21) de preñez y 2 de lactancia (L2). Se midió por RT-PCR la expresión relativa a L19 de StaR, Cyt P450scc, COX-2, receptor de PG F2a e iNOS y por Western blot la expresión de la 20aHSD. Las hormonas séricas (PGF2a, PGE2) e intraluteales (PGF2a, PGE2 y Pg) se midieron por RIA. Encontramos valores séricos elevados de PGE2 todos los días estudiados ($p<0.05$). En G21 hubo aumentos en PGE2 (Co: 326 ± 16 vs hipoT: 1449 ± 86) y Pg intraluteales (Co: 24.2 ± 2.8 vs hipoT: 42.0 ± 6.4), PGF2a disminuyó en suero (Co: 46.7 ± 2.2 vs hipoT: 39.1 ± 2.5) y en CL (Co: 130.3 ± 13.9 vs hipoT: 39.0 ± 1.6). La 20aHSD disminuyó en G21 (Co: 1.58 ± 0.14 vs hipoT: 0.30 ± 0.09) ($p < 0.05$), mientras que los demás factores no cambiaron. La iNOS cayó en G21 (Co: 0.50 ± 0.04 vs hipoT: 0.32 ± 0.05) El hipoT atrasa el catabolismo de Pg, reduciendo la expresión de 20aHSD a nivel transcripcional y posttranscripcional posiblemente a través del aumento de PGE2 (luteotrófica), la caída de PGF2a (luteolítica) y la menor expresión de iNOS, fenómenos que a su vez serían los responsables del retraso en la luteólisis y el parto.

303. (12602) INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS EN EL OVARIO FETAL DE LAGOSTOMUS MAXIMUS. JENSEN, FEDERICO; LEOPARDO, NOELIA; ESPINOSA, MARÍA BEATRIZ; VITULLO, ALFREDO

CEBBAD-Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnósticos, Univ. Maimónides

Tempranamente en el desarrollo de mamíferos, las células germinales primordiales (CGP) migran hacia las gónadas primitivas. Allí, proliferan rápidamente incrementando significativamente su número. Posteriormente el número de células germinales se reduce dramáticamente casi a la mitad por medio de mecanismos

apoptóticos. Se postuló que la familia de proteínas BCL-2 son las responsables del establecimiento del pool de folículos primordiales. *L. maximus* presenta poliovolución masiva en el ovario adulto (400-800 oocitos por ciclo) que podría tener su origen en un pool oocitario al nacimiento incrementado por supresión de apoptosis ovárica fetal. Por esto se estudió la dinámica de formación del pool oocitario en distintos periodos getacionales, 2,5, 3,5 meses y a término. La presencia de CGP se verificó por la expresión del marcador específico VASA; la entrada en meiosis por expresión de proteínas del complejo sinaptonémico, Scp-3. Se analizó la expresión de los genes BCL-2/BAX, y la integridad/fragmentación del ADN por TUNEL. Se encontró una alta expresión de VASA en todo el tejido ovárico a los 2,5 y 3,5 meses de gestación, indicando una amplia colonización, mientras que a término la expresión se restringe a la región cortical. Entre los 2,5 y 3,5 meses, se produce la entrada en meiosis de las CGP, con alta expresión de Scp-3. El escaso nivel de positividad para TUNEL indicó una marcada supresión de apoptosis, junto con una elevada expresión de BCL-2. Finalmente, concluimos que en *L. maximus*, a diferencia de otros mamíferos, la apoptosis está abolida en el desarrollo ovárico, a su vez el nivel de proliferación de las CGP está exacerbado, particularmente en los primeros meses de gestación. De este modo el ovario perinatal presenta un pool oocitario incrementado que daría sustento a la poliovolución masiva que caracteriza a esta especie.

304. (12632) LOCALIZACIÓN TISULAR DEL HOMÓLOGO DE ZPA Y CONVERSIÓN DE ENVOLTURA VITELINA EN ENVOLTURA DE FECUNDACIÓN EN OVOCITOS DE BUFO ARENARUM. SCARPECI, SONIA; ALBERTALI, ISABEL; SANCHEZ, MERCEDES; CABADA, MARCELO

Area Biología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR. División Biología del Desarrollo. IBR-CONICET

Los ovocitos maduros de anfibios se encuentran rodeados de una envoltura glicoproteica, llamada envoltura vitelina (EV), que les confiere especificidad de especie y protección. Luego de la fecundación, la EV se convierte en envoltura de fecundación (EF) por la actividad de moléculas contenidas en los gránulos corticales (CGC) del ovocito. La modificación implica un bloqueo a la penetración por otros espermatozoides lo que se correlaciona con la proteólisis específica de uno de sus componentes, ZPA. En *Xenopus laevis* la proteólisis se produce en el extremo N-terminal de la proteína XIZPA que sólo se expresa en ovario escindiéndose un péptido de 27 aminoácidos que queda unido por puentes disulfuro. Previamente informamos que la actividad enzimática del CGC sobre ZPA induce un aumento en su movilidad electroforética en condiciones reductoras. Nuestro objetivo es estudiar la localización tisular del ARNm de BaZPA y la conversión proteolítica de la EV en EF en particular desde la identificación del factor activo de CGC y la modificación que sufre BaZPA. Para ello se realizaron ensayos de Northern blot utilizando ARN de diversos tejidos de *B. arenarum*. Para caracterizar la actividad de CGC se efectuaron zimografías, y se generaron anticuerpos contra 5 componentes mayoritarios de CGC a fin de realizar pruebas biológicas de inhibición de la capacidad proteolítica. Se observó que los anticuerpos policlonales contra los componentes de CGC inhiben la actividad proteolítica en ensayos in vitro. Muestras de EV y EF fueron analizadas en SDS-PAGE con y sin agentes reductores observándose que en condiciones no reductoras BaZPA de EF enfoca a la misma altura que la de EV. BaZPA se expresa únicamente en ovario. El factor responsable del ataque proteolítico sobre BaZPA sería alguna de las proteínas purificadas de CGC. El péptido escindido por acción del CGC permanece unido a BaZPA por puentes disulfuro intracatenarios.

305. (12658) EL AMBIENTE ANDROGÉNICO DE LOS ESPLENOCITOS MODIFICA LA CAPACIDAD ESTEROIDOGÉNICA DEL OVARIO POLIQUÍSTICO EN RATAS.

FORNERIS, MYRIAM LILIANA; ROSALES, ELIANA; OLIVEROS, LILIANA

Lab. Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis. mfor@unsl.edu.ar

Con anterioridad mostramos que la esteroidogénesis del ovario poliúístico en rata (SOP) está bajo una regulación neu-roimmune por las secreciones de esplenocitos (Es) a través de la conexión neural que involucra el ovario, ganglio celíaco y al bazo. Aquí, estudiamos si el ambiente androgénico, propio del SOP, afecta la capacidad esteroidogénica de Es sobre el ovario SOP. Para ello 1 x 10(6) Es controles, no SOP (C) fueron cultivados por 24 hs en medio RPMI en presencia de testosterona (T) 10(-6) M y T 10(-6) M + Flutamida (Flu) 10(-4) M (antagonista receptor andrógeno- RA). Con sus secreciones, al igual que la de Es SOP, se incubaron por 3 hs ovarios SOP para determinar la liberación de Progesterona (P), Androstenediona (A) y Estradiol (E). El SOP fue inducido en ratas de 60 días de edad por inyección de valerato de estradiol (2 mg/rata). Se determinó la expresión del RA en los Es por RT-PCR. Las secreciones de Es C+T produjeron el mismo efecto que las de Es SOP: disminuyeron la liberación de E y A ($p < 0.001$), acompañado de una menor expresión del RA, sin modificación en P. La Flu revirtió la disminución de E y A. El ambiente androgénico de los ES modifica su capacidad esteroidogénica mediado por los RA. Posiblemente esta vía regularía a nivel periférico la funcionalidad del SOP.

306. (12661) APOPTOSIS EN EL OVARIO FETAL HUMANO Y PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES BCL-2 Y BAX.

ALBAMONTE, MIRTA SUSANA; GALEANO*, SILVIA; JENSEN, FEDERICO; ESPINOSA, MARIA BEATRIZ; VITULLO, ALFREDO DANIEL

*CEBBAD. Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnósticos. Universidad Maimónides. Buenos Aires. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Merlo, Merlo, Buenos Aires.*

Estudios en ratón y rata han mostrado que la sobreexpresión de Bax, acompañada de una expresión constitutiva de Bcl-2 determina la pérdida de una gran número de oogonias en el ovario fetal y define la amplitud del pool oocitario al nacimiento. En humanos, esta pérdida alcanza el 99% de las oogonias. La expresión de BCL-2/BAX en humanos ha sido documentada por otros en un escaso número de muestras. En el presente trabajo describimos la expresión de BCL-2/BAX y la presencia de apoptosis por TUNEL en una muestra de 8 ovarios fetales entre la semana 12 y 28 de gestación. La expresión de la proteína BCL-2 fue positiva en las muestras más jóvenes, 12 y 16 semanas, en tanto que BAX fue positiva desde la semana 12 y se mantuvo hasta la semana 28. La presencia de positividad para TUNEL se manifestó notoriamente a partir de la semana 20. En concordancia con otros autores, el balance en la expresión BCL-2/BAX es responsable de la pérdida masiva de células germinales durante la vida prenatal. Los resultados obtenidos concuerdan con observaciones previas. No obstante, la documentación sobre la pérdida de células germinales en la vida fetal aún es numéricamente pobre. Las diferencias entre las distintas observaciones indicarían un grado considerable de variabilidad individual en la regulación de la apoptosis durante la gestación, en humanos.

307. (12673) EXPRESIÓN DE BCL-2/ BAX Y APOPTOSIS EN OVARIO HUMANO ADULTO. ALBAMONTE, MIRTA SUSANA; ELIZONDO, KARINA*; ALBAMONTE, MARIA ITATI; WILLIS, MIGUEL; ESPINOSA, MARÍA BEATRIZ; VITULLO, ALFREDO DANIEL

*CEBBAD. Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnósticos. Universidad Maimónides. Buenos Aires. Argentina. *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Rivadavia, Buenos Aires*

El proceso de apoptosis puede actuar para determinar la "selección" entre los folículos que están destinados a la atresia y

aquellos que van a permanecer disponibles para ser ovulados. El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de apoptosis en los folículos ováricos humanos en distintos estadios de la foliologénesis: folículo primordial, primario, secundario y antral. Se emplearon cortes histológicos de ovarios adultos de mujeres entre 18 y 48 años que fueron analizados por TUNEL y por inmunohistoquímica para BCL-2/BAX. Los folículos fueron clasificados según el criterio de Gougeon. TUNEL fue positivo en las células de la granulosa de folículos antrales, y resultó negativo en folículos primordiales, primarios y secundarios. Se detectó expresión notoria de BCL-2 en la hilera de células de la granulosa de folículos antrales y de folículos secundarios. En cambio no se detectó en los primeros estadios de la foliologénesis. La expresión de BAX fue claramente positiva en las células de la granulosa y teca de los folículos antrales y menos notoria la señal en folículos primordiales, primarios y secundarios. La presencia de la proteína BAX se mantuvo a lo largo de la foliologénesis. La expresión de las proteínas relacionadas al mecanismo de muerte celular programada se detecta a lo largo de la foliologénesis siendo más notoria la expresión de BCL-2 en estadios más tardíos de la misma a diferencia de BAX que se mantiene desde los estadios más tempranos. Los signos de apoptosis se concentran en el estadio antral teniendo como sustrato las células somáticas. Los resultados obtenidos demuestran que la apoptosis es un proceso clave en la regulación de la sobrevida o la muerte de la reserva folicular.

308. (12680) EFECTO DEL TAMAÑO FOLICULAR SOBRE LA DISTRIBUCIÓN Y LA LOCALIZACIÓN DEL APARATO DE GOLGI, APARATO DE GOLGI FOSFORILADO Y EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO DE OVOCITOS BOVINOS. RACEDO, SE(1); ESPAÑOL, A (2); SALAMONE, DF (1); RAWE, VY (2)

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, UBA. Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR)

La capacidad de desarrollo a blastocisto luego de la fertilización in vitro o activación partenogénica de ovocitos bovinos provenientes de folículos menores a 2 mm de diámetro está disminuida respecto a los ovocitos provenientes de folículos de mayor tamaño. Su maduración citoplasmática influye directamente sobre el grado de desarrollo que alcance el embrión e incluye eventos tales como la redistribución del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico, entre otros. El objetivo de este trabajo fue evaluar la distribución y la localización de estas organelas durante la maduración in vitro de ovocitos bovinos provenientes de folículos de distintos tamaños. Se obtuvieron los complejos ovocito-células del cúmulus (COCs) desde ovarios del matadero local. Se punzaron y aspiraron folículos de 2 mm a 8 mm y < 2 mm, se seleccionaron y fijaron los ovocitos a 0 hs. de maduración in vitro (estadio de vesícula germinal, VG) y luego de 24 hs. de cultivo en condiciones estándares de maduración (estadio de metafase II, MII). Se detectaron por inmunofluorescencia el sistema de vesículas de Golgi (GM130), Golgi fosforilado (PS25) y el retículo endoplásmico (Calreticulina). El ADN se visualizó con TOTO-3. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal espectral Olympus. Se observaron diferencias importantes en la distribución de estas organelas en los ovocitos provenientes de folículos pequeños comparados con el grupo control provenientes de folículos de mayor tamaño. Encontramos diferencias en los ovocitos en VG y MII, lo cual sugiere que existen desarreglos o anomalías estructurales desde estadios madurativos tempranos en los ovocitos de folículos pequeños. Estos estudios nos brindan un mayor conocimiento sobre la estructura celular de estos ovocitos y nos permiten entender su bajo potencial de desarrollo embrionario.

309. (12709) ESTUDIO DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE LA VARIANTE -16C>T DEL GEN DE LA INHIBINA ALFA (INH1/2) Y LOS NIVELES CIRCULANTES DE INHI-

BINAS. SUNDBLAD, VICTORIA; CHIAUZZI, VIOLETA (1); ANDREONE, LUZ (2); CAMPO, STELLA (2); CHARREAU, EDUARDO (1,3); DAIN, LILIANA (1, 4)

(1) *Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET.*
(2) *Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños R. Gutiérrez;* (3) *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA;* (4) *Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS).*

La falla ovárica prematura (FOP) es un síndrome heterogéneo de etiología generalmente desconocida. Si bien se ha sugerido que alteraciones en los genes de inhibina podrían conducir al desarrollo de FOP, resultados genéticos previos de nuestro laboratorio sugerirían que las variantes -16C>T y 769G>A del gen *INH1A* no estarían asociadas a FOP. En este trabajo analizamos si los diferentes genotipos del polimorfismo -16C>T podrían estar asociados a variaciones en los niveles circulantes de inhibinas. Se estudiaron 46 mujeres menores de 40 años, con ciclos regulares, sin antecedentes familiares de FOP ni de enfermedades autoinmunes, y que no estuvieran tomando anticonceptivos hormonales. Se obtuvieron dos muestras de sangre de cada voluntaria, una en la fase folicular media y otra en la fase lútea media. Para la genotipificación, a partir de ADN se amplificó la región de interés por PCR y el producto fue digerido con *SpeI*. Los valores de inhibina A, inhibina B y Pro- α C se determinaron en las muestras de suero por ELISA. La variante alélica T fue considerada el posible factor de riesgo. Las muestras fueron separadas en dos grupos: 1) genotipo CC (n=34) y 2) genotipos CT + TT (n=12). No hallamos diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos grupos al comparar los valores de Pro- α C e Inhibina B de la fase folicular media (CC: 146.30 ± 18.80 pg/ml vs. CT+TT: 210.55 ± 44.63 y CC: 134.90 ± 12.63 vs. CT+TT: 130.44 ± 20.85 , respectivamente) y de Pro- α C e Inhibina A de la fase lútea media (CC: 671.01 ± 68.61 pg/ml vs. CT+TT: 768.06 ± 86.44 y CC: 38.09 ± 3.92 vs. CT+TT: 42.73 ± 7.86 , respectivamente). Los resultados indicarían que la producción de inhibinas no se vería afectada por las variantes alélicas de este polimorfismo. Considerando estos hallazgos en conjunto con los resultados genéticos previos, sugerimos que el polimorfismo -16C>T del gen *INH1A* no estaría involucrado en el desarrollo de FOP.

310. (12723) INHIBIDORES DE LA OXIDO NITRICO SINTETASA EN GANGLIO CELIACO MODIFICAN EL OXIDO NITRICO EN OVARIO DE RATA PREPUBER. DELGADO, SILVIA; CASAS, MARILINA; VALCANERAS, SANDRA; SOSA, ZULEMA; RASTRILLA, ANA MARIA

Lab. de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis. Email: sdelgado@unsl.edu.ar

Estudios previos demostraron usando el sistema Ganglio Celíaco-Nervio Ovárico Superior-Ovario (GC-NOS-O), que el estímulo colinérgico ganglionar aumenta la liberación de Oxido Nítrico (ON) en ovario. Es sabido que este neurotransmisor gaseoso ejerce diversas funciones biológicas asociadas a la reproducción. Su enzima de síntesis la Oxido Nítrico Sintetasa (ONS), presenta dos isoformas una constitutiva (ONSc) y otra inducible (ONSi). En las ratas, la ONSi está localizada entre otros tejidos en ovario inmaduro e induce la esteroidogénesis. Objetivo: estudiar en rata prepúber si la presencia en GC de inhibidores de la ONS, modifica la liberación de ON en la celda ovárica, incrementada por acción colinérgica ganglionar. Se evaluó los nitritos (metabolito soluble del ON) cuando se adicionó en la celda ganglionar: a) L-NAME 100 μ M (inhibidor no selectivo); b) Aminoguanidina (inhibidor selectivo de la ONSi) 400 y 800 μ M; c) Acetilcolina 10-6 M (ACh) + L-NAME y d) ACh 10-6 M + AG en las dos concentraciones. Los resultados se relacionaron con los valores basales y con la adición de ACh 10-6 M en el ganglio. Estadística: se aplicó test de Student y ANOVA con una significancia de $p < 0.05$. Resultados: a- La adición del inhibidor no selectivo L-NAME y selectivo AG en GC inhibió la liberación de nitritos en ovario con y sin ACh en GC. b- La respuesta inhibitoria de AG fue dosis dependiente ($p < 0.001$). Conclusiones: según los resultados con L-NAME, al

menos en parte, el ON presente en el compartimento ovárico es aportado por el GC. La AG en mayor concentración mostró un claro efecto inhibitorio sobre la presencia de ON en ovario, aún con el estímulo de ACh en GC. Se demuestra así, por primera vez de manera fisiológica, la isoforma inducible en GC y el aporte de ON desde el GC al ovario a través del NOS.

311. (12733) IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CIRCULANTES ANTI-ENOLASA-ALFA EN PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA (FOP). SUNDBLAD, VICTORIA; CHIAUZZI, VIOLETA (1); BUSSMANN, LEONARDO (1); CHARREAU, EDUARDO (1, 2)

(1) *Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET.*
(2) *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA.*

La detección de anticuerpos circulantes dirigidos contra antígenos ováricos es uno de los principales elementos en la identificación de la etiología autoinmune de la Falla Ovárica Prematura (FOP). En estudios previos, mediante Western-blots y utilizando como antígenos proteínas citosólicas de ovarios humanos, detectamos reacción positiva contra una proteína de peso molecular aproximado de 50 kDa, en el 19,1% de un grupo de 110 pacientes FOP. El análisis del antígeno ovárico, previamente purificado por cromatografía de afinidad y de intercambio catiónico, mediante espectrometría de masa reveló la presencia de la enolasa-alfa. El objetivo del presente trabajo es confirmar a esta proteína como el antígeno hacia el cual estarían dirigidos los anticuerpos antiovario en las pacientes estudiadas. Se realizaron Western-blots utilizando enolasa-alfa recombinante humana como antígeno, y diluciones de los diferentes sueros como primer anticuerpo. Catorce de los 21 sueros provenientes de pacientes FOP que poseían anticuerpos anti-ovario, 22 de los 89 sueros de pacientes FOP que no poseían anticuerpos anti-ovario y 24 de los 60 sueros provenientes de controles fueron utilizados para la determinación de anticuerpos anti-enolasa-alfa. En el 100 % de los sueros estudiados observamos concordancia entre los resultados de anticuerpos anti-ovario y anticuerpos anti-enolasa-alfa. Los resultados confirmarían a la proteína enolasa-alfa como el antígeno hacia el cual estarían dirigidos los anticuerpos anti-ovario en un subgrupo de pacientes FOP. La determinación de estos anticuerpos podría significar un aporte importante para el diagnóstico de la falla ovárica prematura de origen autoinmune.

REPRODUCCION C

312. (12119) AGONISTAS DEL RECEPTOR NUCLEAR PPARDELTA MODULAN LOS NIVELES DE FOSFOLÍPIDOS Y DE PGE2 EN LA EMBRIÓN DE RATA SANA Y DIABÉTICA DURANTE LA ORGANOGÉNESIS TEMPRANA. TEMPRANA. HIGA, R; GONZALEZ, E; WHITE, V; CAPOBIANCO, E; PUSTOVRH, C; MARTINEZ, N; JAWERBAUM, A

CEFyBO-CONICET-UBA

La diabetes materna induce malformaciones congénitas, entre ellas defectos en el cierre del tubo neural. Estos defectos se inducen en la organogénesis temprana, período en el que se expresa PPARdelta (regulador del metabolismo lipídico en diversos tipos celulares), y mediante un mecanismo en el cual se encuentra involucrada la prostaglandina E2 (PGE2). El objetivo del presente trabajo fue determinar si agonistas de PPARdelta regulan los niveles de lípidos y de PGE2 en embriones de rata sana (ES) y diabética (ED) durante la organogénesis temprana y determinar los niveles embrionarios de PGI2, agonista endógeno de PPARdelta. Metodología: La diabetes se indujo por administración de estreptozotocina (50 mg/kg) cinco días antes del apareo. Embriones obtenidos en día 10.5 de preñez se incubaron en presencia de carboxiprostaciclina (cPGI2, análogo estable de PGI2, 1 μ M) o de prostaglandina A1 (PGA1, 2 μ M) ambos agonistas de PPARdelta. Los niveles de lípidos se dosaron mediante TLC y

densitometría. Los niveles de PGE2 se midieron por RIA y los de PGI2 por EIA. Resultados: La adición de cPGI2 incrementa los niveles de fosfolípidos en EC (51%, $p < 0.005$) y ED (54%, $p < 0.01$) y no modifica los niveles embrionarios de triglicéridos ni de colesterol. La adición de cPGI2 incrementa los niveles de PGE2 en EC (196%, $p < 0.01$) y ED (68%, $p < 0.05$). Los niveles de PGE2 embrionaria y de fosfolípidos son también estimulados por PGA1, el otro agonista de PPARdelta empleado. Los niveles de 6-keto-PGF1alfa, metabolito estable de PG2 se encuentran disminuidos en ED (54%, $p < 0.01$) respecto a EC. Conclusiones: La activación de PPARdelta induce un incremento en los niveles de fosfolípidos y de PGE2, moléculas lipídicas necesarias durante el cierre del tubo neural. En la diabetes materna, los defectos observados en dicho proceso podrían vincularse a los menores niveles embrionarios de PGI2, ligando endógeno de PPARdelta.

313. (12207) 15-DEOXYDELTA12,14PROSTAGLANDINA J2 MODULA LA SÍNTESIS LIPÍDICA EN PLACENTAS DE PACIENTES SANAS Y DIABÉTICAS GESTACIONALES. CAPOBIANCO, EVANGELINA; JAWERBAUM, ALICIA; WHITE, VERÓNICA; PUSTOVRH, CAROLINA; MARTÍNEZ, NORA; HIGA, ROMINA; GONZÁLEZ, ÉLIDA

CEFYBO-CONICET-Facultad de Medicina-UBA.

15-deoxydelta12,14prostaglandina J2 (15dPGJ2) es un ligando endógeno del receptor activado por el factor de proliferación peroxisomal gamma (PPARGama), el cual regula la transcripción de genes involucrados en la homeostasis de lípidos y glucosa. La diabetes mellitus afecta el metabolismo lipídico placentario. El objetivo de este estudio fue determinar si 15dPGJ2 es capaz de regular el metabolismo lipídico en placentas de pacientes sanas (PC) y diabéticas gestacionales (PDG). Métodos: las muestras de vellosidades placentarias fueron obtenidas de placentas de PC y PDG a término. El tejido fue incubado por 3 hs en presencia o ausencia de 15dPGJ2 (2×10^{-6} mol/l) para luego evaluar la masa lipídica (TLC y análisis de imágenes) y la síntesis lipídica de novo (determinación de la incorporación de ^{14}C -acetato de sodio). Resultados: En placentas de PDG, la síntesis de ésteres de colesterol (EC) ($p < 0.05$), triglicéridos (TG) ($p < 0.01$), ácidos grasos libres (AGL) ($p < 0.05$) y fosfolípidos (FL) ($p < 0.05$) se encontró disminuida con respecto a la síntesis de dichos lípidos en placentas de PC. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar la masa de los lípidos analizados en placentas de PDG con respecto a PC. La adición de 15dPGJ2 disminuyó la síntesis de TG ($p < 0.05$) y colesterol (COL) ($p < 0.05$) en placentas de PC y PDG. Además, en placentas de PDG 15dPGJ2 también disminuyó la síntesis de EC ($p < 0.01$) y de AGL ($p < 0.01$). 15dPGJ2 no modificó los niveles de lípidos evaluados en ambos grupos. La diabetes gestacional reduce la capacidad de síntesis lipídica del tejido placentario, una vía que sirve para la utilización de lípidos placentarios a partir de fuentes carbonadas, y que es negativamente regulada por 15dPGJ2, agonista de PPARgamma tanto en placentas de PC como de PDG.

314. (12259) EL OXIDO NÍTRICO COMO MODULADOR DE LA ACTIVIDAD DE LAS MMPS EN LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA DIABÉTICA. PUSTOVRH, CAROLINA (1),(2); JAWERBAUM, ALICIA (1); CAPOBIANCO, EVANGELINA (1); WHITE, VERONICA (1); MARTINEZ, NORA (1); HIGA, ROMINA (1); LOPEZ-COSTA, JUAN JOSE (2); GONZALEZ, ELIDA (1)

CEFYBO-CONICET-UBA. Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof E. De Robertis" Facultad de Medicina, UBA

Las metaloproteinasas (MMP) son enzimas involucradas en el crecimiento y la remodelación tisular. La sobreexpresión de estas enzimas en la unidad feto-placentaria de rata diabética ha sido descrita previamente, así como también un incremento en los niveles de óxido nítrico (NO), siendo este agente capaz de activar las proMMPs en diferentes tipos celulares. Objetivo: Evaluar la influencia de NO sobre la actividad de MMP2 y MMP9 en

la unidad feto-placentaria de ratas diabéticas a mediados de la gestación. Metodología: Ratas sanas (C) y diabéticas (D) (por administración neonatal de estreptozotocina) de 14 días de gestación fueron sacrificadas, sus placentas separadas en cara materna (M) y fetal (F) y sus fetos removidos e incubados con o sin adición de nitroprusiato de sodio (NP 600 μ M) y L-NAME (600 μ M). La actividad gelatinolítica fue determinada por medio de zimografía en el sobrenadante de incubación, y la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) fue evaluada in situ por medio de la técnica de NADPH-diaforasa (NADPH-d). Resultados: La actividad NADPH-d se encontró incrementada en la placenta D, principalmente en la zona del laberinto. En la placenta C y D, la adición de NP incrementó la actividad de MMP9 (30%, $p < 0.05$) en la cara materna, mientras que la adición de L-NAME produjo la disminución de la actividad MMP9 y MMP2 en ambas caras, M (22%, $p < 0.05$) y F (20%, $p < 0.05$). En los fetos C y D, la adición de NP incrementó la actividad de MMP2 (30% y 48% respectivamente, $p < 0.01$) mientras que L-NAME redujo la actividad de MMP2 (25% y 40% respectivamente, $p < 0.01$). El NO es capaz de regular la actividad de las MMPs estudiadas. La sobreactivación de estas enzimas puede conducir a procesos anormales de remodelación tisular que afectan tanto el desarrollo de la placenta como del feto en la diabetes.

315. (12284) NIVELES ALTERADOS DE LIPIDOS EN LA UNIDAD FETO - PLACENTARIA DE RATA DIABETICA: EFECTO MODULADOR DE AGONISTAS DE PPARALFA. MARTINEZ, N; JAWERBAUM, A; CAPOBIANCO, E; PUSTOVRH, MC; WHITE, V; HIGA, R; GONZALEZ, E

CEFYBO-CONICET-UBA

La patología diabética induce alteraciones en el metabolismo lipídico materno y afecta el desarrollo feto-placentario. PPARAlfa es un receptor nuclear involucrado en la homeostasis lipídica en diferentes tejidos. Objetivo: Evaluar los niveles de triglicéridos (TG), colesterol (CHO), ésteres de colesterol (ECHOL) y fosfolípidos (PL) y determinar si los agonistas de PPARAlfa regulan el metabolismo lipídico en la unidad feto-placentaria de ratas control (C) y diabéticas (D). Metodología: La diabetes es inducida por administración neonatal de estreptozotocina (90 mg/kg). Los fetos y placentas (día 13,5 de gestación) se incuban en presencia o ausencia de LTB4 (agonista endógeno de PPARAlfa, 0,1 μ M) o clofibrato (agonista farmacológico de PPARAlfa, 20 μ M), los lípidos son evaluados mediante TLC y cuantificados por densitometría. LTB4 es medido por EIA. Resultados: En placenta D se observa un incremento de los niveles de TG (50%, $p < 0.05$) y ECHOL (93%, $p < 0.01$) con respecto al control. En placenta C, LTB4 no modifica los niveles de los lípidos estudiados, sin embargo en placenta D el agregado LTB4 produce una disminución de CHOL (21%, $p < 0.05$) y PL (47%, $p < 0.02$); y clofibrato una disminución de todos los lípidos evaluados ($p < 0.05$). En fetos D hay un aumento de los niveles de PL (138%, $p < 0.01$) en comparación con fetos C. Ambos agonistas de PPARAlfa reducen ($p < 0.05$) los niveles de TG, ECHOL y CHOL tanto en fetos C como D. Los niveles de LTB4 se encuentran disminuidos en fetos D (58%, $p < 0.05$) y placenta D (82%, $p < 0.01$) en comparación con los C. Concluimos que PPARAlfa cumple un rol importante en la regulación de los niveles lipídicos de la unidad feto-placentaria. En fetos y placentas D, los niveles de LTB4 se encuentran disminuidos y estarían involucrados en la modulación de los niveles lipídicos en estos tejidos.

316. (12317) LA LEPTINA MODULA EL METABOLISMO LIPÍDICO EN PLACENTA HUMANA A TÉRMINO. WHITE, VERONICA; GONZÁLEZ, ÉLIDA; CAPOBIANCO, EVANGELINA; LANG PRIETO, JACINTO(1); PUSTOVRH, M.CAROLINA; MARTÍNEZ, NORA; HIGA, ROMINA; JAWERBAUM, ALICIA

CEFYBO-CONICET-UBA. (1) Instituto Nacional de Endocrinología. La Habana Cuba.

La leptina es una hormona producida principalmente en adipocitos que regula el apetito, el gasto energético y el metaboli-

mo lipídico. Se han descrito también efectos moduladores sobre la función reproductiva. En placenta humana se ha observado la expresión de leptina y su receptor, sugiriendo que esta hormona tiene funciones autocrinas/paracrinas. Objetivo: Evaluar el rol de la leptina en el metabolismo lipídico en la placenta humana a término. Metodología: Se obtuvieron explantos de placenta humana a término y se incubaron por 3 horas en baño metabólico con la adición o no de leptina (1-30 nM). El efecto de leptina sobre los niveles de lípidos se evaluó por cromatografía en capa delgada (TLC) y se reveló con vapores de yodo. La síntesis de lípidos se dosó a través de la incorporación de (14)C-acetato a las distintas especies lipídicas. El catabolismo de lípidos se analizó midiendo la liberación de glicerol al medio de incubación. Resultados: La leptina disminuye los niveles de triglicéridos (51%, $p < 0.01$) y de colesterol (26%, $p < 0.001$), sin alterar los niveles de ésteres de colesterol o fosfolípidos. La leptina no modifica la síntesis lipídica de novo de las especies de lípidos evaluadas, sin embargo observamos que la leptina estimula el catabolismo lipídico placentario, incrementando los niveles de glicerol liberados al medio de incubación (93%, $p < 0.01$). La leptina modula el metabolismo lipídico en placenta humana a término; disminuye los niveles placentarios de lípidos estimulando la lipólisis, sin afectar la síntesis de novo. Estos resultados sugieren que la leptina, modulando el metabolismo lipídico placentario, podría estar condicionando la transferencia de lípidos al feto en desarrollo.

317. (12330) LA METFORMINA EN LA FUNCIONALIDAD OVÁRICA DURANTE LA HIPERANDROGENIZACIÓN EN LA PREÑEZ TEMPRANA. LUCHETTI, CAROLINA; SOLANO, MARIA EMILIA; ELIA, EVELIN; SANDER, VALERIA; PAZ, DANTE; GONZALEZ, CLAUDIO; MOTTA, ALICIA BEATRIZ

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Facultad de Medicina, UBA

La metformina (M) es un antihiper glucemiante ampliamente utilizado en el tratamiento de diabetes y de poliquistosis ovárica (PCOS). Sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares que utiliza. Las mujeres con PCOS presentan hiperandrogenismo, hiperinsulinemia y trastornos reproductivos. Dado que 1) previamente demostramos que la M previno la reabsorción embrionaria (RE) y reguló la esteroidogénesis ovárica, 2) hiper glucemia e hiperinsulinemia alteran la esteroidogénesis ovárica, 3) el óxido nítrico ovárico (NO) es un factor luteotrófico en los primeros estadios del desarrollo luteal, 4) se ha demostrado en otros sistemas que la M vía la activación de la quinasa dependiente de AMPc (AMPK), incrementa la sensibilidad a insulina. El objetivo del trabajo fue investigar el mecanismo de acción de M sobre el posible desarrollo de insulino-resistencia (por cuantificación de la relación glucosa(G)/insulina(I)), la expresión de la NO sintasa inducible ovárica (iNOS) y la activación de la vía de AMPK. Por radioinmunoensayo vimos que la hiperandrogenización con dehidroepiandrosterona (DHEA, 60 mg/Kg peso, 24 y 48 h post-implantación, 24 h después es la toma de muestras) de ratones preñados BALB/c, incrementó la G en sangre (13±4 vs controles 7,0±0,3 nmol/l) e I en suero (38±2 vs controles 22±2 pg/ml). La M (en forma oral, 250mg/Kg, 24 y 28 h post-implantación) revertió el aumento de G (8±1 nmol/l) e I (25±1 pg/ml). Por Western Blot encontramos que la expresión de la enzima iNOS disminuyó con DHEA (91±3 unidades arbitrarias de intensidad/área:ua vs controles 113±4ua) y que la M revirtió parcialmente este efecto (101±2ua). Tanto DHEA (88±3ua vs controles 78±4ua) como M (93±3ua) estimularon la expresión de AMPK. La M disminuye la RE provocada por la androgenización actuando directa o indirectamente sobre parámetros ligados a la funcionalidad ovárica ya que normaliza la relación G/I. Modula la expresión de la iNOS ovárica y utiliza la vía de AMPK.

318. (12377) EXPRESIÓN DE LEPTINA EN CÉLULAS PLACENTARIAS. MAYMÓ, JULIETA L (1); CALVO, JUAN CARLOS (1,2); VARONE, CECILIA L(1)

(1) Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA, (2) Instituto de Medicina y Biología Experimental

La leptina es una hormona proteica de 16 KDa secretada principalmente por los adipocitos con la función de determinar el balance energético del organismo. Su expresión y la de sus receptores se evidenciaron también en placenta, pudiendo tener efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación afectando funciones maternas y fetales por mecanismos autocrinos y paracrinos. Resultados de nuestro grupo demostraron que el tratamiento con leptina en células JEG-3 y BeWo produce un aumento en la proliferación celular, además de que se evidencia un rol protector frente a la muerte por apoptosis. Previamente, también demostramos que en cultivos primarios de placenta IL-6, IL-1, estradiol, hCG y pregnenolona estimulan la producción de leptina. El objetivo para este trabajo fue estudiar la expresión de leptina en células placentarias utilizando como modelo las líneas celulares trofoblásticas JEG-3 y BeWo. Por Western blot determinamos que estas líneas expresan tanto leptina como su receptor. También realizamos ensayos de expresión del gen reportero luc en experimentos de transfección transiente con plásmidos conteniendo diferentes fragmentos de la región promotora del gen de leptina. Los resultados se normalizaron a la eficiencia de transfección por la expresión del gen Bgal. Observamos que utilizando la construcción que contiene la región promotora desde -2922 pb en presencia de 0.1 uM de estradiol y de 100 UI/ml de hCG, la expresión se incrementa en un máximo de 8.8 y 12.9 veces, respectivamente. Estos efectos son dependientes de la dosis y se pierden al utilizar regiones promotoras menores a -1951. Similares resultados se obtuvieron al medir los niveles endógenos de leptina por Western blot. Por otro lado no se observaron cambios en la expresión de leptina con el agregado de pregnenolona (0.1-10 ug/ml). Los resultados obtenidos refuerzan la idea de una función importante de la leptina en el diálogo endometrio-embrión y ayudan a esclarecer el mecanismo de regulación de la expresión de leptina en células placentarias por estradiol y hCG.

319. (12407) VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LEPTINA EN OVARIO DE RATA Y SU RELACIÓN CON LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA. RICCI, ANALÍA GABRIELA; DI YORIO, MARÍA PAULA; FALETTI, ALICIA GRACIELA

Dto. de Química Biológica, FCEyN-UBA, CEFYBO-CONICET

La leptina, proteína codificada por el gen de la obesidad, además de regular el apetito y el gasto energético, parece intervenir directamente en la función ovárica. Estudios previos demostraron la presencia de esta proteína y de sus receptores en el tejido ovárico de muchas especies. Uno de nuestros objetivos fue estudiar la variación de la expresión de sus receptores en ovario de rata a distintos tiempos después de la estimulación con gonadotrofinas. Utilizamos ratas inmaduras (26-28 días) tratadas con eCG/hCG para inducir su primera ovulación. La expresión de los receptores de leptina, determinados por Western Blot (WB), aumentó a las 24 y 48 después de la administración de eCG en un 49.9% y 71.2% respectivamente ($p < 0.05$). A su vez, el tratamiento posterior con hCG causó un incremento mayor (93.9%), manteniéndose estos niveles aún después de la ovulación ($p < 0.05$). Varios trabajos demostraron la participación del óxido nítrico (NO) en el proceso de ovulación. La expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), principal isoenzima ovárica que cataliza la formación de NO, no presenta variación durante el desarrollo folicular (determinada por WB). Sin embargo después del tratamiento con hCG se observó un incremento significativo del 62.6% en su expresión ($p < 0.05$). Dado que los niveles de leptina aumentan en ovario durante el proceso ovulatorio, estudiamos si esta proteína estaba relacionada con el incremento de

la expresión de la eNOS. La administración de 3 dosis de leptina (5µg c/u) durante el proceso ovulatorio (entre 0 y 10 h post hCG) aumentó significativamente la expresión de la eNOS en un 48.3% ($p < 0.01$). Estos resultados revelan que la expresión de los receptores de leptina es regulada por las gonadotropinas con un máximo en la ovulación, indicando una activa participación de la leptina en la ruptura folicular y posiblemente en la formación del cuerpo lúteo. Asimismo, es capaz de modular la producción del NO, al menos en parte, a través de la estimulación de la eNOS.

320. (12524) EFECTO DE INHIBIDORES DE LAS CICLOOXIGENASAS SOBRE LA REABSORCIÓN EMBRIONARIA MURINA INDUCIDA POR LIPOPOLISACARIDO. AISEMBERG, JULIETA; VERCELLI, CLAUDIA ALEJANDRA; BILLI, SILVIA; RAPANELLI, MAXIMILIANO; FRANCHI, ANA MARÍA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET)

Desarrollamos un modelo de reabsorción embrionaria murina (administrando LPS en día 7 de preñez) donde el LPS estimula la síntesis de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PGs). En este modelo el LPS reproduce los efectos sistémicos de la sepsis, produciendo un 100% de reabsorción embrionaria sin afectar la salud de la madre. En este trabajo estudiamos si inhibidores de las ciclooxigenasas (COX), principales enzimas de la vía biosintética de las PGs como así también inhibidores de la síntesis de NO pueden prevenir la reabsorción embrionaria. Metodología: 1) ratones Balb/c en su séptimo día de preñez son tratados con LPS (1µg/gr peso) e inhibidores de ciclooxigenasas (Meloxicam 4mg/Kg y Celecoxib 6 mg/Kg selectivos para COX-2; Indometacina 2.5 mg/Kg no selectivo) y NOS inducible (iNOS, Aminoguanidina 6mg/ratón). Se evaluaron los % de reversión de la reabsorción de las mismas hembras en el día 12 de preñez 2) Se determinó en tejido decidual los niveles de PGs por RIA y actividad de NOS por Bredt y Snyder. Los animales fueron sacrificados 6 h post-administración de LPS, momento de máxima producción de NO. Observamos que tanto el inhibidor de iNOS como los de COX disminuyeron los niveles de reabsorción embrionaria a 48 % y 10% ($p < 0.001$) respectivamente. Por otro lado se observó que la indometacina es capaz de inhibir los niveles de prostaglandina E y F2alfa ($p < 0.001$) basales y revertir el aumento inducido por LPS. Mientras que la AG no modificó la producción de PGs basales ni las inducidas por el LPS. El LPS y los inhibidores de COXs estimularon la actividad de la NOS, sugiriendo que las PGs podrían tener una acción inhibitoria sobre la síntesis de NO. Estos resultados sugieren la participación de ambos mediadores (NO y PGs) en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.

321. (12621) RETRASO NATURAL DE LA LUTEÓLISIS EN HEMBRAS PREÑADAS DE MAMÍFEROS (LAGOSTOMUS MAXIMUS). JENSEN, FEDERICO; LEOPARDO, NOELIA; ESPINOSA, MARIA BEATRIZ; VITULLO, ALFREDO

CEBBAD-Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnósticos-Univ Maimónides.

Uno de los roles críticos del ovario de mamíferos es la formación de cuerpos lúteos, encargados de la producción de hormonas esteroideas, esenciales para el inicio y mantenimiento de la preñez. La vida media funcional de los cuerpos lúteos varía de acuerdo a la especie y a la presencia o no de fecundación e implantación. La luteolisis es un proceso que ocurre por apoptosis y se encuentra regulado por la expresión de genes de la familia BCL-2. *Lagostomus maximus* presenta una serie de diferencias en la fisiología de su aparato reproductor femenino respecto a otros mamíferos. Ovulan entre 400 y 800 oocitos en cada ciclo reproductivo, 8 a 10 son fecundados e implantados y 1 o 2 gestados a término. La vida media funcional de los cuerpos lúteos es extremadamente larga siendo, en hembras preñadas funcionales hasta casi a término de la preñez (5,5 meses). El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de los genes BAX

y BCL-2 en cuerpos lúteos de hembras preñadas en distintos tiempos gestacionales y la presencia o no de células luteales apoptóticas, como así también la expresión de los isotipos A y B del receptor de progesterona. Las distintas proteínas fueron analizadas por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos policlonales específicos, y la apoptosis por medio de la técnica de TUNEL. Los resultados obtenidos muestran que la extensa vida media funcional de los cuerpos lúteos de hembras preñadas de *L. maximus* se debe a una baja recurrencia de células luteales apoptóticas determinada por medio de la técnica de TUNEL. A su vez, la supresión de la apoptosis en células luteales se encuentra relacionado al patrón de expresión de los genes BAX y BCL-2. Excepto en hembras gestantes a término, las células luteales muestran una alta expresión del gen BCL-2 y una muy baja expresión para BAX. Por otra parte, la expresión de los receptores de progesterona, isotipos A y B, es elevada durante toda la gestación, salvo en hembras a término.

322. (12636) EL HIPOTIROIDISMO ALTERA EL METABOLISMO LIPÍDICO Y LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE EN LA RATA. HAPON, MARIA BELEN; VARAS, SILVIA MABEL (1); GIMENEZ, MARIA SOFIA (1); JAHN, GRACIELA ALMA

LARLAC IMBECU CRICYT CONICET. Cátedra de Bioquímica Molecular, Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis

Las hormonas tiroideas participan en la regulación del metabolismo lipídico estimulando la síntesis y la degradación de ácidos grasos y colesterol. El Hipotiroidismo (HipoT) se asocia con niveles plasmáticos elevados de colesterol y disminuidos de triglicéridos (Tg) relacionados con una disminución en la expresión de enzimas lipogénicas. Recientemente observamos que el crecimiento de las crías de madres HipoT esta severamente atrasado durante la lactancia. La principal fuente de energía de la leche en la rata son los Tg (aproximadamente el 97% de los lípidos totales, que constituyen el 10% del volumen total de la leche). El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del HipoT en la rata sobre el metabolismo lipídico y su impacto sobre la lactancia. Examinamos el efecto del tratamiento crónico con el antihipotiroideo propiltiouracilo (PTU) (0,1 g/L) en el agua de bebida en ratas de la cepa Wistar los días 2, 15 y 20 de lactancia. Determinamos el contenido de lactosa, proteínas y Tg en la leche y la expresión de enzimas involucradas en la síntesis y degradación de triglicéridos en glándula mamaria e hígado por RT-PCR (ACC; FAS, GPAT, LPL, ACO y CPT). El contenido de Tg en la leche estuvo disminuido los días 15 (Co: 13.7 ± 0.9 vs hipoT: 9.7 ± 1.2) y 21 de lactancia (Co: 19.8 ± 1.2 vs hipoT: 9.5 ± 1.1) y el de lactosa disminuyó en L15 (Co: 5.7 ± 0.2 vs hipoT: 3.9 ± 0.3). En hígado la expresión de ACC disminuyó en L15 (Co: 1.3 ± 0.1 vs hipoT: 0.6 ± 0.1). En la GM la expresión de ACC (Co: 1.1 ± 0.1 vs hipoT: 0.5 ± 0.1) y de LPL (Co: 1.6 ± 0.2 vs hipoT: 0.7 ± 0.1) disminuyeron en L20 pero no en L15. El HipoT altera la composición de la leche con una marcada disminución de la concentración de Tg y de lactosa que contribuirían al atraso en el crecimiento de las crías. Este efecto sería mediado por la disminución de la síntesis hepática de Tg hacia la mitad de la lactancia y la menor captación de Tg circulantes por parte de la GM hacia el final de la lactancia.

323. (12691) EFECTO DE LA ANANDAMIDA (AEA) Y EL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) EN LA PREÑEZ TEMPRANA MURINA. VERCELLI, CLAUDIA A; AISEMBERG, JULIETA; RIBEIRO, MARÍA LAURA; FRANCHI, ANA MARÍA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET)

Los endocannabinoides son una clase emergente de mediadores lipídicos aislados principalmente de cerebro. La AEA, uno de los principales endocannabinoides, modula el desarrollo embrionario y la implantación. En nuestro laboratorio hemos observado que el LPS es capaz de producir reabsorción embrionaria en ratón

umentando la producción de óxido nítrico (NO) tanto en decidua como en útero. El NO, que cumple un rol importante durante la preñez, tiene efectos tóxicos en altas concentraciones, como las encontradas en la sepsis. Se ha demostrado también que el LPS estimula la síntesis de AEA aumentando la expresión de la AEA sintasa en macrófagos. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del LPS y la AEA sobre la preñez temprana. Estudios in vitro: se incubaron sitios de implantación (útero y decidua por separado) de hembras de 7 días de preñez: 1) en presencia o ausencia de distintas concentraciones de LPS (0.1, 1 ó 5 ug/ml) a distintos tiempos de incubación (6, 9, 12, 24 y 48 h); 2) en presencia o ausencia de distintas concentraciones de AEA (10-6, 10-7, 10-8 y 10-9M) por 24 h. El LPS en las concentraciones 0,1 y 1 ug/ml produjo, a partir de las 12 horas de incubación, un aumento de la síntesis de nitritos (método de Griess) en ambos tejidos estudiados. Por otro lado la AEA (10-8M) también aumentó la concentración de nitritos. Estudios in vivo: hembras en día 7 de preñez fueron inyectadas con AEA 0,03 mg/kg durante 2, 3, 4 ó 5 días y fueron sacrificadas en el día 12 de preñez. Los embriones fueron pesados y se analizó la presencia de embriones normales y reabsorbidos. La administración de dos o más dosis de AEA produjo retraso del crecimiento fetal y aumento en la reabsorción embrionaria. En este trabajo observamos que la AEA, como ya demostramos con el LPS, puede inducir reabsorción embrionaria y retraso del crecimiento fetal. Por otro lado, este endocanabinoide al igual que el LPS aumenta la síntesis de NO, posible mecanismo de su efecto deletéreo sobre la preñez temprana.

324. (12771) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN FUNCIONAL DE AQP9 EN PLACENTA HUMANA. LEVI, LORENA NATALIA; NOVAK, MARIANO; IBARRA, CRISTINA; ALICIA E, DAMIANO

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA.

El sinciotrofoblasto (STh) de placenta humana a término es una estructura continua multinucleada con mínimas uniones estrechas. El transporte de metabolitos, iones y agua de la madre al feto tiene lugar por rutas transcélulares. Previamente identificamos la presencia de acuaporinas (AQPs) tipo AQP3, AQP7 y AQP9 en STh. Observamos un aumento de la expresión molecular de AQP9 en placentas preeclámpticas, con ausencia de funcionalidad para agua y manitol, pero con un aumento en la incorporación de urea sensible a fletina. Nuestro objetivo fue estudiar si la expresión de AQP9 está regulada por la hipoxia química generada por CoCl₂, un inductor del factor inducible por hypoxia-1 (HIF-1), o por Progesterona (P4) ambos aumentados en preeclampsia. Explantos de placenta normal a término fueron cultivados con CoCl₂ 250 μM o con P4 300 ng/ml. La viabilidad bioquímica de los explantos determinada por dosaje de la concentración de β-hCG en el medio extracelular dio similar en todos los tratamientos. Luego se midió el flujo unidireccional de 3H-agua, 3H-manitol y 14C-urea. Se realizó RT-PCR semicuantitativa para estudiar la expresión de AQP9. El RT-PCR semi-cuantitativo mostró un 20% de aumento en la expresión de AQP9 en ambos tratamientos. Los explantos tratados con CoCl₂, mostraron una disminución en la incorporación de agua y manitol de un 82 ± 2% y 51 ± 6% respectivamente. Cuando los explantos fueron incubados con P4 la incorporación de agua aumentó un 40 ± 1% y la de manitol un 63 ± 14%. En todos los casos los flujos fueron sensibles a HgCl₂ 0.3 mM (P < 0,001; n=3). El flujo de urea sensible a HgCl₂ en los explantos tratados con CoCl₂ o con P4 aumentó un 28 ± 1% respecto a los controles. Estos resultados sugieren que la hipoxia química más que el aumento de progesterona estaría regulando la expresión molecular y funcional de AQP9. Entonces AQP9 podría desempeñar un papel importante en la respuesta adaptativa a desórdenes gestacionales asociados a hipoxia como la preeclampsia.

325. (12783) REGULACIÓN HORMONAL DE ACUAPORINAS EN CORION HUMANO DE PLACENTAS A TÉRMINO.

LEVI, LORENA NATALIA; IBARRA, CRISTINA; DAMIANO, ALICIA E

Laboratorio de Fisipatogenia. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA

El fluido amniótico es esencial para el normal crecimiento, movilidad y desarrollo fetal. Recientemente se identificó la expresión de acuaporinas (AQPs) en membranas corioamnióticas, postulando que contribuirían a la homeostasis del volumen del fluido amniótico. Sin embargo, hasta el momento no existe una clara relación entre la presencia de AQPs, el transporte de agua y su regulación hormonal. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión molecular y funcional de AQPs en corion humano y su regulación por progesterona (P4). Experimentos de RT-PCR e inmunohistoquímica detectaron la expresión de AQP3, AQP7 y AQP9. Luego, se midió el flujo de agua a través de un fragmento de corion montada como un diafragma en una cámara de Ussing, y se calculó la permeabilidad osmótica. El flujo neto de agua (J_w) fue absoritivo en presencia de un gradiente de presión hidrostática de 13 cm de agua del lado fetal. La permeabilidad osmótica fue de (1.3 ± 0.1) × 10⁻² cm x s⁻¹. La preincubación con 0,3 mM de HgCl₂ disminuyó la POSm significativamente a (7.2 ± 0.1) × 10⁻³ cm x s⁻¹ (p < 0.001, n=8). Cuando se incubaron fragmentos de corion con 300 ng/ml de P4 durante 24 hs se observó un aumento significativo del J_w sensible a HgCl₂ (0,61 ± 0.06 ?L. min⁻¹.cm⁻² vs 0.33 ± 0.05 ?L. min⁻¹.cm⁻², n=4, P<0.05). Estos resultados indican una correlación entre la expresión funcional y molecular de las AQPs en presencia y ausencia de P4. Este es el primer estudio que indica una regulación hormonal de las AQPs presentes en las membranas coriónicas humanas.

ENDOCRINOLOGIA Y GENETICA

326. (12070) LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA NEURONAL (NNOS) DETERMINA LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO REDOX CELULAR POR EL ESTADO TIROIDEO. FRANCO, MARÍA CLARA; ANTICO ARCIUCH, VALERIA G.; PERALTA, JORGE G.; PODEROSO, JUAN JOSÉ; CARRERAS, MARÍA CECILIA

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Anteriormente, demostramos que el aumento de la expresión de nNOS y su translocación a mitocondrias participan en la regulación del metabolismo redox celular en el hipotiroidismo. Con el objetivo de estudiar la distribución subcelular de nNOS y la regulación del metabolismo redox en el hipertiroidismo, ratas Wistar machos recibieron una dosis IP diaria de 60 μg T3/kg por 3 días (hiper) o solución salina (control, C), se extrajeron los hígados y se purificaron las fracciones citosólica y mitocondrial. El nivel de TSH sérico disminuyó 55% en hiper respecto de C. En estas condiciones, el consumo de oxígeno mitocondrial (estado 3) aumentó 27% y el sistémico 37% en hiper. No se encontraron diferencias entre los grupos en la expresión del mRNA de nNOS, pero en hiper la enzima se encontró localizada preferentemente en citosol (unidades arbitrarias; C: 1.0±0.1 e hiper: 1.7±0.2, en citosol; C: 1.0±0.2 e hiper: 0.5±0.1, en mitocondria) y se observó 37% de aumento en la expresión de hsp90, chaperona que estabiliza al dímero de nNOS en citosol. La actividad de nNOS en las fracciones se correlacionó con su localización subcelular. Por otro lado, se observó una disminución significativa en la producción de H₂O₂ dependiente de la producción de óxido nítrico (NO) en hiper respecto de C (pmoles/min.mg; C: 14±3 e hiper: 5±3 a nivel de complejo I y C: 23±4 e hiper: 8±1 a nivel de complejo II), aunque la producción total de H₂O₂ no resultó diferente entre los grupos (pmoles/min.mg; C: 48±5 e hiper: 60±3 a nivel de complejo I y C: 82±9 e hiper: 84±9 a nivel de complejo II). Los resultados sugieren que: a) la producción de NO confinada diferencialmente en mitocondria y citosol determinaría la regulación del metabolismo redox celular por el estado tiroideo b) Hsp90 podría retener a

nNOS en citosol y c) en el hipertiroidismo, la producción celular de H₂O₂ dependería principalmente del aumento del consumo de oxígeno mitocondrial.

327. (12189) DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE / BECKER: MUTACIÓN EN HOMBRE ASINTOMÁTICO. FERREIRO, VERONICA (1,2); GILBERTO, FLORENCIA (1); FRANCIPANE, LILIANA (2); NASH, ABIGAIL (2); FRECHTEL, GUSTAVO (1, 2); SZIJAN, IRENE (1)

(1) *Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA* (2) *División Genética. Hospital de Clínicas "José de San Martín".*

La Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500). Es recesiva, ligada al X, con síntomas clínicos progresivos y de evolución fatal. La alteración molecular responsable de la patología se debe a mutaciones en el gen de la distrofina (Xp21), siendo el 60% grandes deleciones de uno o más exones. Se realizó un estudio molecular en una familia con un sólo afectado. La identificación de la deleción se realizó por PCR simplex y multiplex, hallándose ausentes los exones 45 al 55. Dicha deleción no produce corrimiento del marco de lectura por lo que el fenotipo observado es más benigno (DMB). Para la detección del estado de portadora de la madre se estudió la segregación de cinco STRs intragénicos ubicados en las zonas flanqueantes a la deleción y dentro de ella (STR Dys II, STR 45, STR49, STR50 y STR63). Sorprendentemente los resultados demostraron que la deleción se hallaba no solo en el niño afectado, sino también en su madre y abuelo materno. Se sometió al abuelo asintomático a un análisis bioquímico que reveló un valor elevado de la enzima creatin kinasa sérica. Para estudiar la posible presencia de mosaicismo se rastreó la deleción en otro tejido (mucosa bucal) con distinto origen embrionario que la sangre, hallándose la mutación en el mismo. Conclusiones: Las herramientas moleculares empleadas permitieron identificar la mutación causante de la patología y detectar a los portadores de la misma. Los estudios moleculares revelaron una historia asintomática previa de la patología en la familia y contribuyeron a un mejor asesoramiento genético de la misma.

328. (12221) LA EXPOSICIÓN IN VIVO AL CADMIO AFECTA PARÁMETROS OXIDATIVOS Y LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA ADENOHIPÓFISIS. POLIANDRI, ARIEL H. B.; JIMENEZ, VANESSA (2); CANO, PILAR (2); ESQUIFINO, ANA (2); DUVILANSKI, BEATRIZ (1)

(1) *Depto. de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONOCET, Argentina.* (2) *Depto. de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, UCM, España.*

Distintas evidencias señalan que el cadmio (Cd) afecta al sistema endocrino, sin embargo, sus mecanismos de acción aun no han sido determinados. Previamente demostramos que el Cd altera directamente la secreción hormonal adenohipofisaria e induce estrés oxidativo en células adenohipofisarias en cultivo, además, estimula la síntesis de NO. Objetivo: Examinar si algunos de los efectos observados in vitro durante el tratamiento con Cd se reproducen in vivo. Ratas machos adultas (Wistar) fueron expuestas a Cd (5 ppm, en el agua de bebida) durante un mes. El crecimiento de los animales no fue afectado por el tratamiento. Los animales fueron sacrificados, se extrajeron las adenohipofisis (ADH) y el hígado (H) y se recogió la sangre troncal. La exposición al Cd aumentó la peroxidación lipídica (TBARS) en la ADH (% del control, Control: 100±12; Cd: 137±4, p<0.05, n=8) no así en el H (% del control, Control: 100±12; Cd: 119±16, n=8). En la ADH, pero no en el H, se detectó un aumento del mRNA de hemo oxigenasa-1 (real time-RT-PCR) considerada un marcador de estrés oxidativo (expresión relativa en ADH, Control: 1.1±0.3; Cd: 4.8±0.5, p<0.001, n=4). El Cd también aumentó los niveles séricos de nitratos (Griess-nitrato reductasa), producto final de la oxidación del óxido nítrico, (Concentración de nitratos (microM), Con-

trol: 4.2±0.9; Cd: 11.1±2, p<0.001, n=8). En concordancia con este resultado, en la ADH, el metal aumentó los niveles de mRNA de las óxido nítrico sintasas inducible (expresión relativa, Control: 1.0±0.2; Cd: 3.1±0.4, p<0.001, n=4) y neuronal (expresión relativa, Control: 1.0±0.02; Cd: 1.7±0.2, p<0.001, n=4). Estos resultados muestran que la exposición in vivo al Cd genera estrés oxidativo y aumenta la síntesis de óxido nítrico en la adenohipofisis, confirmando los resultados obtenidos previamente en cultivo. Más aún, señalan que la adenohipofisis podría ser más sensible al Cd que el H, considerado hasta ahora uno de los principales blancos del metal.

329. (12227) EXISTE UN ESTADO DE INSENSIBILIDAD FISIOLÓGICA A LOS ANDRÓGENOS EN LA CÉLULA DE SERTOLI DEL PERÍODO FETO-NEONATAL E INFANCIA TEMPRANA QUE POSIBLEMENTE PREVIENE EL DESARROLLO ESPERMATOGÉNICO PRECOZ. CEMES, HECTOR (1); NISTAL, MANUEL (2); REGADERA, JAVIER (2); PERAMATO, PILAR (2); REY, RODOLFO (1); MUSSE, MARIANA (1); SERRANO, ALVARO (2)

(1) *CEDIE, Hosp. de Niños Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina* y (2) *Depto. Morfología, UAM, Madrid, España.*

La acción de la testosterona sobre el testículo depende de la presencia de un receptor de andrógenos (RA) funcional. El RA está localizado en las células de Sertoli (CS), peritubulares y de Leydig, pero no en las germinales. Usando anticuerpos comerciales estudiamos la localización inmunohistoquímica del RA en muestras de testículo humano de fetos, neonatos, niños y púberes en las que se evaluó también el grado de desarrollo espermatogénico. Los resultados se expresan semicuantitativamente. El RA fue negativo en las CS de fetos de 16 a 40 semanas (n=19), mínimo en la CS neonatales (n=10) y débil durante el primer año de vida (n=12). Entre 1 y 7 años (n=15) 40-50% de las CS expresaron positividad débil a moderada, que se incrementó al 60-80% entre los 8 y los 11 años (n=8, 40% débiles y 40% moderados) y al 80-90% en niños puberales entre 11 y 15 años (n=14, 30% débiles y 60% moderados). El RA en las células de Leydig y peritubulares fue positivo a todas las edades, y de mayor intensidad que en las CS en fetos y niños menores de 1 año. Hubo correlación entre el desarrollo de células germinales y el incremento de la expresión del RA en las CS lo cual sugiere que este fenómeno es una precondition para el desarrollo espermatogénico. Proponemos que la expresión ausente o débil del RA en las células de Sertoli fetales neonatales y del primer año de vida representa una insensibilidad transitoria y fisiológica a los andrógenos en este tipo celular que impediría el desarrollo espermatogénico precoz que de otra manera se desencadenaría por los altos niveles de testosterona a los cuales el testículo está expuesto durante el período fetal y primeros meses de vida postnatal.

330. (12279) NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLE TIPO 2B: AUMENTO DE LA SOBREVIDA, UN NUEVO DESAFÍO. VIEITES, ANA MARÍA; SANSÓ, GABRIELA; LEVIN, GLORIA; BARONTINI, MARTA

Centro de Investigaciones Endocrinológicas

La Neoplasia Endócrina Múltiple tipo 2B (MEN2B) es una enfermedad muy agresiva que causa la muerte temprana debido a cancer medular de tiroideos (CMT). Los estudios genéticos y clínicos en enfermos y portadores de MEN 2B han sido restringidos debido al limitado número de familias afectadas, consecuencia directa del curso agresivo de la enfermedad. Los avances en el campo de la biología molecular han posibilitado la detección precoz inequívoca de los portadores de mutaciones del protooncogen RET, mejorando sustancialmente la supervivencia de los mismos ya que permite la realización de la tiroidectomía profiláctica, antes de los 6 meses de vida, evitando la aparición del CMT. También han abierto un nuevo interrogatorio en cuanto a la morbilidad de los pacientes a largo plazo, su futura capacidad reproductiva y el estudio de su descendencia. Objetivo: presentar los estudios genéticos, clínicos y bioquímicos de los pa-

cientes con MEN 2B y advertir acerca de las consecuencias del aumento de la sobrevida. Se estudiaron 11 individuos (6-41 a) pertenecientes a 8 familias, 9 casos índice y 2 portadores (gemelas de 7 años provenientes de un embarazo por ICSI). El estudio de los pacientes comprendió la evaluación clínica (fenotipo, hipertensión, etc.), los estudios de biología molecular (mutaciones del proto-oncogen RET) y bioquímico (calcitonina y catecolaminas). Todos los pacientes presentaron el fenotipo característico y la mutación M918T. El CMT estuvo presente en los 9 casos índices y en las 2 gemelas detectadas, mientras que el feocromocitoma estuvo presente en 4 (1 bilateral). Todos presentaron aumento de NA y A, y 3 de AVM. Dos de las familias presentaron 2 generaciones afectadas. De los adultos, 2 fallecieron y otros 2 presentan recidiva de CMT. Con el aumento de la sobrevida y de los procedimientos de fertilización, es importante considerar la transmisión genética de esta grave enfermedad. Asimismo se deben pesquisar las mutaciones lo más precozmente posible para modificar la evolución y el pronóstico de la misma.

331. (12308) EFECTO DEL HEXACLOROBENCENO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR TIROIDEA. CHIAPPINI, FLORENCIA (1); ALVAREZ, LAURA (1); KOLLIKER-FRERS, RODOLFO (1); KLEIMAN, DIANA (1)

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental. La administración crónica a ratas induce porfirias, disfunciones endocrinas y cáncer de mama, hepático y adenomas tiroideos. El HCB produce hipotiroxinemia y aumenta los niveles séricos de TSH, sin aumentar la masa tiroidea. La TSH incrementa la expresión del TGF β -1, una proteína antiproliferativa y apoptótica en la tiroidea. Estudiamos la regulación del crecimiento tiroideo en ratas intoxicadas con HCB mediante la evaluación de parámetros pro y anti-apoptóticos. Se intoxicaron ratas Wistar hembras con HCB en dosis no estimuladoras y estimuladoras de TSH [(100 mg/Kg (A) y 1000 mg/Kg (B) p. c.)] respectivamente por 30 días. Otro grupo con Metimazol (MMI) (50 mg /Kg p. c.), fue el control (C) positivo de proliferación. La relación peso tiroideo/peso corporal (T/P) [(mg/g) x 100] aumentó en el grupo MMI vs. C (254%, p=0,001; C:4,6 \pm 0,3 mg/g) sin cambios en los grupos HCB. La razón T/P de los grupos MMI-HCB vs MMI disminuyó (46%, p=0,001). La proliferación celular (incorporación de 5-Br. deoxiuridina) aumentó en MMI vs. C (300%, p<0,05) y no varió en HCB. El N° de cuerpos apoptóticos (Hematoxilina-Eosina), aumentó en HCB (B) vs. C (606%, p=0,001); Los niveles de Bax determinados por Western blot aumentaron en el citosol (288%; p=0,005) de los grupos HCB vs. C. Bax (por inmunohistoquímica) aumentó en HCB vs. C (102,3 %, p=0,05; C:27,3 \pm 4,8/103 células). El nivel de Bcl-2 mitocondrial (western blot) aumentó en HCB vs. C (685%, p=0,001) y en MMI vs. C (1200%, p<0,0001). Bcl-2 (por inmunohistoquímica) aumentó en el grupo MMI (300 %, p = 0,0001), y en el grupo HCB (B) (50 %, p = 0,05) vs. C (20,8 \pm 2,9/103 células). Los niveles de mRNA de TGF β -1 evaluados por RT-PCR aumentaron en MMI (100%, p<0,05) y HCB (30%, p<0,05) vs. C (20,5 UA). Conclusión: el HCB regula el crecimiento tiroideo estimulado por TSH mediante un equilibrio entre la activación de factores apoptóticos y antiapoptóticos.

332. (12566) EL POLIMORFISMO G1465A DEL GEN GABBR1 ES UN MARCADOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EPILEPSIA MESIAL TEMPORAL CON ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO. KAUFFMAN, MARCELO; CONSALVO, DAMIAN (1); LEVY, ESTRELLA (2); MORDOH, JOSE (2); KOCHEN, SILVIA (1)

(1) Centro de Epilepsia. División Neurología. Hospital Ramos Mejía. (2) Centro de Investigaciones Oncológicas. Instituto Flemming

Introducción: Aunque el síndrome de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo (EMTEH) fue considerado

como un trastorno adquirido, actualmente es aceptado que factores genéticos serían importantes en su génesis. El polimorfismo G1465A del gen del receptor para GABA tipo B (GABBR1) fue asociado con un mayor riesgo a padecer Epilepsia del Lóbulo Temporal. Sin embargo, estudios recientes fallaron en encontrar esta asociación, existiendo controversia sobre el rol que el mencionado polimorfismo tiene en el desarrollo de esta enfermedad. Objetivos: Investigar la asociación entre el polimorfismo G1465A de GABBR1 y el riesgo a padecer EMTEH. Estudiar la asociación genética con características clínicas particulares de la enfermedad. Métodos: Seleccionamos 52 pacientes con diagnóstico de EMTEH y 39 controles sanos coincidentes en características étnicas con los pacientes. Realizamos la genotipificación del polimorfismo G1465A de GABBR1 en todos ellos mediante PCR-RFLP. Resultados: El polimorfismo G1465A fue más frecuentemente observado en los pacientes que en los controles. (p=0,00013) El genotipo A/G fue encontrado en 23 pacientes (44%) y en 3 controles (8%). La portación del genotipo A/G confiere un riesgo 9,5 veces mayor para el desarrollo de EMTEH que la portación del genotipo G/G. (OR 9,51; IC 95% 2.59-34.87). Los pacientes portadores del genotipo A/G tuvieron una mayor frecuencia de crisis nocturnas. (p=0,01) El polimorfismo G1465A del gen GABBR1 es un marcador de riesgo para el desarrollo de EMTEH.

333. (12604) MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL REMODELAMIENTO ÓSEO EN SALIVA TOTAL Y SU CORRELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN SÉRICA. EN CONDICIONES DE REPLECIÓN Y DEPLECIÓN ESTROGÉNICA. PELLEGRINI, GRETEL(1); GONZALES CHAVES, MACARENA(1); PONCE, GRACIELA(2); FAJARDO, MARIA A(2); SOMOZA, JULIA(3); FRIEDMAN, SILVIA(1); ZENI, SUSANA N(1,3)

(1) Bioq. General y Bucal. Odontología. UBA. (2) Bromatología y Nut. UN Patagonia y (3) Sec. Osteopatías Médicas, Hosp. de Clínicas, UBA

En un estudio preliminar previo encontramos que era posible la medición de marcadores óseos en saliva total. Por lo cual en el presente trabajo tratamos de determinar si existe relación entre los niveles de un marcador de la resorción ósea tan sensible como el telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo I (CTX) en sangre y saliva en condiciones normales y aumento en el remodelamiento óseo como ocurre en los primeros estadios de la deficiencia estrogénica. Para ello se estudiaron mujeres sanas (pre y postmenopausicas) reclutadas voluntariamente. Asimismo se evaluaron 20 ratas Wistar adultas normales SHAM y luego de la ovariectomía (OVX). Se analizó en saliva humana y de rata y en sangre de rata CTX por ELISA (Crosslaps y Rat Lab, Osteometer Bio Tech, Denmark) en sangre humana por EQL (Elecsys Roche). Los promedios \pm DS del CTX (ng/L) fueron los siguientes. (TABLA) (*) p<0.05: entre SHAM y OVX, y entre pre y postmenopausicas. Cuando se relacionó la concentración de CTX en saliva vs. en sangre se observó una correlación positiva con un p<0.05 y una r= 0.79.

	SALIVA	SANGRE
RATAS OVX	9000 \pm 2509*	20800 \pm 3595*
RATAS SHAM	3567 \pm 557	15417 \pm 4345
PREMENOPAUSICAS	248 \pm 120	215 \pm 71
POSTMENOPAUSICAS	407 \pm 249*	304 \pm 138*

De acuerdo a los resultados se puede concluir que la muestra salival correlaciona con la sanguínea no sólo en condiciones normales sino también en aquellas donde existe un aumento en el remodelamiento.

334. (12684) CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MARCADORES DE DECIDUALIZACIÓN IN VITRO MEDIANTE ARREGLOS DE CDNA. MASCHI, DARIO (1,2); VALLEJO,

GRISELDA (1); MARONNA, RICARDO (3); YOAH, VICTOR (4); BEATO, MIGUEL (5); SARAGÜETA, PATRICIA (1,2)

(1) Instituto de Biología y Medicina Experimental IBYME, (2) Dto. de Química Biológica FCEyN-UBA, (3) Dto de Bioestadística Universidad Nacional de La Plata, (4) Instituto Superior del Cálculo FCEyN-UBA, (5) Centro de Regulación Genómica, Barcelona

La decidualización de las células estromales del endometrio es un prerrequisito para la implantación y ocurre in vivo como respuesta a progesterona. El objetivo del presente trabajo fue determinar los patrones de expresión génica durante la decidualización inducida in vitro. Se caracterizaron las condiciones de diferenciación inducidas por suero en ausencia y presencia de hormonas en la línea de células estromales de rata, U118. El mRNA total de las células controles y decidualizadas se sometió a un "screening" frente a 15.000 ESTs de ratón. Se obtuvieron 424 transcritos únicos diferencialmente expresados (FDR < 0.005), 112 de los cuales corresponden a genes reportados en bases de datos públicas. Además de la regulación de genes previamente relacionados al período periimplantatorio in vivo tales como: folistatina (FS), conexina-43, heat shock protein 86, receptor de prolactina, calciclina; se detectaron nuevos genes regulados con funciones en matriz extracelular (i.e. oviductina, decorina, caderina), señalización intracelular, factores de transcripción, remodelamiento de cromatina. La inducción de folistatina (FS), conexina-43, ciclina D1, oviductina (ovpg) se validó por RT-PCR. Este trabajo identifica nuevos genes involucrados en la diferenciación stromal en la línea celular U118, y evidencia la utilidad de estas células como modelo de la decidualización del estroma en el endometrio.

NEFROLOGIA

335. (11866) ELIMINACIÓN RENAL DE P-AMINOHIPURATO EN RATAS CON OBSTRUCCIÓN URETERAL BILATERAL. ROL DE LOS TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS OAT1 Y OAT3. VILLAR, SILVINA; BRANDONI, ANABEL; ANZAI, NAHOKO (1); ENDOU, HITOSHI (1); TORRES, ADRIANA

Area Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CONICET (1) Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan.

En estudios realizados en nuestro laboratorio, hemos demostrado que ratas Wistar macho adultas con Obstrucción Ureteral Bilateral (OUB) presentan una modificación de la función renal. El objetivo de este trabajo fue analizar la excreción renal de p-aminohipurato (PAH), y la expresión renal del Transportador de Aniones Orgánicos 1 (OAT1) y del Transportador de Aniones Orgánicos 3 (OAT3) en ratas con OUB de 24 h de duración. Los estudios se realizaron 24 h postliberación de la obstrucción ureteral (n=5). Se procesó en paralelo un grupo de ratas Sham (S, n=6). Se determinaron: Urea en plasma (U, g/L) y Excreción Fraccional de PAH (EF[PAH], %) con técnicas convencionales de Clearance. En Homogenados (H), Membranas Basolaterales (MB) y fracciones enriquecidas en Membranas Intracelulares (MI) obtenidos a partir de corteza renal se evaluó la expresión de OAT1 y OAT3 mediante técnicas de Western Blot e Inmunoquímica (microscopía óptica e inmunofluorescencia por microscopía confocal). U: S=0.67±0.08, OUB=2.91±0.30*; EF[PAH]: S=1048±100, OUB=347±65*. La expresión de OAT1 y OAT3 en las distintas fracciones revelaron mediante Western Blot (*P<0.05):

	OAT1 Sham	OAT1 BUO	OAT3 Sham	OAT3 BUO
H	100 ± 9	156 ± 8*	100 ± 14	53 ± 15*
MB	100 ± 17	24 ± 9*	100 ± 8	35 ± 3*
MI	100 ± 13	154 ± 19*	100 ± 13	31 ± 12*

Las técnicas inmunoquímicas confirmaron los resultados obtenidos con Western Blot. La disminución de la excreción renal de PAH en la nefropatía obstructiva estaría asociada a una "downregulation" de OAT1 y OAT3 en membranas plasmáticas basolaterales de células de túbulo contorneado proximal.

336. (11883) MODIFICACIÓN EN LA ELIMINACIÓN RENAL DE FUROSEMIDA EN RATAS CON ICTERICIA OBSTRUCTIVA. BRANDONI, ANABEL; VILLAR, SILVINA; PICENA (1), JUAN C; ANZAI (2), NAHOKO; ENDOU (2), HITOSHI; TORRES, ADRIANA

Area Farmacología. Dpto. Cs. Fisiológicas. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. CONICET. (1) Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas. Facultad de Ciencias Médicas. UNR. (2) Department of Pharmacology and Toxicology. Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan.

Hemos demostrado alteraciones en la eliminación renal de p-aminohipurato y bromosulfoftaleína en ratas con colestasis extrahepática de 21 h. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la eliminación de un anión orgánico de importancia clínica como la furosemida (FS) en ratas Wistar macho adultas con ligadura del conducto biliar de 21 h (L, n=7). Se procesó además un grupo Sham (S, n=7). Mediante el estudio farmacocinético de FS, se determinó el clearance sistémico (Cl_s, mL/min/100g p.c.) y la cantidad de FS excretada en orina (FS_o, mg). A partir de técnicas convencionales de clearance se obtuvieron los siguientes parámetros: cargas (µg/min/100g p.c.) excretadas (C.E.), filtradas (C.F.) y secretadas (C.S.) y clearance renal (Cl_r, mL/min/100g p.c.) de FS. Se estudiaron las expresiones (%) de los transportadores de aniones orgánicos OAT1 y OAT3 en homogenado de corteza renal (h) y en membranas basolaterales (m) usando técnicas de Western Blot. Se realizaron, además, estudios de inmuno-citoquímica para estas proteínas (por microscopía de luz e inmunofluorescencia con microscopía confocal). Resultados: Cl_s: S=0.43±0.07, L=0.64±0.06*; FS_o: S=1.35±0.22, L=1.90±0.08*; C.E.: S=10.1±0.9, L=13.9±0.3*; C.F.: S=0.22±0.03, L=0.24±0.03; C.S.: S=9.9±0.9, L=13.7±0.3*; Cl_r: S=0.54±0.05, L=0.74±0.02*; OAT1h: S=100±6, L=132±7*; OAT1m: S=100±7, L=139±11*; OAT3h: S=100±4, L=186±19*; OAT3m: S=100±4, L=92±17 (*P<0.05). Los estudios de inmunoquímica corroboraron los resultados obtenidos con Western Blot. Las ratas con colestasis extrahepática presentan un aumento en la eliminación renal de FS. Este aumento se explica a expensas del aumento en la secreción del anión. La secreción renal de aniones orgánicos ocurre en células del túbulo proximal. OAT1 y OAT3 son proteínas involucradas en este proceso a nivel basolateral. Ambas transportan FS. El aumento en la excreción renal y sistémica del diurético podría deberse, al menos en parte, al aumento descrito en las abundancias de OAT1 y OAT3.

337. (11920) EFECTOS DEL AGONISTA GABAB, BACLOFEN (BAC), SOBRE LA NA⁺, K⁺ ATPASA (NKA) RENAL Y LA ACUAPORINA 2 (AQP2) EN RATAS DIABÉTICAS. DONATO, VERÓNICA(1); MONASTEROLO, LILIANA A(2)

Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Univ. Nac. Rosario. (1)Fundación Maciel Parque. (2)CONICET

En experimentos previos hemos observado que la administración "in vivo" de BAC provoca aumento de diuresis, natriuresis y clearance osmolar asociado a disminución en la capacidad de concentrar la orina; y disminución en la actividad y abundancia de la NKA y en la abundancia de AQP2. El objetivo de este trabajo fue evaluar las acciones de BAC sobre la función renal y sobre la NKA y AQP2 en ratas diabéticas. Los animales se inyectaron con estreptozotocina (STZ) 50 mg/kg i.v. o su vehículo (V). Luego de 7 días se les administró BAC 1 mg/kg s.c. (BAC+STZ) y se los ubicó en jaulas metabólicas. Se recolectó orina durante

16 horas. Se extrajeron muestras de sangre para estudios de clearance; y los riñones para obtención de homogenados de médula y corteza y fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de médula. Las abundancias relativas de proteínas se detectaron por Western Blot. Los parámetros funcionales de las ratas diabéticas no se modificaron con el tratamiento con BAC. Actividad NKA (Corteza, Médula, $\mu\text{molPi/h.mg prot.}$): $V = 9.50 \pm 1.33$, 14.41 ± 2.72 ; STZ = $3.06 \pm 1^{**}$, 10.92 ± 1.16 ; STZ+BAC = $1.26 \pm 0.18^{***}$, $6.82 \pm 0.62^{***}$. La abundancia de NKA no presentó diferencias entre los grupos estudiados. Abundancia de AQP2 (unidades arbitrarias) en Médula: $V = 0.92 \pm 0.10$; STZ = $1.77 \pm 0.35^{**}$; STZ+BAC = $0.53 \pm 0.05^{##}$; y en Membranas Plasmáticas: $V = 1 \pm 0.07$; STZ = $2.32 \pm 0.50^{**}$; STZ+BAC = $0.56 \pm 0.12^{##}$. (Resultados: promedio \pm SEM; $n=3-5$ observaciones; $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ vs. control y $###p < 0.01$, $\#p < 0.05$ vs. STZ). Se observaron los efectos de STZ sobre NKA y AQP2 descriptos por otros autores. En ratas diabéticas BAC inhibe la actividad NKA sin alterar su abundancia. La inducción de AQP2 en el grupo STZ es inhibida por BAC, posiblemente, según experimentos previos, por disminuir niveles de vasopresina. Estos efectos de BAC no se reflejan en parámetros funcionales, probablemente por el importante deterioro del transporte tubular preexistente en el animal diabético.

338. (12315) REGULACIÓN DEL PHI POR LA AVP EN CÉLULAS DE COLECTOR CORTICAL. RIVAROLA, VALERIA; FORD, PAULA; CAPURRO, CLAUDIA

Lab. Biomembranas. Depto Fisiología y Biofísica. Fac Medicina. UBA

En los túbulos colectores corticales (CCD) del riñón de mamífero los mecanismos de regulación final de formación de orina se encuentran bajo el control, entre otras hormonas, de la arginina-vasopresina (AVP). Si bien la principal acción de esta hormona es aumentar la permeabilidad al agua también se la involucra en la acidificación del fluido tubular. Sin embargo, la información sobre los mecanismos y los receptores implicados es escasa y contradictoria. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la regulación del pHi por la AVP en un modelo de CCD de rata: la línea celular RCCD1. El pHi fue medido por espectrofluorometría utilizando BCECF, un fluoróforo sensible a pH, en monocapas de células RCCD1 crecidas sobre soporte permeable. La incubación de las células con 10^{-8} M de AVP indujo un aumento transitorio del pHi. La máxima alcalinización se alcanzó al minuto de agregada la hormona ($DpHi = 0,10 \pm 0,01$; $n=32$). Luego de 10 minutos las células RCCD1 recuperaron el valor inicial de pHi. La alcalinización fue completamente inhibida por $1 \mu\text{M}$ HOE 694 lo que sugiere una activación de la isoforma NHE-1 del intercambiador Na^+/H^+ . Por otra parte la fase de recuperación fue dependiente de la presencia de Cl^- y HCO_3^- , sugiriendo la activación de un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Para determinar que receptores de la AVP mediaban el efecto de la hormona se utilizaron antagonistas de los mismos. Nuestros resultados mostraron que la AVP, en presencia de un antagonista del receptor V1, produce una alcalinización pero sostenida en el tiempo ($DpHi = 0,12 \pm 0,02$; $n=9$) mientras que, en presencia de un antagonista del receptor V2, la hormona produce una acidificación progresiva ($DpHi = -0,10 \pm 0,01$; $n=13$). En este último caso la respuesta a la AVP estaría mediada por Ca^{2+} dado que la acidificación es inhibida por $50 \mu\text{M}$ BAPTA. Concluimos que, en las células del CCD, la AVP activaría la isoforma NHE-1 del intercambiador Na^+/H^+ vía el receptor V2 y el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ vía el receptor V1, en este caso, mediado por Ca^{2+} .

339. (12517) EFECTO DE LA GONADECTOMIA PREPUBERAL (GX) SOBRE LA PRESION ARTERIAL (PA) EN HEMBRAS Y MACHOS SHR. INTERACCION ENTRE ALDOSTERONA (PAC) Y KALLIKREINA URINARIA (KU). ODDO, ELISABET; PERIZ, GABRIELA; DE LUCA SAROBE, VERONICA; TOLEDO, JORGE; SCERBO, ADRIANA; MAR-

TIN, RODOLFO; IBARRA, FERNANDO; ARRIZURIETA, ELVIRA

Laboratorio de Nefrología Experimental. IIM Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, U.B.A.

La supresión precoz de hormonas sexuales por Gx en ratas SHR de distinto sexo muestra una disminución de la PA (mmHg) y un aumento de la PAC (pg/ml) y KU (nkat/d/100g pc), sin cambios en la corticosterona ni renina plasmáticas. Para verificar la interacción entre PAC y KU con el descenso de la PA, se estudió la respuesta al bloqueo de receptores de mineralocorticoide (Espironolactona, E) e inhibidores de kallikreina (Aprotinina, Ap). Las SHR y sus controles de distinto sexo, con y sin Gx, tratados y no tratados, se evaluaron a las doce semanas de vida. La E oral, 80mg/100g de comida, desde la 4ta hasta la 12va semana revirtió el efecto obtenido por la Gx sobre la PA y excreción de KU. Los valores de PA para las ratas macho no tratadas, Gx y Gx+E fueron: 204.5 ± 7.55 , 151.6 ± 4.49 y 181.2 ± 26.13 y, para las ratas hembras: 164.5 ± 4.82 , 146.3 ± 5.03 y 171.5 ± 7.5 (no tratadas vs Gx, $p < 0.001$; no tratadas vs Gx+E, NS). La excreción KU para las ratas macho no tratadas, Gx y Gx+E fue de: 29.3 ± 1.92 , 87.4 ± 4.86 y 10.1 ± 1.59 (Gx vs no tratadas y vs Gx+E, $p < 0.001$) y para las hembras fue: 44.8 ± 2.33 , 91.4 ± 5.71 y 12.3 ± 2.64 (Gx vs no tratadas y vs Gx+E, $p < 0.001$). La relación Na^+/K^+ , en ratas no tratadas, Gx y Gx+E fue: 0.30 ± 0.06 , 0.011 ± 0.003 y 0.2 ± 0.03 (Gx vs no tratadas y Gx+E, $p < 0.01$ y $p < 0.05$). Aprotinina 20.000 UIK/día, i.p., durante 3 días, disminuyó la KU en machos y hembras SHR Gx de 89.4 ± 4.86 y 91.4 ± 5.73 a 6.3 ± 0.82 y 4.8 ± 0.5 , $p < 0.01$ en ambos casos. Esto determinó un aumento de la PA en ratas macho y hembras Gx, tratadas con aprotinina, de 151.6 ± 4.5 y 146.3 ± 5.03 a 184.8 ± 9.99 y 185.4 ± 6.98 $p < 0.01$, en ambas situaciones. Estos resultados indicarían que en este modelo experimental, con ausencia precoz de hormonas sexuales, hay un aumento de la Aldosterona plasmática que estimularía un aumento de la actividad del SKK con el subsecuente descenso de la PA.

340. (12591) EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 Y MOLÉCULAS CHAPERONAS HSP70 Y HSP90 LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOSARTAN EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR). RODRIGUEZ PEÑA, M; CARRIZO, L; MANUCHA, W; RUETE, C; VALLES, P

Area de Fisiopatología Universidad Nacional de Cuyo – IMBECU

Caveolina-1 participa en el transporte celular y en la regulación de moléculas de señalización intracelular. Se ha descrito un rol crítico de esta proteína en la acción de angiotensina II sobre su receptor AT_1 (R-AT_1). Las moléculas chaperonas Hsp70 y Hsp90, participan en el correcto plegamiento de las proteínas, facilitan su transporte a localizaciones específicas intracelulares, función asimismo descrita para cav-1. Objetivo: Estudio del efecto de losartan en la expresión de caveolina-1, de las moléculas chaperonas Hsp70 y Hsp90 y posible asociación de estas proteínas en modelo experimental (SHR). Se conformaron cuatro grupos: Wistar Kyoto (WK)+agua, SHR+agua, WK+Los, SHR+Los, dosis de Losartan administrada (40mg/kg día) durante 8 semanas. Se realizó inmunohistoquímica para cav-1 y Hsp70. Western Blot de cav-1, Hsp70 y Hsp90 en membrana y citoplasma. Expresión del R-AT_1 por RT-PCR. La administración de Losartan produjo un marcado descenso de la presión arterial (mmHg) en el grupo SHR+Los vs. SHR+agua: 144 ± 2.2 vs. 170 ± 2.05 $p < 0.001$ indicando el específico bloqueo del R-AT_1 . Se demostró por RT-PCR el descenso en la expresión del RNAm del R-AT_1 en SHR+agua vs. SHR+Los. Intensa marcación de cav-1 en células epiteliales de túbulos proximales, distales y endotelio vascular fue mostrado en SHR+Los; con niveles elevados de cav-1 en membrana respecto de SHR+agua, 1.3 ± 0.01 , $p < 0.05$ $n:6$ y a WK+agua 1.40 ± 0.001 , $p < 0.05$ $n:6$. Asimismo fue demostrado en membrana incremento en la expresión de Hsp70 y Hsp90 en SHR+Los vs. WK+agua ambas $p < 0.01$, no demostrándose expresión de Hsp70 y baja expresión de Hsp90 en SHR+agua. Expresión significativa de Hsp70 fue demostrado en fracción citosólica de SHR+agua vs.

WK+agua, $p < 0.001$. Nuestros resultados demuestran que la inhibición del receptor AT[1] induce el incremento en la expresión de cav-1 y de chaperonas moleculares Hsp70 y Hsp90 en membrana, sugiriendo la participación de estas proteínas en la regulación del receptor en SHR.

341. (12678) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL TRANSPORTE DE AGUA EN LAS CÉLULAS EPITELIALES TUBULARES RENALES HUMANAS (CERH): ACCIÓN DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 (STX2) Y SU SUBUNIDAD B (STX2B). PISTONE CREYDT, VIRGINIA; GOLDSTEIN, JORGE; IBARRA, CRISTINA

Lab Fisiopatología, Dpto Fisiología, Fac Medicina, UBA

Stx2 secretada por *E.coli* enterohemorrágico puede causar Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Una de las consecuencias más importantes del SUH es la acción tóxica de Stx2 sobre las células epiteliales tubulares renales que contribuyen al desarrollo de la insuficiencia renal aguda y su evolución a la cronicidad. Los objetivos del trabajo fueron caracterizar el transporte de agua a través de las CERH y analizar los cambios funcionales en presencia y ausencia de Stx2 y Stx2B. Los cultivos primarios de CERH se obtuvieron a partir de células epiteliales de corteza renal humana. La presencia de canales de agua (AQP) y de sodio (ENaC y APXL) se evaluaron por RT-PCR y WB. La funcionalidad se analizó a partir de la absorción de agua (Jw) a través de monocapas de CERH crecidas sobre soportes permeables. La viabilidad celular se midió por incorporación de rojo neutro, la inhibición de síntesis de proteínas por captación de ^3S -metionina, y la apoptosis celular por tinción con colorante de Hoescht. Los resultados indican que las CERH expresan AQP1, $^2\text{ENaC}$ y APXL y tienen un Jw de $0,26 \pm 0,02 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. El Jw disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con 10pg/ml de Stx2 luego de 1h de incubación. La inhibición de Jw fue dependiente del tiempo y la concentración de la toxina. Sin embargo cuando se usaron concentraciones y tiempos mayores de incubación con Stx2, se observó no sólo una inhibición del Jw sino también una disminución de la viabilidad, la síntesis de proteínas y estimulación de la apoptosis. Stx2B también inhibió el Jw en una manera dosis y tiempo dependiente pero a una concentración 10000 veces mayor. En estas condiciones no se observaron cambios en la viabilidad, la síntesis de proteínas y la apoptosis. En conclusión observamos que las CERH expresan AQP1, $^2\text{ENaC}$ y APXL que pueden estar implicadas en el transporte de agua que es inhibido por Stx2 y Stx2B.

342. (12702) EXPRESION DE KALLIKREINA RENAL (KLK) EN RATAS WISTAR ADULTOS DE DISTINTO SEXO INTACTAS Y GONADECTOMIZADAS (GX) CON Y SIN REDUCCION DE MASA RENAL (UNX). AZURMENDI, PABLO; ODDO, ELISABET; SANTELHA STEFAN, JOSE; SCERBO, ADRIANA; TOLEDO, JORGE; MARTIN, RODOLFO; IBARRA, FERNANDO; ARRIZURIETA, ELVIRA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Fac. de Med., UBA

La kallikreína urinaria (KU), marcador del sistema kallikreína-kinina, se relaciona inversamente con la presión arterial, y también se ha descrito un dimorfismo sexual relacionado a la hipertensión. Además, ratas Wistar adultas (5 meses de vida) ovariectomizadas, con y sin reducción de la masa renal, mostraron una mayor excreción de kallikreína urinaria que hembras y machos intactos ó uninefrectomizados. Nos interesó estudiar los mecanismos que pudieran estar involucrados en esta respuesta. Por ello, usando el mismo diseño experimental, medimos la síntesis de KLK. Se utilizaron 100mg de corteza renal donde se extrajo RNA, luego se realizó transcripción reversa seguido de una reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa con cebadores específicos para mRNA de KLK (que codifica la región del "loop común de las kalikreínas") y β -Actina (como índice de mRNA constitutiva), produciendo un producto de 294 y 360pb ,

respectivamente. Luego se calculó la relación KLK/β -Actina como marcador de síntesis de KLK. Dicha relación evidenció un aumento significativo de la expresión de KLK en las Gx-uNx (Gx-uNx hembra: 0.71 ± 0.01 ; macho: 0.87 ± 0.02) y las Gx (hembra: 0.67 ± 0.01 ; macho: 0.80 ± 0.02) respecto de las hembras y machos intactos (0.65 ± 0.01), ó con uNx (0.66 ± 0.02). El aumento de expresión de KLK observada estaría modulando la excreción de KU y resultaría de los efectos directos ó indirectos de las hormonas sexuales sobre la transcripción de dichos genes, que se magnifica ante un evento compensador consecutivo a la remoción parcial de masa renal.

343. (12711) MODULACIÓN DE DOPAMINA (DA) RENAL: EXCRECIÓN HIDROELECTROLÍTICA EN RATAS EXPANDIDAS. DE LUCA SAROBE, VERÓNICA; LEVIN, GLORIA(2); BARONTINI, MARTA(2); ARRIZURIETA, ELVIRA(1); IBARRA, FERNANDO R(1)

(1) *IIM A Lanari, Fac Medicina, UBA.* (2) *CEDIE, Hospital de Niños R Gutierrez, CONICET.* (3) *Fac Cs Veterinarias, UBA.*

La DA renal participa en la excreción hidroelectrolítica provocada por la expansión del LEC. Objetivo: evaluar si se modifica la excreción de Na^+ y agua durante la expansión del LEC al bloquear la degradación de la DA causada por MAO y COMT. Se estudiaron ratas Wistar adultas expandidas con solución NaCl 0.9% al 5% PC/h durante 2 horas, tratadas o no, en forma individual o combinada, con pargilina 20mg/kg iv (IMAO) o $3,4$ dinitrocatecol 15mg/kg iv (ICOMT). La natriuresis ($\text{mEq}/15\text{min}/100\text{gPC}$) a las 2 h fue más alta en IMAO 0.21 ± 0.03 y en IMAO-ICOMT 0.17 ± 0.02 , vs control 0.10 ± 0.01 , ambos $p < 0.01$. No hubo cambios en la 1ra hora y tampoco con ICOMT. El filtrado glomerular ($\text{ml}/\text{min}/100\text{gPC}$) aumentó en todos los grupos durante la 1ra hora. El mayor aumento se observó en IMAO-ICOMT 0.44 ± 0.02 vs control 0.30 ± 0.02 , $p < 0.01$. El FG en ningún caso fue diferente al basal en la 2nda h. Tabla: Diuresis y DA en orina en los distintos grupos (* $p < 0.05$ y # $p < 0.01$ vs control; & $p < 0.05$ vs IMAO).

	Diuresis (ml/15min/ 100gPC)	Diuresis (ml/15min/ 100gPC)	DA orina (ng/15min/ 100gPC)	DA orina (ng/15min/ 100gPC)
Exp 5% PC	1 h	2 h	1 h	2 h
Control	$0,37 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,05$	$9,8 \pm 1,1$	$7,7 \pm 0,7$
IMAO	$0,47 \pm 0,04$	$1,53 \pm 0,19^*$	$15,3 \pm 1,5^*$	$9,1 \pm 0,9$
ICOMT	$0,46 \pm 0,11$	$0,66 \pm 0,15$	$14,7 \pm 3,1$	$24,4 \pm 9,3\#$
IMAO-ICOMT	$0,31 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,09^*$	$21,3 \pm 1,2\#\&$	$16,6 \pm 3^*\&$

La inhibición aislada de MAO o en conjunto con COMT causaron un incremento de la DA renal, que se manifestó en un aumento de la diuresis y natriuresis (abolidos por inhibidor de rDA, SCH 23390) que potencia el efecto propio de la expansión moderada del volumen extracelular. ICOMT aumentó la DA pero no tuvo el mismo efecto.

344. (12779) PROTEINA QUIMIOATRAYENTE DE MONOCITOS 1 (MCP-1) COMO MARCADOR PRECOZ DEL REMODELAMIENTO INTERSTICIAL RENAL EN LA POLIEMISIA RENAL AUTOSOMICA DOMINANTE (ADPKD). AZURMENDI (1), PABLO; FRAGA (1), ADRIANA; SANTELHA STEFAN (1), JOSE; GALAN (1), FELICITA; ARRIZURIETA (1), ELVIRA; MARTIN (1,2), RODOLFO

(1) *Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Fac. de Med., UBA, Buenos Aires.* (2) *Hospital Universitario Austral, Universidad Austral, Pilar, Buenos Aires.*

La ADPKD presenta remodelamiento intersticial renal en etapas tempranas de la enfermedad, cuando los niveles de clearance de creatinina (C[Cr]) no difieren de la normalidad. Se han descrito acumulación de monocitos en el intersticio renal y niveles aumentados de MCP-1 en orina y en células murales de los quistes. Con el objeto de evaluar si MCP-1 puede ser un marcador de

remodelamiento intersticial temprano, estudiamos sus niveles en 20 pacientes con ADPKD (10 varones y 10 mujeres), de 25 ± 1 años de edad, con creatinina plasmática (Cr[pl]) de 0.9 ± 0.05 mg/dl y TAM 100.3 ± 4.6 mmHg, y se compararon con 9 controles (C) sanos apareados por edad, sexo y superficie corporal. MCP-1 fue medido por ELISA en plasma y en orina con retención nocturna, y en ausencia de proteinuria clínica e infección. En las mujeres, la muestra se recolectó en la mitad del ciclo menstrual. Los valores de Crpl en plasma y orina (Cr[u]) se determinaron por el método de picrato alcalino y el C[Cr], estimado por Cockcroft-Gaul fue de 114.3 ± 6.8 ml/min. La MCP-1 urinaria fue expresada en pg/ml o pg/mg de Cr[u]. La MCP-1 urinaria fue 172.4 ± 12.5 (ADPKD) vs 171.8 ± 41.9 (C) pg/ml, ó 202.8 ± 47.8 (ADPKD) vs 152.2 ± 61.1 pg/mg de Cr[u] (C) (p NS). Los valores plasmáticos de MCP-1 fueron 66.4 ± 12.5 (ADPKD) vs 89.7 ± 14.2 (C) pg/ml (p NS). Se encontró correlación entre el aumento de MCP-1 urinaria (pg/ml o pg/mg Cr[u]) y el aumento de la Cr[pl] ($p < 0.05$), y entre el aumento de MCP-1 urinaria y la disminución de C[Cr] ($p < 0.025$) en ADPKD, no así en controles. Los hallazgos sugieren que la MCP-1 urinaria podría ser un marcador de activación temprana del remodelamiento intersticial renal y explorarse así su utilidad para el seguimiento longitudinal de pacientes con ADPKD y Cr[pl] en rango normal.

345. (12145) ROL DEL RECEPTOR AT1 DE ANGIOTENSINA II EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA ISQUÉMICA.
MOLINAS, SARA M. (1,2); TRUMPER, LAURA (1,3); ELÍAS, M. MÓNICA (1,2)

(1) Area Farmacología. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. (2) IFISE. CONICET. (3) CIUNR

Angiotensina II (ANGII) posee un rol importante en el desarrollo de la injuria renal, a través de sus propiedades vasoactivas y proinflamatorias. El sistema renina-angiotensina es activado ante un daño renal. Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la evolución de la función renal y la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) luego de un daño renal de isquemia-reperusión y además, evaluar el efecto del bloqueo de receptores AT1 de ANGII con losartán. Se sometió a ratas Wistar macho adultas a 40 minutos de isquemia renal unilateral seguidos de 24 horas de reperusión (IR24, n=5). A otro grupo se le administró losartán (80 mg/kg/día, i.p.) durante 3 días previos a la isquemia y reperusión (IR24+L, n=6). Los controles se sometieron a operación simulada (C, n=5) y otro grupo control recibió el tratamiento con losartán (C+L, n=5). Al final del período de reperusión se estudió la función del riñón postisquémico por técnicas de clearance. Se evaluaron los niveles de ARNm de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en corteza y médula por RT-PCR. Los parámetros hemodinámicos y tubulares de la función renal se encontraron significativamente deteriorados en IR24. El pretratamiento con losartán mejoró todos estos parámetros. VFG (ml/min.g riñón): C: 0.8 ± 0.1 ; C+L: $1.4 \pm 0.2^*$; IR24: $0.004 \pm 0.001^*$; IR24+L: $0.4 \pm 0.07^* \#$. EFNa+ (%): C: 1.5 ± 0.5 ; C+L: 1.4 ± 0.1 ; IR24: $88 \pm 25^*$; IR24+L: $3.8 \pm 0.9^* \#$, * $p < 0.05$ vs C, # $p < 0.05$ vs IR24. Los riñones postisquémicos presentaron niveles aumentados de ARNm de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en corteza y en médula. El pretratamiento con losartán evitó estos aumentos. ARNm TNF- α / ARNm β actina (corteza): C: 1 ± 0.01 ; C+L: 1.1 ± 0.5 ; IR24: $2.6 \pm 0.08^*$; IR24+L: 1.7 ± 0.4 , * $p < 0.05$ vs C. En IR24 se evidencia un importante proceso inflamatorio, acompañado de una marcada disfunción renal. ANGII, a través del receptor AT1, tendría un rol fundamental en la inducción de citoquinas proinflamatorias y en la recuperación de la función renal, al menos en este estadio del desarrollo de la injuria renal.

ONCOLOGIA

346. (12195) IFN-ALFA INDUCE APOPTOSIS VÍA TGF-BETA1, A TRAVÉS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

(ROS) EN HEPATOCITOS DE HÍGADOS PRENEOPLÁSICOS DE RATA. QUIROGA, ARIEL; ALVAREZ, M.; RONCO, T.; PARODY, J.; FRANCÉS, D.; MONTI, J.; OCHOA, J.; CARNOVALE, C.; CARRILLO, MARIA C.

IFISE-CONICET. FCByF. UNR.

Hemos demostrado que en hepatocitos aislados de hígados preneoplásicos cultivados con IFN se produce apoptosis por un mecanismo mediado por TGF β 1, y la misma va acompañada por una disminución de las defensas antioxidantes. En otras células tratadas con TGF β 1, otros autores demostraron disminución de glutatión (GSH) por oxidación y por alteración de la enzima limitante de su síntesis, gamma-glutamylcistein ligasa (GCL). Nuestro objetivo fue evaluar si el IFN es capaz de modificar el metabolismo del GSH durante la ejecución de la apoptosis vía TGF β 1 en hepatocitos de hígados preneoplásicos. Las ratas fueron sometidas a un modelo de preneoplasia experimental y los hepatocitos se cultivaron a distintos tiempos (1, 3, 7, 20 y 24 h): A) sin IFN, B) con IFN, C) con IFN + anti-TGF β 1, D) con IFN + ácido ascórbico. Los niveles de ROS aumentaron significativamente ($p < 0,05$) a 1 h de cultivo en el grupo B (+41%). En B los niveles de GSH disminuyeron significativamente a las 7 h de cultivo (-41.89%), y en C y D GSH no varió. GSH total en el medio de cultivo aumentó, haciéndose significativo a las 7 h, con prevalencia de la especie oxidada. A las 24 h se observó el clivaje de la subunidad catalítica de GCL (GCLC) en B (western blot). C y D no variaron. El análisis de mRNA de GCL (RT-PCR) mostró una disminución significativa de los niveles del mensajero de GCLC a partir de las 3 h (-35%). Los niveles del mensajero de la subunidad moduladora (GCLM) no se alteraron en B. En A, C y D no se observaron alteraciones significativas. El TGF β 1 inducido por IFN produciría un aumento de ROS y este aumento sería responsable de los efectos observados en el metabolismo del GSH, el que actuaría como scavenger de los ROS producidos tempranamente. La rápida eliminación de GSH de los hepatocitos hacia el medio se produciría para mantener el equilibrio redox, suceso que no resulta suficiente para evitar la muerte celular por apoptosis.

347. (12451) ESTUDIO EN EL TIEMPO DEL PROCESO DE APOPTOSIS INDUCIDO POR INTERFERÓN ALFA-2B (IFN) VÍA TGF- β 1 EN HEPATOCITOS DE HÍGADOS PRENEOPLÁSICOS DE RATA. ALVAREZ, MARIA DE LUJÁN; QUIROGA, ARIEL D; RONCO, MARÍA TERESA; OCHOA, J ELENA; MONTI, JUAN A; PARODY, JUAN PABLO; FRANCÉS, DANIEL E; CARNOVALE, CRISTINA E; CARRILLO, MARÍA CRISTINA

Instituto de Fisiología Experimental (CONICET), Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (U.N.Rosario)

El IFN induce apoptosis en hepatocitos aislados de hígados preneoplásicos de rata vía la producción de TGF- β 1. Para investigar los mecanismos de apoptosis, hepatocitos aislados de hígados preneoplásicos fueron cultivados a 1, 4, 7, 20 y 24 horas con o sin IFN. En respuesta al IFN, los hepatocitos presentaron fragmentación del ADN, la cual fue bloqueada con anti-TGF- β 1. Las actividades de caspasa-3 y caspasa-8 aumentaron significativamente a las 24 horas de cultivo (+40%* y +90%*, respectivamente). Además, a 1 hora de cultivo el IFN vía el TGF- β 1 indujo aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS) (+40%*). A las 4 horas se observó pérdida del potencial de membrana mitocondrial (-50%*) y liberación del citocromo c al citosol (+25%*), con un máximo incremento a las 20 horas de cultivo (+250%*). Los niveles de Bax aumentaron en mitocondria de un modo tiempo-dependiente a partir de las 4 horas (+35%*), con un máximo a las 20 horas (+100%*), mientras que los niveles de Bcl-xL se mostraron disminuidos desde las primeras horas de cultivo (* $p < 0,05$). Por otra parte, se observó una translocación retrasada de Bid a la mitocondria, que resultó ser coincidente con la activación de caspasa-8. En conclusión, el TGF- β 1 endógeno secretado bajo el estímulo con IFN, parece inducir la liberación de citocromo c a través de un mecanismo relacionado con miembros de la fa-

milia Bcl-2, con un incremento de ROS y pérdida del potencial de membrana mitocondrial. La proteína Bax sería la responsable de la liberación del citocromo c durante las primeras horas de la apoptosis inducida por el IFN γ vía el TGF- β 1, mientras que a tiempos posteriores Bid activado por caspasas amplificaría los eventos mitocondriales, favoreciendo la liberación de más citocromo c.

348. (12502) EL HEXACLOROBENCENO ES CO-CARCINOGENICO EN GLÁNDULA MAMARIA DE RATA Y ALTERA EL CAMINO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINO-SÍMILES. RANDI, ANDREA SILVANA; COCCA, CLAUDIA (2); CARBONE, VERÓNICA (1); NÚÑEZ, MARIEL (2); CROCI, MÁXIMO (3); GUTIÉRREZ, ALICIA (2); BERGOC, ROSA (2); KLEIMAN, DIANA (1)

(1) Dto Bioquímica Humana, Fac Medicina, UBA. (2) Radioisótopos, Fac Farmacia y Bioquímica, UBA. (3) Inst Crescenti

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ampliamente distribuido en el medio ambiente, que produce porfiria, alteraciones reproductivas y tiroideas y cáncer tiroideo y hepático. Los receptores de insulina (RI) y de factores de crecimiento insulina-símiles (RIGFs) regulan el crecimiento y proliferación celular de mama normal y neoplásica. Nuestro objetivo fue estudiar si el HCB: 1) es co-carcinogénico en la formación de tumores de mama inducidos por N-Nitroso-Metilurea (NMU) y 2) activa el camino de transducción de señales de IGFs. Metodología: Los parámetros de desarrollo tumoral fueron evaluados en función del tiempo (15-100 días post inyección de NMU), en 4 grupos experimentales: Control, NMU (50 mg/kg), HCB (100 mg/kg) y NMU-HCB y los niveles de expresión de receptores fueron evaluados por inmunoprecipitación e inmunoblot. Resultados: Los parámetros de desarrollo tumoral fueron al final de tratamiento: Incidencia tumoral: 100% vs. 66%; $p < 0,02$; Nro de tumores/rata: $3,67 \pm 0,67$ vs. $2 \pm 0,45$; $p < 0,05$ y Volumen tumoral: $16 \pm 5,32$ vs. $3,82 \pm 0,67$. $p < 0,0001$, en los grupos NMU-HCB vs. NMU respectivamente. Las ratas HCB no desarrollaron tumores. El análisis histológico mostró un mayor índice mitótico y desdiferenciación celular en tumores NMU-HCB vs NMU e hiperplasia lobulillar y proliferación del número de ductos en mamas HCB vs. C. Los niveles de expresión de los RI, RIGF-I y del sustrato del receptor de insulina tipo 1 (IRS-1) aumentaron en los grupos HCB vs. C (126%, $p < 0,001$; 148%, $p < 0,05$ y 143%, $p < 0,05$) así como la fosforilación del IRS-1 (62%, $p < 0,05$). En cambio, en los tumores (NMU-HCB) disminuyeron los niveles de RIGF-I (88,5%, $p < 0,001$), y la fosforilación del IRS-1 (89%, $p < 0,001$) respecto NMU. El HCB aumenta el desarrollo y la malignidad de los tumores de mama inducidos por NMU y su mecanismo de acción podría involucrar el camino de transducción de señales de IGFs.

349. (12682) PARTICIPACIÓN DE FIBROBLASTOS ESTROMALES EN LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP) Y EN EL CRECIMIENTO TUMORAL HORMONO-INDEPENDIENTE. GIULIANELLI, S.J.; LAMB, C.; GOROSTIAGA, M.A.; FABRIS, V.T.; LANARI, C.

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Se sabe que los fibroblastos asociados a carcinomas (CAF) participan en el crecimiento tumoral, pero poco se conoce de su rol en la adquisición de la hormono-independencia en cáncer de mama. Contamos con carcinomas mamarios murinos hormono-dependientes (HD) mantenidos por trasplante sc en ratones tratados con progestágenos y sus variantes hormono-independientes (HI). Hemos desarrollado cultivos primarios de ambos tipos tumorales pudiendo separar los CAF y las células epiteliales tumorales (EPI). Previamente observamos que los CAF del tumor C4-HI (CAF-HI) son más estimuladores que los CAF del tumor C4-HD (CAF-HD). El objetivo del trabajo fue a) estudiar qué población celular prolifera en el co-cultivo, b) evaluar si los CAF-HI activan RP de células EPI y c) evaluar si los CAF-HI inducen una

mayor activación de RP de las EPI que los CAF-HD. Usando cultivos puros de EPI-HI o mixtos, mantenidos por 48hs con 1% de suero fetal bovino charcolizado, demostramos que las EPI (citokeratina positivas) incrementaron sólo en presencia de CAF-HI ($p < 0.05$). Por otro lado en forma similar se hicieron cultivos EPI-HD o EPI-HI puros o mixtos con CAF-HD o HI y las células fueron procesadas para Western blots y para ensayos de Mobility gel shift (EMSA). Se normalizaron los extractos celulares por nivel de expresión de cadherina E (marcador epitelial). Estudios de EMSA sugieren una mayor activación del RP cuando EPI-HD o HI fueron co-cultivadas con los CAF-HI. Se repitieron los experimentos usando EPI-HI puro vs EPI-HI con CAF-HI y un análisis detallado de los mismos, indicaría una prevalencia en la activación del heterodímero AB del RP en los co-cultivos ($p < 0.05$). Este resultado fue consistente con un aumento en la fosforilación de la ser190 de la isoforma B del RP ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren la participación de los CAF-HI en el fenotipo hormono-independiente, induciendo una activación preferencial de la isoforma B del receptor de progesterona.

350. (12707) EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE RECEPTORES DE PROGESTERONA A (RP[A]) Y B (RP[B]) Y DE ESTRÓGENOS ALFA (REA) Y BETA (REB) Y RESISTENCIA ADQUIRIDA AL TRATAMIENTO CON ANTIPROGESTÁGENOS. WARGON, V.; BOLADO, J.; BOTTINO, M.C.; LANARI, C.

Instituto de Biología y Medicina Experimental

La resistencia al tratamiento hormonal adquirida, es un tema de interés en cáncer de mama. Carcinomas mamarios ductales murinos inducidos por progestágenos, mantenidos por trasplante subcutáneo, regresionan con mifepristona (RU 486, MIF). Hemos desarrollado por presión selectiva una variante resistente a MIF. El objetivo de este trabajo fue a) estudiar la expresión de las isoformas de RP A y B, y de los REa y b en tumores sensibles (C4-HI) y resistentes (C4-HIR) a MIF. b) estudiar la respuesta de C4-HIR a 17- β -estradiol (E[2]) c) evaluar la regulación de RE y RP en tumores C4-HI y C4-HIR tratados con MIF ó E[2]. Ratones hembras BALB/c fueron inoculados con C4-HI (n=20) o C4-HIR (n=20) sc y cuando los tumores median 50mm(2) se comenzó con tratamiento diario de MIF (6mg/kg/sc) o se implantaron pellets de 5mg E[2]. Los controles recibieron pellets sin hormona. A las 48 hs. de tratamiento, se realizaron las autopsias de 3-4 ratones por grupo. Por western blot, utilizando dos anticuerpos (C19, Ab7) se observó que C4-HIR expresa menos RP[A] que C4-HI (1:2, $p < 0.05$), variando así la proporción RP[A]/RP[B] que resulta menor en C4-HIR ($p < 0.05$). Ambos tumores expresan REa y REb. Estos resultados fueron confirmados por inmunohistoquímica y fluorescencia usando anticuerpos validados. Se observó que E[2] induce regresión tumoral de C4-HIR. En ambos tipos de tumores tratados con E[2] se vio un aumento de RP[A], mientras que con MIF, aparece una nueva banda de 90 kDa en C4-HI, casi imperceptible en C4-HIR. Estos resultados indican que la resistencia adquirida a MIF no implica resistencia a E[2] y que la misma está asociada a una disminución en la expresión de RP[A], que redundando en una proporción diferente de RP[A]/RP[B] sugiriendo que RP[A] sería clave para el desencadenamiento de la regresión inducida por MIF y no en la regresión inducida por estrógenos.

351. (12736) EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y DE PROGESTERONA EN GLÁNDULAS MAMARIAS DE RATONES RESISTENTES (C57BL/6) Y SENSIBLES (BALB/C) A LA CARCINOGENESIS MAMARIA POR PROGESTÁGENOS. MONTERO GIRARD, GUADALUPE; BOLADO, JULIETA (2); LANARI, CLAUDIA (2); VANZULLI, SILVIA I. (1)

Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina. Instituto de Biología y Medicina Experimental

Previamente demostramos que a diferencia de la cepa BALB/c, la C57BL/6 es resistente a la carcinogénesis mamaria induci-

da por acetato de medroxiprogesterona (MPA). El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión del receptor de estrógenos alfa (RE α) y beta (RE β) y del receptor de progesterona, isoforma A (RPA) y B (RPB), en la glándula mamaria de ratones de ambas cepas durante dos meses de exposición a MPA o progesterona (PG). Hembras vírgenes de ambas cepas de 2 meses de edad fueron implantadas con un pellet subcutáneo de 40 mg de MPA (n=12), de PG (n=10) o sin hormona (n=10). A los 2 meses se extirparon las mamas, se fijaron en formol e incluyeron en parafina para estudios inmunohistoquímicos usando anticuerpos validados en bibliografía. Sobre un total de 1500 células se cuantificó el porcentaje de células epiteliales positivas con objetivo de 100x. La expresión basal de RE α y de RPA fue menor en C57BL/6 [Ejemplo, RE α : media \pm DS, 41.24% \pm 12.44 (BALB/c) y 19.14% \pm 5.15 (C57BL/6), p<0.001]. En respuesta al tratamiento, la cepa BALB/c presentó una disminución de la expresión del RE α y de RPA en animales tratados con progestágenos comparados con los controles (p<0.05). En la cepa C57BL/6 no se evidenciaron estas diferencias. En ambas cepas, el tratamiento con MPA indujo un significativo aumento de la expresión de RPB (p<0.05) (BALB/c: control= 7.55% \pm 4.78 vs. MPA= 39.49% \pm 11.90. C57BL/6: control= 6.04% \pm 5.53 vs. MPA= 34.02% \pm 10.04). No hubo cambios significativos con respecto a la expresión de RE β . Estos resultados demuestran diferencias en la expresión de los receptores esteroideos tanto basales entre cepas como en la respuesta al tratamiento que podrían vincularse con la diferente susceptibilidad a la carcinogénesis mamaria. Además se demostró que los progestágenos en mama regulan positivamente a RPB y negativamente a RPA.

352. (12741) EFECTOS TEMPRANOS EN LA REGRESIÓN TUMORAL INDUCIDA POR UN ANTIPROGESTÁGENO EN UN CARCINOMA MAMARIO MURINO DE CRECIMIENTO AUTÓNOMO. SOLDATI, R.; GIULIANELLI, S.J.; CERLIANI, J.P.; LANARI, C.

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Demostremos previamente que el bloqueo de receptores de progesterona (RP) induce regresión de carcinomas mamaros murinos y de sus metástasis en un modelo experimental. Esto va acompañado por citostasis, incremento de apoptosis y de proteínas inhibitorias de ciclo celular, y por mayor actividad de metaloproteasas (MMP) asociadas con remodelación tisular. El objetivo de este trabajo fue estudiar la regulación de los receptores de estrógenos (RE) y RP durante las primeras 48hs de tratamiento con mifepristona (MIF), para estudiar los cambios tempranos que desencadenan los fenómenos de regresión tumoral. Se transplantaron 30 hembras vírgenes BALB/c sc con el tumor 32-2-HI. Cuando los tumores alcanzaron los 50mm(2) se comenzó el tratamiento con MIF (6mg/kg/día) y los ratones (n=3) fueron sacrificados a las 3, 6, 12 y 24hs. Se observó en Western blot (WB) y en Inmunohistoquímica (IHQ) un aumento inicial de expresión de RP y una disminución significativa a las 24hs (IHQ: Ctlol: 62,1 \pm 2%; 24hs: 7,9 \pm 3,3%; p<0.001). Por WB en tumores tratados ya a las 3hs se evidenció una banda de aproximadamente 90 kDa detectada también con el anticuerpo específico para pSer 190 RP. Por IHQ se observó también mayor cantidad de núcleos marcados a las 6hs y no se observó marca a las 24hs usando este último anticuerpo (p<0.05). Recién a las 24hs de tratamiento se observó una disminución de RE por ambas técnicas (IHQ: cctlol: 65,6 \pm 2,4%; 24hs: 36,6 \pm 9%; p<0.001). A las 6hs ya se detectaron cambios significativos de mitosis y apoptosis así como también aumento de actividad de MMP, aumento de expresión de integrina α 6 y β 1 y redistribución de laminina. Por el contrario las pERK recién disminuyeron a las 24hs. Estos resultados sugieren que MIF activaría principalmente a la isoforma A de RP induciendo cambios que afectan tanto el parénquima como al estroma tumoral y que la regulación negativa de la expresión de RE y RP y de pERK que aparece a las 24hs sería consecuencia de los cambios anteriores.

NEUROCIENCIAS

353. (12285) EFECTOS NEUROPROTECTORES DE LA PROGESTERONA (PROG) EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE MÚDULA ESPINAL (ME). LABOMBARDA, FLORENCIA (1); GONZÁLEZ, SUSANA (1); DE NICOLA, ALEJANDRO F (1); SCHUMACHER, MICHAEL (2); GUENNOUN, RACHIDA (2)

(1) *Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Fac Medicina, UBA.* (2) *U488 INSERM, Paris, Francia*

En este trabajo hemos desarrollado un modelo de trauma en cultivos organotípicos de ME adulta de ratón, a fin de estudiar in vitro los mecanismos de neuroprotección de la PROG, previamente descritos en modelos de injuria in vivo. La lesión (SCI) se realizó por contusión después de 7 días de cultivo y a un grupo se los incubó una hora antes de la injuria con PROG (10 μ M) durante 3 días (SCI+PROG). Primeramente se evaluó la muerte celular contando el número de células que incorporaron yoduro de propidio (PI, fluorocromo que se une al ADN) y midiendo actividad LDH (láctico deshidrogenasa) liberada al medio de cultivo. Después de la SCI se produjo un aumento de la actividad LDH (SCI: 164,7 \pm 16,52 % vs CTL: 92,31 \pm 8,62 %, p<0.05 ANOVA) y un aumento del número de células PI positivas (SCI: 68,75 \pm 14,34 vs CTL: 27,33 \pm 5,20, p<0.05 ANOVA). El tratamiento con PROG disminuyó tanto la actividad LDH (SCI+PROG: 114,9 \pm 24,48 vs SCI, p<0.05 ANOVA) como el número de células PI positivas (SCI+PROG: 22,50 \pm 10,44 vs SCI, p<0.01 ANOVA). Luego se estudió el efecto de la PROG y de la SCI sobre la población de motoneuronas, identificadas como células Neu N positivas con diámetro mayor a 5 μ m en la lámina IX. La SCI disminuyó el número de motoneuronas (CTL: 19,90 \pm 4,10 vs SCI: 8,83 \pm 1,99, p< 0.01 ANOVA), mientras que la PROG restauró los niveles (SCI+PROG: 22,30 \pm 2,48 sv SCI, p<0.001 ANOVA). Se realizaron cultivos con ratones PRKO y observamos que en el 50% de los casos el efecto neuroprotector fue mediado por el PR, mientras que en el 50% restante la neuroprotección se debió a mecanismos alternativos. Por último se evaluó, por RT-PCR, la presencia de los receptores de membrana para PROG(25-Dx, mPR alfa, mPR beta, mPR gama) como posibles mediadores de la acción neuroprotectora. Se observó por primera vez que la ME expresa las tres isoformas de mPR sugiriendo que las acciones neuroprotectoras serían mediadas por mecanismos que involucran tanto al PR clásico como a los mPR.

354. (12412) VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDÍACA EN COMPONENTES INDEPENDIENTES DE FRECUENCIA EVALUADOS MEDIANTE LA TRANSFORMADA WAVELET: CAMBIOS EN RELACIÓN AL ENVEJECIMIENTO. VIGO, DANIEL E. (1,4); SCARAMAL, MARIANO (1); GUINJOAN, SALVADOR (2); NICOLA SIRI, LEONARDO (3); CARDINALI, DANIEL P. (1,4)

(1) *Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires* (2) *Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI)*; (3) *Depto. de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos*; (4) *CONICET*

Antecedentes: La reducción global de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC) asociada al envejecimiento está determinada por una disminución de la amplitud de las oscilaciones del ritmo cardíaco en sus componentes de alta frecuencia (HF, atribuidas a la arritmia sinusal respiratoria), baja frecuencia (LF, atribuidas a las ondas de Meyer) y muy baja frecuencia (VLF, presumiblemente asociadas a oscilaciones hormonales o térmicas). Objetivo: Determinar si las oscilaciones de distinta frecuencia que componen la VFC presentan menor variabilidad en relación al envejecimiento. Métodos: Se utilizó la transformada wavelet discreta para filtrar los componentes específicos de frecuencia de la

VFC en una muestra de adultos sanos jóvenes (AJ: n = 19, edad = 26.2 ± 4.3 años, 9 mujeres) y mayores (AM: n = 19, edad = 74.7 ± 4.5, 10 mujeres). Los índices de VFC se midieron para los componentes HF, LF y VLF. El desvío estándar de los intervalos RR (SDNN) y la raíz cuadrada de la media de las diferencias al cuadrado de latidos sucesivos (RMSSD) fueron utilizadas como medidas de VFC lineal. El indicador "Sample Entropy" (SampEn) fue utilizado como medida de VFC no lineal. Se compararon diferencias mediante un test de T de muestras independientes. Resultados (media ± SD): Los adultos mayores mostraron menor SDNN (msec) en VLF (27.2 ± 13.9 vs 48.9 ± 21.1, p<0.001), LF (12.6 ± 5.6 vs 19.8 ± 9.2, p = 0.007) y HF (13.8 ± 6.0 vs 36.8 ± 17.4, p< 0.001); menor RMSSD (msec) en VLF (3.14 ± 1.56 vs 7.53 ± 2.73, p<0.001), LF (1.78 ± 0.8 vs 2.88 ± 1.39, p = 0.005) y HF (11.0 ± 4.0 vs 28.6 ± 13.2, p< 0.001) y menor SampEn sólo en VLF (0.38 ± 0.06 vs 0.46 ± 0.07, p< 0.001). En adultos mayores, la reducción de la variabilidad no lineal del componente de VLF puede reflejar una alteración específica de las influencias centrales sobre los mecanismos fisiológicos atribuidos a esta frecuencia.

355. (12414) SÍNTOMAS DEPRESIVOS EN ADULTOS MAYORES CON INSUFICIENCIA CARDÍACA: EVIDENCIA SOBRE UN "DIÁLOGO" ENTRE ACTIVIDAD AUTONÓMICA Y RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA. GUINJOAN, SALVADOR M.; CASTRO, MARIANA (2); VIGO, DANIEL (2); BERBARA, CARLOS (3); FAHRER, RODOLFO (1); PÉREZ DE LA HOZ, RICARDO (4); GRANCELLE, HUGO (1); NOGUÉS, MARTIN (1); LEIGUARDA, RAMÓN (1); CARDINALI, DANIEL (2)

(1) *Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI)*, (2) *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*, (3) *Ministerio de Salud Provincia de Entre Ríos*, (4) *Hospital de Clínicas, UBA*

La insuficiencia cardíaca y la depresión son muy prevalentes en los adultos mayores, y la coexistencia de ambas conlleva una mortalidad más elevada y un deterioro de la calidad de vida. Se desconoce el mecanismo de las consecuencias de esta asociación. OBJETIVO: Caracterizar el efecto de los síntomas depresivos sobre perfil de actividad autonómica e inflamatoria sistémica en adultos mayores con insuficiencia cardíaca descompensada. MATERIAL Y MÉTODO: Estudio transversal en 20 adultos >60 años sobre síntomas depresivos (escala de depresión de Hamilton de 21 ítems), actividad autonómica cardíaca (mediante análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca, VFC) y perfil de respuestas TH1/TH2 (niveles séricos de IFN α , TNF α , IFN γ , IL2, IL4, IL6 e IL10). RESULTADOS: Mayor sintomatología depresiva se asocia a niveles más elevados de la citoquina proinflamatoria IL6 (r=0,49, p=0,029) y posiblemente de IL2 (r=0,43, p=0,056). El nivel sérico de IL2 por su parte muestra una relación directa con un indicador de balance simpático/vagal (VFC baja frecuencia:VFC alta frecuencia, r=0,626, p=0,003) e IL-4 muestra niveles inversamente relacionados con actividad parasimpática (VFC alta frecuencia, r=-0,533, p=0,016). En esta muestra de pacientes se replicó el hallazgo previo en otras poblaciones sobre una asociación entre síntomas depresivos y mayores niveles de IL-6. Asimismo, la observación de una asociación entre perturbaciones del balance autonómico y niveles elevados de IL-2 (que participa en la respuesta inflamatoria) y disminuidos de IL-4, favorece la hipótesis de que la depresión ejerce su efecto deletéreo sobre la insuficiencia cardíaca tanto a través de anomalías autonómicas (relacionadas con arritmogénesis) como inflamatorias (relacionadas con daño tisular cardíaco y sistémico).

356. (12421) ANALISIS DE PROTEINAS SINAPTICAS EN EL HIPOCAMPO DE RATAS DIABETICAS. PIROLI, GERARDO; REAGAN, LAWRENCE (1); REZNIKOV, LEAH

(1); WOOD, GWENDOLYN (2); MCEWEN, BRUCE (2); GRILLO, CLAUDIA (1)

Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA. (1) Neurociencias, Universidad de Carolina del Sur, (2) Neuroendocrinología, Universidad Rockefeller

El hipocampo (HC) es una estructura cerebral relacionada con procesos cognitivos. Usando impregnación argéntica, se demostró que el HC sufre cambios plásticos del árbol dendrítico apical de la región CA3 en situaciones variadas, incluyendo la diabetes. En este estudio se analizó la expresión de proteínas sinápticas de HC en un modelo de diabetes, aplicando radioinmuno-citoquímica. Para ello, se usaron ratas macho controles y diabéticas por estreptozotocina (40 mg/kg i.p. en 3 días sucesivos) de 1 y 5 semanas de progresión. Cortes de HC se incubaron con anticuerpos específicos y luego con anticuerpos secundarios marcados radioactivamente, cuantificándose la señal luego de la exposición a placas de autorradiografía. Los marcadores elegidos fueron sinaptofisina, PSD-95 y MAP2. La diabetes provocó aumentos de la expresión de sinaptofisina en varias áreas del hipocampo (resultados expresados como aumento porcentual por encima del control = 100%, P<0.05 o menor) a partir de la semana 1: CA1oriens (o) 12±4, CA1radiatum (r) 8±2, CA3o 16±3 y CA3r 8±3, con efectos mayores en la semana 5: CA1o 18±8, CA1r 21±4, CA3o 22±4 y CA3r 18±4. Los incrementos de la expresión de PSD-95 en la semana 1 de diabetes fueron: CA3o 13±2, CA3r 12±3, giro dentado (GD) superior (s) 14±2 y GDinferior (i) 8±2, y en la semana 5 quedaron limitados a CA3o (13±3) y CA3r (8±2). Por su parte, los aumentos de la expresión de MAP-2 en la semana 1 de diabetes fueron: CA1o 17±3, CA3o 25±8 y GD α 11±3, desapareciendo en la semana 5. Por microscopía confocal, se confirmaron los incrementos en la expresión de sinaptofisina y PSD-95 en CA3 a 5 semanas de diabetes. La histoquímica con Fluoro-Jade, marcador de muerte neuronal, no mostró daño permanente. En conclusión, la radioinmuno-citoquímica reveló modificaciones plásticas en la expresión de proteínas sinápticas concordantes con los cambios morfológicos descriptos previamente en CA3, y también cambios en otras áreas que podrían preceder a modificaciones en la morfología neuronal.

357. (12425) EFECTO DEL OXIDO NITRICO Y EL NITROXILO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL CICLO GLUTAMATO/ GLUTAMINA EN LA RETINA DEL HAMSTER. SALIDO, EZEQUIEL MARTIN; CHIANELLI, MÓNICA; BARI, SARA; ROSENSTEIN, RUTH; SÁENZ., DANIEL

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

El óxido nítrico (NO), cuya síntesis es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), desempeña un rol relevante en la fisiología retiniana. Evidencias recientes sugieren que el nitroxilo (HNO), la forma reducida del NO, podría ser un producto primario de la reacción catalizada por la NOS. Si bien el glutamato (Glu), el principal neurotransmisor retiniano, es un regulador clave del sistema nitrérgico retiniano, la posibilidad de que el NO o el HNO regulen, en forma recíproca, la actividad glutamatérgica no ha sido examinada. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la sal de Angeli (SA) y el nitroprusiato de sodio (NP), dadores de HNO y NO respectivamente, sobre el clearance de glutamato retiniano. Para ello, se analizó el efecto de ambos compuestos sobre la actividad retiniana del ciclo Glu/glutamina (Gln). El uptake de Glu y Gln se examinó usando 3H-Glu y 3H-Gln, respectivamente. La glutamina sintetasa (GS) (que cataliza la conversión de Glu en Gln) y la glutaminasa (que cataliza la reacción inversa) se determinaron por espectrofotometría. La SA y el NP (200 μ M) disminuyeron la actividad de GS (p< 0.01, Tukey). La SA pero no el NP disminuyó el flujo de Glu y de Gln (*p< 0.05, **p< 0.01, Tukey), en tanto que la actividad de glutaminasa no se afectó por ninguno de los dadores.

	GS	influjo Glu	influjo Gln
Control	2.24 ± 0.03	31.7 ± 1.4	20.5 ± 2.8
SA	1.73 ± 0.07**	16.8 ± 1.0**	11.4 ± 1.9*
NP	1.10 ± 0.05**	28.6 ± 4.1	13.7 ± 1.2

Los resultados indican que el NO y el HNO podrían inducir un aumento en los niveles sinápticos de Glu y por lo tanto ambas especies podrían participar en el procesado de la información visual.

358. (12443) SUBTIPOS DE RECEPTORES PURINERGICOS IMPLICADOS EN LA INHIBICIÓN PRESINÁPTICA MEDIADA POR ATP EN UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO. DE LORENZO, SILVANA; VEGGETTI, MARIELA; MUCHNIK, SALOMON; LOSAVIO, ADRIANA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Laboratorio de Neurofisiología

ATP induce inhibición presináptica (IP) de la liberación espontánea de ACh en sinapsis neuromuscular de mamífero por un efecto directo sobre sus receptores (R)P2, ya que disminuye la frecuencia de potenciales de placa miniatura (fMEPPs) al 45% de los valores controles y su efecto no se observa en presencia del antagonista no selectivo de los RP2 suramina (Sur+ATP 103.9±1.7%, n=4). Estructural y farmacológicamente se distinguen 2 tipos de R para ATP: P2X-P2Y, habiéndose identificado en mamífero al menos 8 RP2Y (P2Y[1,2,4,6,11,12,13,14]). Objetivo: Identificar que subtipo/s de RP2, son responsables de la IP inducida por ATP. En hemidiafragmas de ratones se estudió el efecto de ImidoATP (análogo no hidrolizable del ATP) sobre fMEPPs en presencia de distintos antagonistas P2.PPADS (antagonista de los RP2-P2Y[1,4,6,13]) no modificó la fMEPPs con respecto al control (95.9±2.7%) ni logró prevenir la IP del análogo del ATP (PPADS+ImidoATP 50.7±2.4%, n=4), mientras que Reactivo Azul 2 (antagonista P2Y[4,6,11,12,13]) abolió la acción de ImidoATP (100.3±4.7%, n=8), sugiriendo que los RP2Y son los involucrados. Sabíamos que el efecto de ImidoATP está acoplado a la proteína G[i/o], porque NEM (que desacopla proteína G) previene el efecto de ImidoATP (NEM+ImidoATP 122.9±5.6%, n=4). Como los RP2Y12-13 están acoplados a G[i/o], estudiamos el efecto de ImidoATP en presencia de antagonistas selectivos de dichos R, 2-MeSAMP y AR-C699312MX. Ambos antagonistas previnieron el efecto de ImidoATP (2-MeSAMP 89.5±0.4%, 2-MeSAMP+ImidoATP 88.5±0.6%, n=4; AR-C699312MX 97.0±4.9%, AR-C699312MX+ImidoATP 94.0±3.6%, n=4). En unión neuromuscular de mamífero, la IP ejercida por ATP sobre la liberación espontánea de ACh es mediada vía activación de R metabotrópicos del subtipo P2Y[12] ó [13]. Como recientemente se ha demostrado que PPADS antagoniza los RP2Y[13] pero no los RP2Y[12] y en nuestros experimentos PPADS no previno el efecto de ImidoATP, podríamos especular que los R involucrados son los P2Y[12].

359. (12637) ROL Y ORIGEN DE ADENOSINA ENDOGENA EN UNIÓN NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO. DE LORENZO, SILVANA; VEGGETTI, MARIELA; MUCHNIK, SALOMON; LOSAVIO, ADRIANA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Laboratorio de Neurofisiología.

En sinapsis colinérgicas motoras, demostramos que en reposo la activación de los receptores (R) presinápticos A1 de adenosina (AD) por CCPA (agonista selectivo) inhibe la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPP) un 47%, y que en condiciones de exagerada actividad neural como ocurre al exponer las preparaciones a altas [K(+)]e (15 y 20mM), CCPA no ejerce inhibición presináptica (IP) ya que los RA1 habían sido activados previamente por AD endógena (ADe). Adenosina deaminasa (ADA) enzima que degrada la ADe en su metabolito inactivo inosina, incrementó fMEPPs un 31% y 54% en K(+) 15 y

20mM respectivamente, con respecto a los valores obtenidos sin la droga, permitiendo el efecto de CCPA. Bajo idénticos protocolos de despolarización y en presencia de DPCPX (antagonista RA1) se registraron incrementos del 79% y 66% con respecto a los controles, demostrando el rol de ADe como sustancia neuroprotectora en la placa motora. En el espacio sináptico, la concentración de AD depende de la acción de los transportadores específicos y de la originada del catabolismo extracelular de ATP, el cual se degrada a AD vía una serie de ectoenzimas, siendo última y limitante la 5'ecto-nucleotidasa. Objetivo: Estudiar en que grado contribuye el catabolismo extracelular de ATP como fuente de ADe en altas [K(+)] externo. En hemidiafragmas de ratones CF1 observamos que en K(+) 15 y 20mM, la fMEPP es 30.2±4.7/seg (n=20) y 81.7± 5.9/seg (n=20); respectivamente, mientras que en presencia de MethileneADP (AOPCP), inhibidor de 5'ecto-nucleotidasa, la liberación asincrónica alcanzó valores de 61.8±3.7/seg (n=20) y 118.1±5.3 (n=20). Bajo estas condiciones, CCPA ejerció IP (K(+) 15+AOPCP+CCPA: 45.4±2.1/seg (n= 20); K(+) 20+AOPCP+CCPA: 64.2±3.9/seg (n=20)). En condiciones de despolarización de la terminal nerviosa evocada por K(+) 15 y 20 mM, la mayor parte de ADe proviene del catabolismo extracelular del ATP permitiendo cumplir funciones como nucleósido neuroprotector y neuromodulador.

ENDOCRINOLOGIA C

360. (11871) DETECCIÓN DE FENOTIPOS Y GENOTIPOS ASOCIADOS A LA DMO EN NIÑOS PEQUEÑOS PARA LA EDAD GESTACIONAL. PÉREZ, A.; MIRAS, M.(1); SILVANO, L.(1); MUÑOZ, L.(1); PRETEL, E.; PICOTTO, G.; MARTÍN, S.(1); ELÍAS, V.; CASTRO, L.(1); DE GRANDIS, S.(2); ARMELINI, P.(2); TOLOSA DE TALAMONI, N.

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, FCM, UN Córdoba. (1) Hospital de Niños, (2) UCC y UN de Córdoba.

Los niños pequeños para la edad gestacional (PEG) son aquellos nacidos con un peso ó talla inferior a la correspondiente a su edad gestacional. El tamaño del cuerpo tiene asociación con la densidad mineral ósea (DMO) la cual está determinada por factores genéticos y ambientales. El objetivo del trabajo es establecer determinantes genéticos de la DMO en niños PEG y su relación con parámetros auxológicos y bioquímicos. Se estudiaron 72 niños: controles, PEG con recuperación postnatal (PEG-CR) y PEG sin recuperación (PEG-SR). Se determinaron parámetros antropométricos, bioquímicos (calcemia, fosfatemia, PTH, osteocalcina y beta cross-laps por ECLIA, IGF-I y IGFBP3 por IRMA), se aisló ADN de sangre entera y se determinaron los genotipos del receptor de vitamina D (VDR) y del receptor de estrógenos (ER) utilizando las restrictasas Bsm-I y Fok-I (VDR) y Pvu-II y Xba-I (ER). La DMO se analizó en columna lumbar y cuello de fémur con un densitómetro de absorción de rayos X de energía dual (Norland). La DMO de niños PEG-SR fue estadísticamente menor a la de niños PEG-CR y controles (p < 0.05). Los niños PEG-SR mostraron valores séricos de IGF-I y de IGFBP3 más bajos con respecto a los controles y PEG-CR (p < 0.01). La distribución genotípica de los sitios polimórficos de los genes de VDR y ER no mostró diferencias significativas entre los grupos. En relación a la asociación entre la DMO y los genotipos de VDR, en el grupo control se observó una mejor DMO femoral en los niños Ff con respecto a los niños FF (Z score: Ff: 0,10 FF: -1,28 p < 0,05). En los demás grupos hubo una tendencia de mejor Z score en heterocigotas y peor en FF. Los niños PEG-SR presentan fenotipos bioquímicos que los diferencian de los controles y PEG-CR. El genotipo Ff se asoció a una mejor DMO de femur en niños controles, e igual tendencia se observó en los grupos PEG-CR y SR.

361. (12159) PARTICIPACIÓN DE PKC Y MAPK EN LA ACCIÓN NO GENÓMICA DE PROGESTERONA. CUTINI,

PABLO (1); SELLÉS, JUANA (1); MASSHEIMER, VIRGINIA (1,2)

(1) Cátedra de Análisis Clínicos II, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS. (2) CONICET

Hemos demostrado que, en tejido aórtico de rata, la Progesterona (Pg) estimula en forma no genómica la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) y activa el sistema PLC/DAG. Siendo la NOS una enzima regulada por calcio y fosforilación, en este trabajo investigamos la participación de estos eventos en el mecanismo de acción rápida de Pg. Empleamos anillos de aorta aislados de ratas hembras fértiles, tratados "in vitro" (1-15 min) con Pg. Usando ensayos de fosforilación de sustrato específico, estudiamos la regulación por Pg de la PKC y MAPK. Tratamientos de 5 min. con 1-100nM Pg estimulan significativamente la actividad MAPK (156 ± 8.9 vs 245 ± 29 cpm/mg prot/min, control vs 10nM Pg). Se demostró también que la hormona (1-100nM) estimula a actividad PKC a los tiempos ensayados, obteniendo un marcado estímulo a los 5 minutos de tratamiento (2.06 ± 0.38 vs 13.95 ± 2.05 pmol Pi/mg prot/min, control vs 10nM Pg), perfil temporal semejante al obtenido previamente para cambios en DAG. Para evaluar la participación del calcio extra e intracelular sobre la actividad NOS regulada por Pg, empleamos un antagonista de canales de calcio (verapamil 10mM), y los compuestos thapsigargin (TG 1mM), y ácido ciclopiazónico (ACP 10mM). El estímulo sobre la síntesis de NO se suprime en presencia de verapamil (1.46 ± 0.03 vs 0.59 ± 0.20 , Pg vs Pg+verapamil; control= 0.56 ± 0.11 pmol NO/mg prot), sugiriendo la participación del influjo de calcio del medio extracelular. Cuando se realizó el ensayo en un medio libre de calcio, y se provoca la liberación de calcio de depósitos con TG + ACP, y posterior tratamiento con la hormona, el estímulo sobre la actividad NOS se reduce de 160 % a 45 % sobre el control ($p < 0.01$), suponiendo que la liberación de calcio de pools endógenos también contribuiría a la acción del esteroide. Concluimos que el mecanismo no genómico de Pg a nivel vascular involucra la participación del sistema mensajero del calcio, MAPK y PKC.

362. (12177) EVIDENCIA MORFOLÓGICO-FUNCIONAL DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EMBRIONARIA "IN VITRO". MORENO, GRISELDA (1); REYNALDO, MIRTA (2); SPINEDI, EDUARDO (1); CARRI, NESTOR (2)

Unidad de Neuroendocrinología. IMBICE. Laboratorio de Biología del Desarrollo (2). IMBICE

Poco se conoce sobre la ontogenia y diferenciación del sistema neurosecretorio supraóptico-paraventriculo-neurohipofisario (peptidérgico). La utilización de un cultivo primario de células hipotalámicas, de origen embrionario, podría permitir estudiar la diferenciación de estas células. La sobrevida de neuronas en cultivo mejora cuando la procedencia es de tejido embrionario, aunque se ha encontrado que las neuronas que sobreviven en estos sistemas expresan baja vasopresina (AVP) y sólo trazas de occitocina (OXY) en condiciones basales. El objetivo del presente estudio fue desarrollar un cultivo neuronal primario (CNP) que permita la evaluación del sistema magnocelular-hipotalámico (AVP- y OXY-érgicos) y estudiar los efectos de la interacción neuronal-glial. Se realizó un CNP de material obtenido por disociación mecánica de hipotálamo E18 (ambos sexos) de rata. Se utilizó un medio de cultivo apropiado para neuronas conteniendo un inhibidor de proliferación. La caracterización del CNP neurosecretorio se realizó por la detección en el medio de cultivo de AVP y OXY, a los días 8, 10, 13, 15 y 17. Se realizó inmunocitoquímica, en cultivos de los diferentes días, identificándose a las células gliales, con anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y a las neuronas, con anti-AVP y anti-OXY. Los resultados indican una liberación espontánea de AVP y OXY, en forma diferencial dependiendo del día de cultivo, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en la secreción al d13, vs. d8, para AVP (pg/ml): $23,34 \pm 1,61$ vs. $15,98 \pm 1,02$ y para OXY (pg/ml): $119,95 \pm 12,25$ vs. $44,96 \pm 4,86$, respectivamente. También encontramos que en el d17 se alcanzó sólo un $6,67 \pm 2,08$ % de células gliales en el material

analizado. Podemos concluir que el diseño experimental utilizado resulta en un buen bioensayo nervioso para el estudio de la función del sistema peptidérgico hipotálamo-neurohipofisario, y de las interacciones de éste con las células gliales.

363. (12346) LA METFORMINA INCREMENTA LA ACTIVIDAD OSTEOGÉNICA DE OSTEOBLASTOS EN CULTIVO. GANGOITI, M.VIRGINIA(1); SCHURMAN, LEON(2); CORTIZO, ANA M(1); MCCARHTY, ANTONIO D(1); BLANCO, A(2); SEDLINSKY, CLAUDIA(2)

Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Centro de Endocrinología y Metabolismo, Hospital Francés, Buenos Aires

La metformina, una biguanida con acción insulino-sensibilizadora, es ampliamente utilizada para el tratamiento de pacientes con síndrome metabólico y Diabetes mellitus tipo 2. Otras drogas que disminuyen la resistencia insulínica (rosiglitazona) secundariamente provocan osteopenia, promoviendo la diferenciación de células progenitoras de médula ósea hacia la adipogénesis e inhibiendo el reclutamiento de osteoblastos. En este trabajo evaluamos los efectos de la metformina sobre la apoptosis (método de anexina-V/ioduro de propidio), proliferación (bioensayo de cristal violeta), diferenciación (fosfatasa alcalina y producción de colágeno) y mineralización (coloración con rojo de alizarina-S) de osteoblastos MC3T3E1 en cultivo. Luego de 24 horas de cultivo, la metformina (25-500mM) incrementó significativamente tanto la apoptosis ($124-141\%$ basal, $p < 0.05$) como la proliferación celular ($110-115\%$ basal, $p < 0.05$) en forma dependiente de la dosis. Al cabo de 2 semanas de cultivo en presencia de b-glicero fosfato y ácido ascórbico, la metformina aumentó la expresión de dos marcadores de diferenciación osteoblástica: la actividad de fosfatasa alcalina ($111-114\%$ basal, $p < 0.02$, dosis de 100-500mM) y la producción de colágeno tipo I ($125-140\%$ basal, $p < 0.01$, dosis de 25-500mM) Este efecto fue también dependiente de la concentración de la droga en el medio de cultivo. Finalmente, luego de 3 semanas, las células cultivadas con metformina mostraron un gran incremento en la formación de nódulos de mineralización ($120-290\%$ basal, $p < 0.01$, dosis de 200-500mM). Los resultados de este estudio muestran por primera vez que la metformina ejerce efectos directos sobre osteoblastos en cultivo estimulando su capacidad de formación ósea. Estos efectos osteogénicos in vitro de la metformina podrían tener relevancia clínica, en vista de la posible acción pro-osteopélica de otros fármacos insulino-sensibilizantes.

364. (12363) NIVELES ELEVADOS DE ANTICUERPOS ANTIPEROXIDASA TIROIDEA (ATPO) EN VARONES CON PATOLOGÍA PROSTÁTICA. ROSALES, MÓNICA (1); GROSSMAN, HALINA (1); DEL RIO, ALBERTO (1); MAZZA, OSVALDO (2)

(1) Departamento de Bioquímica Clínica-Endocrinología. FFyB-U.B.A. Hospital de Clínicas. (2) Cátedra de Urología. Hospital de Clínicas.

Se conoce la asociación de autoinmunidad tiroidea (AIT) con otras enfermedades autoinmunes (AI) y recientemente se la relaciona con enfermedades no AI como el cáncer de mama (1). Hay evidencias que describen procesos AI en la Hiperplasia Benigna de Próstata (BPH)(2). A los TPOAb se les adjudica una función importante en la patogénesis de la AIT. Tienen efecto citotóxico y sus niveles no se relacionan con la función tiroidea. Objetivo: evaluar los niveles de TPOAb en patologías prostáticas. Materiales y Métodos: de 2978 varones que se presentaron a la "Semana de la Próstata 2003" se seleccionaron 134 pacientes entre 50 y 65 años con Antígeno Prostático Específico (PSA) menores de 10,00 ng/ml. A todos se les realizó el exámen digital rectal (EDR) y se midieron PSA y TPOAb por un ensayo inmunoenzimático MEIA y quimioluminiscente IMMULITE respectivamente. Se dividieron en 3 grupos: A(Control)n=42: PSA menor de 2,5 ng/ml y EDR normal, B(HPB)n=45 y C(CaP)n=48E1 diagnóstico de CaP y BPH se realizó mediante histopatología. Resultados: se muestran en la tabla.

Grupos	n	Mediana (IU/ml)	95%CI (IU/ml)	% Positividad	ANOVA (Kruskal Wallis)	Dunn's Test
A (Control)	42	18,5	13,7-23,4	11%	p= 0.0031	A vs. B: p<0,01**
B (HPB)	45	57,6	26,6-88,7	31%	p= 0.0031	B vs C: p<0,05 *
C (CaP)	48	32,4	15,8-49,0	21%	p= 0.0031	A vs. C p>0,05

El porcentaje de positividad de TPOAb obtenido en los grupos B y C es mayor que el referido en la literatura (12% NHANES III) para la población general y coincide con el calculado en el grupo A. Los niveles aumentados de TPOAb encontrados en el grupo B y C abren un nuevo camino para correlacionar estos hallazgos con el mecanismo fisiopatológico y establecer la utilidad clínica en estos pacientes. Referencias: 1- Jiskra,Z,et al. *Physiol. Res.* 53:693-702,2004. 2- Zisman, A. et al. *The J. of Urology.*154(3):1052-1055, September 1995.

365. (12422) CARACTERIZACIÓN DEL EFLUJO DE L-ARGININA EN CÉLULAS ADRENALES: EFECTO DE ACTH. MARTINEZ CALEJMAN, CAMILA; REPETTO, ESTEBAN M.; ASTORT, FRANCISCO; BESIO MORENO, MARCOS; PIGNATARO, OMAR; CYMERYNG, CORA.

Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA: Instituto de Biología y Medicina Experimental. CONICET.

En trabajos previos sugerimos que la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) en células adrenales puede ser regulada por el aporte de su sustrato L-arginina y demostramos un efecto estimulador de ACTH sobre el flujo de L-arginina y la producción de nitritos en la línea celular adrenocortical de ratón Y1. Asimismo identificamos los transportadores y+ (CAT 1 y CAT2) e y+LAT (CD-98 e y+LAT-2). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el mecanismo de eflujo de L-arginina en estas células. Los resultados obtenidos indicaron un eflujo significativo de L-arginina en ausencia de aminoácidos en el lado opuesto de la membrana que se incrementó por la presencia de L-Lys (2 mM) o L-Gln (2 mM) en el exterior celular (B: 83,8 ± 6,4; L-Lys: 167,1 ± 18,6; L-Gln: 185,3 ± 28,9 dpm/min/mg prot, p< 0.05 vs basal). La preincubación en presencia de NEM inhibió el eflujo en todos los casos. El reemplazo de Na+ por colina bloqueó el incremento en el eflujo de L-arginina trans estimulado por L-Gln (Na+: 185,3 ± 28,9; col: 101,6 ± 13,5 dpm/min/mg prot). El eflujo de L-arginina fue significativamente menor en presencia de ACTH (C: 71,37 ± 9,16 dpm/min/μg proteína vs A: 54,83 ± 16,7 dpm/min/μg proteína; p<0.05). El tratamiento con inhibidores de PKA, PKC y de PI3K bloqueó el efecto de ACTH sobre el eflujo de L-arginina. La caracterización del eflujo de L-arginina en las células Y1 es consistente con la expresión y actividad de dos sistemas de transporte de L-arginina: el y+, dado el efecto inhibitorio del NEM en condiciones basales y el y+L, que es trans-estimulado por aminoácidos neutros en el exterior celular pero sólo en presencia de Na+. Este sistema podría proveer de L-arginina a células vecinas intercambiándola por aminoácidos neutros y Na+. De acuerdo a resultados previos que demostraban un efecto estimulador de ACTH sobre el uptake de L-arginina los resultados presentados sugieren que el efecto neto de ACTH es incrementar el influjo de L-arginina en las células Y1.

366. (12428) ESTUDIO DE LOS SISTEMAS NITRÉRGICO Y DE GENERACION DE CO EN CORTEZA ADRENAL DE RATA EN UN MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL. ASTORT, FRANCISCO; MARTINEZ CALEJMAN, CAMILA; REPETTO, ESTEBAN M.; PIROLI, GERARDO; CYMERYNG, CORA

Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA.

Se ha relacionado el estrés oxidativo con el desarrollo y progresión de las complicaciones vasculares de la diabetes. La

hiperglucemia provoca en forma directa la formación de especies reactivas del oxígeno mediante incrementos en la actividad de PKC, MAPK y lipoxigenasa y aumentos del hemo celular, radicales libres y productos finales de glicosilación avanzada. El objetivo de este trabajo fue analizar los sistemas nitrérgico y de generación de CO en la corteza adrenal de ratas en un modelo de diabetes experimental inducida por estreptozotocina (STZ) (tipo 1). Tratamiento de animales: Se trataron ratas Wistar macho con STZ (40 mg/kg i.p. en tres días sucesivos), empleándose sólo aquellas que presentaron glucemia en ayunas > 300 mg%. Resultados: Se observó un incremento significativo en los niveles de ARNm (RT-PCR semicuantitativo) y proteínas (western blot) para la isoforma inducible HO-1 a las cuatro semanas de tratamiento. No hubo alteraciones en los niveles de HO-2. La expresión de eNOS y nNOS también aumentó en los animales diabéticos en el mismo período. Ambas actividades enzimáticas se incrementaron significativamente (NOS: C: 5,45 ± 0,63 pmol/min/mg vs STZ: 10,93 ± 0,52 p< 0,001; HO: 0,036 ± 0,016 pmol/2h/mg vs STZ: 0,100 ± 0,012, p< 0,05). Asimismo se observó en los animales diabéticos un incremento en los niveles de ARNm para los transportadores de L-arginina: CAT-2, CD-98 e y+LAT2, pero no CAT-1. Células aisladas de adrenales de animales STZ produjeron mayores niveles de nitritos que las provenientes de ratas controles (C: 2,6 ± 0,3 vs STZ: 4,3 ± 0,6 μM). Durante la progresión de la diabetes se produce inducción de las actividades de NOS y HO adrenales posiblemente por el aumento de especies reactivas del oxígeno asociado a la hiperglucemia. Dado que la actividad de NOS es regulada por la disponibilidad de L-arginina, el aumento en la expresión de sus transportadores contribuiría a la regulación "in vivo" de dicha actividad.

367. (12434) ACTIVIDAD DE CA2+-ATPASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN RATAS CON INSULINORRESISTENCIA. ALZUGARAY, MARÍA EUGENIA; GARCÍA, M. ELISA; MAIZTEGUI, BÁRBARA; ROSSI, JUAN P.; GAGLIARDINO, JUAN J.

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

Previamente demostramos que la administración de una dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce insulinorresistencia (IR), aumento de la secreción de insulina in vitro a altas concentraciones de glucosa y cambios en el patrón de expresión de las diferentes isoformas de Ca(2+)-ATPasa de membrana plasmática (PMCA) insular. Objetivo: Determinar si los cambios generados en la expresión de las isoformas de PMCA por la IR inducida por DRF se acompañan de modificaciones en la actividad de PMCA insular. Materiales y métodos: Se usaron ratas Wistar macho divididas en dos grupos: control alimentado con dieta comercial y agua corriente (C) y alimentado con la misma dieta y el agregado de fructosa al 10% en el agua de bebida (F) durante 21 días. Al momento del sacrificio se extrajo el páncreas de los animales, se aislaron islotes (digestión con colagenasa) y se los homogeneizó. En el homogenizado se determinó cantidad de proteína por espectrofotometría y actividad de PMCA. Resultados: La actividad de PMCA aumentó en función de: 1) el número de islotes: 10 islotes: 8.04±1.1, 15 islotes: 11.4±1.18, 20 islotes: 14.91±1.91 nmoles Pi/h. 2) la concentración de Ca(2+): 0.68 μM: 9.11±0.65; 2.19 μM: 11.34±0.73; 3.79 μM: 12.69±0.33 nmoles Pi/h. La actividad de PMCA medida en islotes de ambos grupos fue significativamente menor en los animales alimentados con fructosa (C 1.57±0.11 (n 32); F 1.22±0.09 nmoles Pi/h/μg proteína (n 33), p < 0.02). La IR inducida por DRF produce un cambio en la expresión de la PMCA y una marcada disminución de la actividad de la enzima. Probablemente esto último resulte en un aumento del Ca(2+) citosólico que explicaría el hallazgo previo del aumento de secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

368. (12435) MECANISMO DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOQUINASA HEPÁTICA EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA.

MASSA, M. LAURA; LENZEN, SIGURD(2); GAGLIARDINO, JUAN J.(1)

(1) CENEXA (UNLP-CONICET), Fac Cs Médicas, UNLP.
(2) Institute Clinical Biochemistry, Alemania

Introducción: La glucoquinasa (GQ) hepática se asocia a una proteína reguladora nuclear; estudios realizados con líneas celulares demostraron que la unión de la proteína reguladora a la fructosa-1-P induce la traslocación y activación de la GQ. Por otra parte, la administración de dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce insulinoresistencia y aumento de la actividad de GQ insular. **Objetivo:** Estudiar los cambios inducidos por la DRF sobre la actividad de GQ hepática y su mecanismo de producción. **Material y Métodos:** Se alimentaron ratas Wistar macho (3 semanas) con dieta comercial (C) o con la misma dieta más el agregado de fructosa (F) al 10 % en el agua de bebida. Al sacrificio se determinaron glucemias, trigliceridemias (TG) e insulinemias; se extrajo el hígado, se homogeneizó en buffer PBS pH 7.4 y se centrifugó (600 g) para separar las fracciones citoplasmática y nuclear; esta última se incubó con digitonina (40 µg/ml). En ambas fracciones se estudió la actividad (espectrofluorometría) y la expresión de la GQ (Western blot y cuantificación de las bandas con cámara digital y software Kodak 1D). **Resultados:** F vs. C: Glucemias 148 ± 4 vs. 129 ± 5 mg%, $p < 0.05$; TG 113.9 ± 7 vs. 67.6 ± 7 mg/dl, $p < 0.001$; Insulinemias 4.4 ± 0.6 vs. 2.7 ± 0.5 ng/ml, $p < 0.02$; GQ actividad citoplasmática respecto a actividad total (% C/T) 82 ± 2 vs. 32 ± 2 , $p < 0.001$; en ambas fracciones citoplasmáticas la expresión de GQ (Western) fue similar, mientras que a nivel de la fracción nuclear disminuyó significativamente en las ratas con DRF. Nuestros resultados demuestran que la DRF aumenta la actividad de GQ promoviendo su traslocación citoplasmática sin cambiar sus niveles de expresión. Esta es la primera demostración del fenómeno de traslocación de GQ obtenido in vivo.

369. (12439) REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE HEXOQUINASA INSULAR EN HAMSTERS CON INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA. MAIZTEGUI, BárBARA; BORELLI, M. INÉS; MASSA, M. LAURA; DEL ZOTTO, HECTOR; GAGLIARDINO, JUAN J.

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

La administración de dieta rica en sacarosa (DRS) a hamsters normales induce insulinoresistencia acompañada de aumento del metabolismo de glucosa, de la relación hexo (HQ)/glucoquinasa (GQ) insular y disminución del umbral de secreción de insulina en respuesta a la glucosa. **Objetivo:** Estudiar el efecto de la administración de DRS a hamsters normales sobre la correlación entre actividad, expresión y niveles de ADNc de la HQ y la GQ insular. **Material y Métodos:** Hamsters macho normales de 21 días de edad se alimentaron durante 5 semanas con dieta comercial (C) o la misma dieta con el agregado de sacarosa al 10 % en el agua de bebida (S). Al final de ese período los animales se sacrificaron midiendo glucemia (método enzimático) e insulinemia (RIA) y se aislaron islotes (colagenasa). Se cuantificó la proteína de HQ y GQ insular mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos y se realizó RT-PCR para determinar los niveles de ADNc de ambas enzimas. La densidad de las bandas se cuantificó utilizando una cámara digital y software Kodak 1D. **Resultados:** (S vs. C). Las glucemias fueron similares en ambos grupos (115 ± 5 vs. 110 ± 3 mg/dl); los animales S tuvieron insulinemias significativamente mayores (11.5 ± 1.5 vs. 3.6 ± 1.1 ng/ml, $p < 0.001$). La expresión proteica de HQ aumentó en S, manteniéndose sin cambios la de GQ: (HQ %S/C: 201 vs. 100; GQ %S/C: 107 vs. 100). Los valores de ADNc de ambas enzimas fueron similares en ambos grupos (%HQ/Tubulina: 13 vs. 10.2; %GQ/Tubulina: 24.9 vs. 25.9). Los cambios registrados tanto en la actividad como en la expresión de la HQ no se correlacionaron con los cambios en los niveles de ADNc, sugiriendo que el aumento de la actividad de dicha enzima sería consecuencia de cambios adaptativos post-transcripcionales en respuesta a la sobrecarga nutricional.

370. (12479) INTERACCIÓN DEL SISTEMA OPIOIDE (SO) Y SEROTONINA EN LA SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL) AL FINAL DE LA PREÑEZ EN LA RATA. ROL DE DOPAMINA (DA). SOAJE, MARTA; VILLEGAS GABUTTI, CARLOS; JAHN, GRACIELA; DEIS, RICARDO

IMBECU-CONICET

El final de la preñez es un período endócrino particular para la regulación de PRL, progesterona (Pg) participa manteniendo un tono dopaminérgico elevado. Sistemas descriptos como estimuladores de PRL tales como el SO ó el serotoninérgico, inhiben la liberación de PRL. Se ha demostrado que el bloqueo de Pg al final de la preñez disminuye el tono dopaminérgico, facilitando la liberación de PRL, efecto potenciado por el antiopioide Naloxona (NAL). Mientras el SO inhibe PRL en ausencia de Pg, Serotonina (5-HT) inhibe su liberación en presencia de Pg elevada. **Objetivo:** 1) Establecer si existe interacción entre el SO y Serotoninérgico en el control inhibitor de la secreción de PRL al final de la preñez, 2) Determinar el rol de DA en este efecto midiendo la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en hipotálamo medio basal (HMB). **Metodología:** Ratas preñadas se inyectaron s.c en el día 18 de preñez con pCPA (inhibidor de la síntesis de 5-HT), a dosis que induce secreción de PRL (200 mg/kg) ó más bajas (100 y 150 mg/kg) y con NAL (2 ó 10 mg/kg, i.p) ó su vehículo (V) a las 17.30 h del día 19. Se obtuvo sangre troncal a las 18 h para determinar PRL y Pg por RIA y en el grupo tratado con pCPA 200 mg/kg se obtuvieron los HMB para la determinación de TH por western blot. **Resultados:** pCPA 200 mg/kg aumentó PRL (31 ± 7 mg/ml vs. $V: 3 \pm 0.3$ mg/ml) y NAL 2 mg/kg potenció este efecto (132 ± 29 ng/ml). pCPA 100 y 150 mg/kg estimularon la secreción de PRL solo asociados a NAL 10 mg/kg. pCPA 200 mg/kg inhibió la expresión de TH (83 ± 4 %) vs V (100 ± 4 %), sin modificar la Pg sérica. 1) el efecto estimulador de NAL sobre PRL en ratas tratadas con pCPA, sugiere una interacción entre los dos sistemas para inhibir la secreción de PRL al final de la preñez, 2) La menor expresión de TH en el grupo tratado con pCPA sugiere una actividad dopaminérgica disminuida en HMB, que desencadenaría la acción estimuladora de NAL sobre la secreción de PRL, a pesar de los elevados niveles de Pg.

371. (12487) ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE EL DESARROLLO DE OLIGOBODIES CONTRA LA PROTEÍNA PRP BOVINA. VALDIVIESO, ANGEL GABRIEL; TAMINELLI, GUILLERMO L.; SANTA COLOMA, TOMÁS A

Instituto de Investigaciones Bioquímicas (UBA, CONICET) y Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina (angelvaldi@hotmail.com)

Los oligobodies (Obs) son reactivos sintéticos basados en oligonucleótidos de cadena simple capaces de reconocer proteínas. Se distinguen de los aptámeros en su estrategia de selección: los Obs están basados en una selección por especificidad y los aptámeros por alta afinidad. Pueden ser amplificados por PCR, lo cual aumenta los límites de detección a los niveles de detección por PCR, algo imposible de obtener con anticuerpos. El objetivo de éste trabajo fue desarrollar Obs contra péptidos sintéticos de diferentes regiones de PrP bovina (PrPC) y probarlos en su habilidad para reconocer PrPC y PrP recombinante (rPrP). No se trabajó con priones. Para seleccionar los Obs, se construyeron diferentes librerías de oligonucleótidos de secuencia al azar (entre 55 y 75 mer). Las selecciones iniciales se realizaron incubando membranas saturadas con los péptidos sintéticos y utilizando bibliotecas de cadena simple. Los oligonucleótidos eluidos fueron amplificados por PCR utilizando uno de los primers marcado con biotina. Los Obs obtenidos contra los diferentes péptidos fueron probados en su habilidad para reconocer las proteínas PrPC y rPrP bovina usando una mezcla de proteínas totales en Western blots. Como resultado se obtuvieron Obs policlonales capaces de reconocer rPrP (50 ng) en Western blots, pero con baja afinidad y especificidad. Agradecimientos: Beca del CONICET a A.G. Valdivieso. Los métodos y estrategias para producir estos reactivos no resultaron adecuados para PrP. Se están diseñando

nuevas estrategias para aumentar tanto la especificidad como la afinidad de estos reactivos.

372. (12504) MICROANGIOPATIA DIABETICA: MODELO DISCRIMINANTE LINEAL. CARRERA, LARISA (1); ETCHEPARE, RAUL(1); D'ARRIGO, MABEL(2); D'OTTAVIO, ALBERTO(1); VALVERDE, JUANA(2); FORESTO, PATRICIA(2)

(1) *Cát. Hist. y Embr., Fac. Cs. Médicas. CIUNR.* (2) *Lab. de Inmunoheorreología. Depto de Bioq Clínica. Fac. Cs. Bioq y Farm.UNR.*

El desarrollo de la microangiopatía diabética puede ocasionar la aparición de lesiones en piel y otros territorios. Partiendo de parámetros detectados durante la evolución de una patología, es factible la clasificación en categorías de los pacientes y la adopción de decisiones oportunas que eviten consecuencias indeseables. A fin de identificar variables hemorreológicas que permitan caracterizar mejor a los pacientes diabéticos se estudiaron: viscosidades plasmática a 2,30 seg-1 y de sangre entera a 4,60 y 230 seg-1, fibrinogenemia, agregación eritrocitaria (ASP) y deformabilidad eritrocitaria (Tk), en 40 individuos diabéticos (27 sin lesiones y 13 con ellas) y 30 no diabéticos. Se seleccionaron diferentes combinaciones de variables y mediante la técnica estadística de análisis discriminante se obtuvieron dos modelos (a) $F_{disc} = 0.58 ASP - 0.61 Visc_{se230} + 0.89 \text{ fibrinogenemia}$ para discriminar entre sanos y enfermos con lesiones, y (b) $F_{disc} = 6.325 ASP - 0.347 Visc_{se230} + 0.013 \text{ fibrinogenemia}$ para discriminar entre sanos, enfermos sin y con lesiones. Ambos modelos resultaron pertinentes debido a: Mod. 1) coeficiente de correlación canónica: 0,924, distancia de Mahalanobis: altamente significativa ($P < 10^{-3}$), porcentaje de clasificación correcta (100%) y los centroides de cada grupo: 0.94 y 5.63 respectivamente, y Mod 2) coeficiente de correlación canónica: 0.898, distancia de Mahalanobis altamente significativa ($P < 10^{-3}$), porcentaje de clasificación correcta (85.7%) y los centroides de cada grupo: - 1.9, 1.9 y 2.47, respectivamente. Los modelos hallados posibilitan definir un perfil microcirculatorio de pacientes diabéticos y la adopción de conductas terapéuticas susceptibles de prevenir daños irreversibles.

373. (12603) IDENTIFICACION DE UNA NUEVA MUTACION SIN SENTIDO EN EL GEN STAT 5B ASOCIADA CON INSENSIBILIDAD A LA HORMONA DE CRECIMIENTO. MARINO, ROXANA; BERNASCONI, ANDREA; CIACCIO, MARTA; ROSSI, JORGE; OLEASTRO, MATIAS; OMANI, ALICIA; ZELASCO, MARTA; RIVAROLA, MARCO A; BELGOROSKY, ALICIA

Servicios de Endocrinología e Inmunología, Hospital de Pediatría Garrahan.

Recientemente han sido descriptos dos pacientes con insensibilidad a la hormona de crecimiento (GH) asociada a inmunodeficiencia a causa de mutaciones en el gen stat 5b (A630P, 1191insG). Se describe una nueva mutación sin sentido en el gen stat 5b en un paciente con insensibilidad a GH. Se trata de una niña de 16 años, prepúber, con fenotipo de déficit de GH y severo retraso del crecimiento desde el primer año de vida. Su edad ósea es 7 años, su talla (SDS) -9,91 y su peso (SDS) -6,7. Los niveles séricos de GH tomados a intervalos de 20 min. (2,5; 4,2;4,6; 6,6 y 4,2 ng/ml) y la respuesta sérica de GH a los test farmacológicos fueron normales. Los valores séricos de IGF-1 basal y bajo rhGH fueron no detectables. Desde el primer año de vida presenta infecciones severas múltiples (dérmicas, respiratorias y digestivas) y patología pulmonar crónica con bronquiectasias. Requerimientos de oxígeno desde los 15 años. Se descartó infección por el virus de inmunodeficiencia humana, citomegalovirus y virus de Epstein Barr. Presentó moderada disminución de células T y marcada disminución de natural killer. Luego de la secuenciación del gen stat 5b se halló un cambio homocigoto que resulta en una mutación sin sentido en el exón 5

(R152X). Los padres y hermano de la paciente resultaron heterocigotas. La ausencia en la expresión de la proteína stat 5b fue confirmada por análisis de western blot en una línea celular B inmortalizada con virus Epstein Barr de la paciente. Por citometría de flujo se halló una disminución en la fosforilación de la stat 5 (a/b) en células totales mononucleares de la paciente cuando fueron estimuladas con IL-2 (1000 UI). Reportamos una nueva mutación del gen stat 5b asociada a insensibilidad a GH e inmunodeficiencia. Los estudios en esta paciente evidencian la importancia de la stat 5b en la señalización de la GH como así también en la respuesta inmune mediada por citoquinas.

374. (12630) REGULACIÓN DEL PROMOTOR DE LA ENZIMA 3βHSD TIPO II POR TNFALFA Y AMPc. PEPE, CAROLINA; BAQUEDANO, MARÍA SONIA; RIVAROLA, MARCO; BELGOROSKY, ALICIA; SARACO, NORA

Laboratorio de Investigación, Hospital de Pediatría Garrahan

La enzima 3βHSDII es esencial para la síntesis de esteroides y su expresión está inversamente asociada a la producción de andrógenos en la adrenal humana, sugiriendo un rol en la adre-narca. El TNFalfa es producido en la corteza adrenal, donde reduce el cortisol bajo ACTH y aumenta los andrógenos. El AMPc es el segundo mensajero de la vía de la ACTH y estimula la 3βHSDII. Analizamos el rol de TNFalfa sobre el promotor 3βHSDII mediante transfección en H295R (línea adrenal humana) con 3 construcciones conteniendo fragmentos del promotor (CI:-1057; CII:-297; CIII:-107) y la luciferasa como gen reportero. Se observó un aumento en la luciferasa bajo AMPc(0.5mM) en las 3 construcciones (CI:4, CII:3, CIII:1.8 veces respecto al basal). Los ensayos fueron realizados por triplicado. TNFalfa (10ng/ml) disminuye la actividad del promotor inducida por AMPc en las 3 construcciones. Por mutagénesis dirigida se evaluó la importancia de 3 posibles sitios de respuesta a AMPc identificados en la región -107 (2 sitios AP-1 y 1 sitio SF-1) en dicha respuesta y en el bloqueo de la misma por TNFalfa. La mutación del sitio SF-1 reduce fuertemente la actividad basal y la activación absoluta por AMPc, aunque continúa observándose un incremento respecto al basal. Sólo un sitio AP1 mutado muestra una reducción significativa en la actividad basal. La respuesta a AMPc y la acción inhibitoria del TNFalfa sobre dicha respuesta se conserva en ambas mutaciones de AP1. La mutación en SF-1 no evidencia una disminución significativa por TNFalfa en presencia de AMPc. Finalmente, los dos sitios AP-1 estudiados no estarían involucrados en la activación del promotor por AMPc ni en la inhibición de ésta por TNFalfa. El sitio SF-1 muestra ser un sitio importante en la actividad basal del promotor. Nuestros resultados indicarían un rol del mismo en la respuesta a AMPc y en la disminución de la misma por TNFalfa.

375. (12646) EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON LEVOTIROXINA SOBRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOTIROIDISMO CLINICO Y SUBCLINICO. REPETTO, MARISA; ABALOVICH, MARCOS (2); GUTIERREZ, SILVIA (2); DALGHI, MARIANELA (1); PAPPALARDO, VERÓNICA (2); MORASSUTTI, MARISA (2); LLESUY, SUSANA (1)

(1) *Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.* (2) *División de Endocrinología. Hospital Durand.*

En hipotiroidismo la disminución del metabolismo y la posible disminución de la producción de radicales libres ha sido poco evaluada. Objetivos: El objetivo de este trabajo fue evaluar el balance rdox en pacientes con hipotiroidismo clínico o severo (HC) y subclínico (HSC) y su respuesta al tratamiento con levotiroxina (L-T4). Material y métodos: 44 pacientes (40±20 años):15 HC (T4= 1,66 ± 0,95 ug/dL; TSH= 61,5 ± 32,6 mUI/L) y 29 HSC (T4= 5,75 ± 0,95 ug/dL; TSH=11,60 ± 8,06 mUI/L). Control= 30 eutiroides sanos. 15 pacientes HC y 9 HSC fueron reevaluados después del tratamiento con L-T4. Se determinaron quimioluminiscencia (QL), antioxidantes no enzimáticos plasmáticos e intracelulares, (TRAP)

y glutatión total (GSH) y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Cat). Resultados: QI disminuyó en HC ($1491 \pm 14 \times 10^2$ cpm/mg Hb) con respecto a C ($271 \pm 28 \times 10^2$ cpm/mg Hb) ($p < 0,05$), pero no hubo cambios significativos entre HSC y C. Hubo disminución de SOD en HC ($0,28 \pm 0,04$ U/mg prot) y HSC ($0,34 \pm 0,05$ U/mg prot) respecto a C ($0,73 \pm 0,05$ U/mg prot) ($p < 0,001$) y Cat en HC ($2,0 \pm 0,3$ pmol/mg prot) y en HSC ($2,3 \pm 0,2$ pmol/mg prot) respecto a C ($3,4 \pm 0,1$ pmol/mg prot) ($p < 0,001$). TRAP disminuyó en HC (255 ± 17 uM Trolox) y en HSC (241 ± 8 uM Trolox) respecto a C (315 ± 13 uM Trolox) ($p < 0,001$). GSH no cambió en HC y HSC ($1,9 \pm 0,2$ umol/mL eritrocitos). L-T4 disminuyó la QI en HC ($94 \pm 23 \times 10(2)$ cpm/mg Hb) con respecto al valor basal ($p < 0,001$). TRAP incrementó un 72% (415 ± 7 uM Trolox, $p < 0,001$) y 100% el GSH ($4,1 \pm 0,4$ umol/mL eritrocitos, $p < 0,001$) respecto al basal. SOD y Cat no variaron con L-T4. No se encontraron evidencias de daño oxidativo. El tratamiento con L-T4 produjo un aumento de la defensa antioxidante no enzimática en HSC. La disminución de la peroxidación de lípidos observada en HC, podría deberse a una actividad scavenger de L-T4.

ENDOCRINOLOGIA D

376. (11948) ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN GONADOTROPA MEDIANTE INMUNONEUTRALIZACIÓN DE LA TIMULINA SÉRICA EN EL PERÍODO NEONATAL. LUNA, GEORGINA(1,2); CAMIHORT, GISELA(1); FERESE, CELIA(2); BRACAMONTE, MARÍA(3); GOYA, RODOLFO(3); CÓNSOLE, GLORIA(1,2)

Cátedra "B" Histología-Embriología Facultad de Ciencias Médicas UNLP. Cátedra "B" de Citología, Histología-Embriología. Facultad de Ciencias Médicas UNLP(1), CICBA(2), INIBIOLP-CONICET(3)

Los sistemas inmune y neuroendocrino están estrechamente integrados, sugiriéndose la existencia de un eje timo-pituitario. La inmunoneutralización de la timulina sérica durante la vida temprana pretende explorar dicho eje. Se investigaron los cambios inmunohistoquímicos morfométricos en la población gonadotropa. Ratones hembras y machos C57BL/6 fueron inyectados con suero normal de conejo (SNC) o con antisero anti-timulina (AAT) ($12 \mu\text{l/g}$, vía i.p.) en los días 2,3,7,14,21 y 29 de vida postnatal. A los 33 días fueron sacrificados, obteniéndose las pituitarias que fueron procesadas para microscopía de luz y muestras séricas para la determinación de timulina mediante RIA, 10 días: pretratamiento 288 ± 81 ; post-tratamiento 24 ± 20 fg/ml y bioensayo de rosetas. Se inmunomarcó con un sistema anti-FSH-LH-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros morfológicos mediante videomicroscopía (Optimas): densidad de volumen (DV), densidad de células (DC) y tamaño celular (TC). Se halló aumento significativo ($p < 0,01$) de DV y TC en hembras y machos tratados (AAT) respecto a controles (SNC), sin cambios en la DC.

	hembras SNC		hembras AAT		machos SNC		machos AAT	
	FSH	LH	FSH	LH	FSH	LH	FSH	LH
FSH-LH DVX								
10^{-2} DC	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.5	$9.2 \pm 0.9^*$	$8.2 \pm 0.8^*$	5.5 ± 1	5.2 ± 1.7	$8.8 \pm 0.7^*$	$8.5 \pm 0.8^*$
10^{-4} TC	9.2 ± 1	8.6 ± 1.3	9.4 ± 0.8	9.3 ± 0.8	9.4 ± 1	9.6 ± 1.5	10.5 ± 0.6	10.2 ± 0.9
μm^2	46 ± 1.5	49 ± 1.9	$76.3 \pm 7^*$	$78.3 \pm 6^*$	65.3 ± 6	69.2 ± 7	$82.4 \pm 5^*$	$89 \pm 6^*$

Concluyendo, la población gonadotropa en machos y hembras, mostró hipertrofia compensadora, sin alteraciones significativas en la DC.

377. (12124) REGULACIÓN DE LAS ENZIMAS DE SÍNTESIS Y RECICLAJE DE GLUTATIÓN EN CÉLULAS DE SERTOLI.

GUALTIERI, ARIEL FÉLIX; MAZZONE, GRACIELA L.; SCHTEINGART, HELENA F.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE). Hospital de Niños "R. Gutiérrez". Buenos Aires.

El glutatión (GSH) participa en la protección celular contra el estrés oxidativo y en la detoxificación de xenobióticos. Se han detectado altos niveles de GSH y de enzimas del ciclo gamma-glutamilo en el testículo, principalmente en células de Sertoli (CS). En la regulación de los niveles de GSH participan la síntesis de novo, donde el paso limitante está catalizado por la enzima Glutamato Cisteina Ligasa (GCL), y el reciclado del glutatión oxidado a reducido, catalizado por la enzima Glutatión Reductasa (GR). La GCL es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica (GCLC) y otra regulatoria (GCLM). Previamente, hemos demostrado que los niveles de GSH están regulados diferencialmente por FSH y FGF básico (SAIC 2002/2003). El objetivo de este trabajo fue analizar si FSH y FGF modifican los niveles de proteína y ARNm de GR y GCL. CS provenientes de ratas de 20 días de edad fueron tratadas con FSH (100 ng/ml) y/o FGF (30 ng/ml) por 6, 12, 24 y 48h. Los niveles de proteínas y ARNm de GR y GCL fueron analizados por Western y Northern Blot. Los datos se expresan como % de basal, media \pm DS, $n=3$, * $p < 0.05$ vs. basal, # $p < 0.05$ vs. FGF. En los tratamientos por 24h, FGF y FSH+FGF incrementaron los niveles de proteína GR (FSH: 116 ± 16 ; FGF: $135 \pm 11^*$; FSH+FGF: $149 \pm 15^* \#$) y también su ARNm (FSH: 98 ± 12 ; FGF: $202 \pm 44^*$; FSH+FGF: $372 \pm 55^* \#$). En incubaciones por 6h, se observó un incremento transitorio por FSH en los niveles de GR (proteína y ARNm). Por otro lado, FSH y FGF estimularon la proteína GCLC en todos los tiempos estudiados, mientras que los ARNm se estimularon sólo por FSH (FSH: $186 \pm 38^*$; FGF: 96 ± 10 ; FSH+FGF: $121 \pm 26\%$, 24h de tratamiento). La proteína regulatoria GCLM se estimuló significativamente por FSH a las 6h (FSH: $193 \pm 42\%$) mientras que el estímulo por FGF se observó a tiempos mayores (FGF, 12h: 175 ± 43 ; 24h: 132 ± 10 ; 48h: $155 \pm 31\%$). Estos resultados sugieren que en células de Sertoli, enzimas que participan en la síntesis de novo y en el reciclado de GSH son reguladas por factores endocrinos y parácrinos.

378. (12149) BÚSQUEDA DE LA MUTACIÓN 809 EN EL GEN DEL SUSTRATO DEL RECEPTOR DE INSULINA - 1 EN RATAS DIABÉTICAS ESS. DANIELE, STELLA MARIS (1); LÓPEZ, ARIEL (2); MONTENEGRO, SILVANA (3,4); TARRÉS, MARÍA (3,4); FRETCHER, GUSTAVO (2); MARTÍNEZ, STELLA (3,4)

(1) Facultad de Ciencias Bioquímicas-UNR. (2) División Genética del Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires; (3) Facultad de Ciencias Médicas-UNR; (4) Consejo de Investigaciones-UNR

La resistencia a la insulina es una característica fisiopatológica implicada en el desarrollo de diabetes tipo 2. El gen del Sustrato del Receptor de Insulina - 1 (IRS-1) juega un rol clave en la transducción de señales de la insulina en el músculo esquelético. Diversos polimorfismos del gen IRS-1 han sido reportados en estados de insulinoresistencia tales como obesidad y diabetes tipo 2. eSS es una línea endocrizada de ratas no obesas; los machos manifiestan insulinoresistencia con hiperinsulinemia y desarrollan un síndrome diabético tipo 2 más severo que en las hembras. Durante su evolución aparecen las complicaciones más frecuentes de esta patología, tales como lesiones en el cristalino, dislipemia y nefropatía, con características semejantes a la diabetes humana. Nuestro propósito fue identificar la mutación 809 en el gen IRS-1 la cual implica una sustitución del aminoácido Ser809 por Phe en el codón 809; dicho sitio se halla conservado en la rata. Este polimorfismo ha sido encontrado en pacientes con diabetes tipo 2. El gen del IRS-1 consta de un solo exón. Se analizó un fragmento de 281pb del gen IRS-1, que posee 90% de homología con el mismo fragmento del IRS-1 en humanos. Se purificó ADN de leucocitos de un pool de sangre de ratas machos eSS y de machos controles Wistar. Se cuantificó y amplificó por

PCR a una temperatura de annealing de 50°C utilizando un par de primers empleados para amplificar ese mismo fragmento en el gen IRS-1 en humanos. Se usó sangre humana como control de amplificación. Se empleó el método de Sanger en la secuenciación del fragmento obtenido por PCR, previa extracción del mismo de un gel de agarosa al 2%. Como resultado de la lectura de la radiografía, no se encontró la mutación buscada. Se concluye que las ratas eSS no presentan la mutación 809, descartándola como el origen de su insulinoresistencia.

379. (12179) EFECTO MODULATORIO DE DES-GHRELINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN Y LA FUNCIÓN ADIPOCITARIA. GIOVAMBATTISTA, ANDRÉS; ALZAMENDI, ANA; CALANDRA, RICARDO; SPINEDI, EDUARDO

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE, La Plata

Des-octanoil-Ghrelina (Des-Ghr) es una isoforma des-acilada de Ghrelina que, aunque no ejerce acción biológica como secretagogo de hormona de crecimiento, representa casi la totalidad de Ghrelina circulante. Se ha indicado que Des-Ghr modula positivamente los procesos de proliferación y sobrevivencia celular (ej. células epiteliales y cardiomiocitos). El objetivo del presente trabajo fue evaluar, in vitro, posibles efectos de Des-Ghr sobre la adipogénesis y la producción adipocitaria de leptina (Lep). A partir de tejido adiposo retroperitoneal (RP), obtenido de ratas Sprague-Dawley macho adultas, se aislaron pre-adipocitos y cultivaron (2x10⁴ cel/pozo) hasta alcanzar confluencia (48 hs). A continuación se indujo diferenciación celular por el agregado de insulina-indometacina en el medio de cultivo, en presencia o ausencia de Des-Ghr (0,1-10 nM), durante 8 días. Con el fin de evaluar los efectos de Des-Ghr, se determinó Lep en el medio de cultivo, y el contenido de triglicéridos (TG) y la expresión de LPL y PPARgamma (RT-PCR) en las células. Los resultados indican que: 1) Des-Ghr (1 y 10 nM) estimula ($p < 0,05$ vs. Basal) la liberación de Lep en el día 8 de cultivo (Basal: 129 ± 9; Des-Ghr 1 nM: 235 ± 15 y Des-Ghr 10 nM: 183 ± 11 pg/ml); y 2) que Des-Ghr (1 y 10 nM) aumenta ($p < 0,05$ vs. Basal) el contenido celular de TG y la expresión de ARNs de LPL y PPARgamma. Finalmente, resultados con adipocitos maduros (RP) en cultivo (12 hs) indican que Des-Ghr (0,1-100 nM) incrementa ($p < 0,05$ vs. Basal) la secreción de Lep. Estos resultados demuestran que Des-Ghr estimula el proceso adipogénico y la producción adipocitaria de Lep. Por otro lado, se sugiere un nuevo rol modulador de Des-Ghr, independiente de Ghrelina-R1a, en el desarrollo de la adiposidad y el control del apetito.

380. (12322) REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGENESIS ADRENAL EN UN MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL. REPETTO, ESTEBAN MARTÍN; MARTINEZ CALEJMAN, CAMILA; ASTORT, FRANCISCO; PIROLI, GERARDO; CYMERYNG, CORA

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Actualmente se considera al NO y al CO como moduladores autócrinos y/o parácrinos de la fisiología adrenal. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de ambos sistemas de mediadores en la regulación de la esteroideogénesis adrenal en ratas diabéticas (tipo 1). Se trataron ratas macho con estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg i.p. en tres días sucesivos), empleándose sólo aquellas que presentaron glucemia en ayunas > 300 mg%. Los resultados indican que la corticosteronemia basal (10 AM) fue mayor en los animales diabéticos (STZ) que en los controles (C) (C: 24,9 ± 3,4 vs STZ: 50,4 ± 5,6 ng/ml, $P < 0,05$). Luego de 1 h del tratamiento con ACTH (7.5 UI/kg, i.p.) la corticosterona sérica fue mayor en C (C: 281,1 ± 15,3 vs STZ: 59,1 ± 2,6 ng/ml, $P < 0,05$). El tratamiento con L-NAME (inhibidor de la NOS) en forma previa a la estimulación con ACTH disminuyó significativamente la corticosteronemia en C (ACTH: 281,1 ± 15,3 vs ACTH + L-NAME: 22,2 ± 1,5 ng/ml; $P < 0,001$) mientras que la

incrementó en STZ (STZ + ACTH: 59,1 ± 2,6 vs STZ + ACTH + L-NAME: 226,2 ± 5,6 ng/ml, $P < 0,001$). El inhibidor de HO (SnPPiX) no tuvo efecto sobre la corticosteronemia. Tanto la producción basal como la estimulada por dosis máximas de ACTH fue mayor en células adrenales obtenidas de animales diabéticos (C: 259,7 ± 10,3; STZ: 651,1 ± 35,5; $P < 0,001$ vs C; ACTH: 1835,6 ± 82,3; STZ + ACTH: 2601,0 ± 229,8; $P < 0,001$ vs ACTH). En conclusión, si bien los animales diabéticos presentan mayores valores de corticosteronemia basal su respuesta a la estimulación con ACTH exógena está disminuida. La disminución de la corticosteronemia debida al L-NAME, en los animales controles, posiblemente se deba al predominio de los efectos vasculares del NO, mientras que en los diabéticos podría predominar el efecto inhibitorio del NO sobre la esteroidogénesis adrenal. En forma adicional, los experimentos "in vitro" indican un efecto de la diabetes a nivel de las células productoras de esteroides.

381. (12324) EL ESTRADIOL DISMINUYE LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE LAS SUBUNIDADES DEL RECEPTOR GABAB EN HIPÓFISIS E HIPOTÁLAMOS DE RATAS. REY-ROLDÁN, ESTELA B.; BIANCHI, M.S.; BECÚ-VILLALOBOS, D.; LUX-LANTOS, V.; LIBERTUN, C.

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET

Demostramos previamente por Western blot que el estradiol (E2) disminuye la expresión de las subunidades GABAB1a/b y GABAB2 del receptor GABAB (RGABAB) en hipotálamo (HT) de ratas hembras adultas respecto de los niveles de proestro. Sin embargo, en adenohipófisis (AH) no se observaron diferencias en la expresión proteica de estas subunidades entre proestro y las estrogenizadas. Aquí evaluamos por RT-PCR semicuantitativa el efecto crónico "in vivo" del E2 sobre la expresión del RNAm de las subunidades RGABAB1 y RGABAB2 en AH e HT de ratas. Se obtuvo RNAm total de AH e HT de ratas hembras adultas: a) tratadas durante 1 semana con valerato de E2 (1 dosis, 100 mg/kg: E1), b) implantadas con un pellet de benzoato de E2 (10 mg) durante 5 semanas (E5), c) castradas (OVX) y d) en proestro (P). En células adenohipofisarias de ratas E5 o en P se evaluó el efecto del baclofen, agonista GABAB, sobre los niveles del Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i). En AH de E5 la expresión del RNAm de RGABAB1 y RGABAB2 disminuyó significativamente (RNAm RGABAB1/RNAm β-actina (UA) P: 128.7 ± 7.8, n=6; E5: 86.2 ± 3.3, n=5, $p < 0.01$; RNAm RGABAB2/RNAm β-actina (UA) P: 80.6 ± 4.5, n=5; E5: 53.5 ± 5.8 n=6, $p < 0.03$). También en HT de E5 disminuyó la expresión del RNAm de RGABAB1 (P: 83.2 ± 6.4, n=5; E5: 55.76 ± 2.3, n=5, $p < 0.01$), mientras que ya una semana de E2 fue suficiente para disminuir 30% la expresión de RNAm de RGABAB2 (P: 172.3 ± 4.3, n=4; E1: 120.3 ± 8.4, n=3; E5: 131.8 ± 9.0, n=5, $p < 0.01$). La OVX no modificó la expresión del RNAm del RGABAB con respecto al P en ninguno de los tejidos estudiados. En células hipofisarias de P el baclofen disminuye [Ca²⁺]_i, mientras que carece de efecto en las E5. Estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con E2 regula negativamente la expresión de las subunidades del RGABAB en hipófisis e hipotálamo. La disminución de la expresión de los RGABAB hipofisarios correlaciona con una falta de efecto del baclofen sobre el [Ca²⁺]_i (CONICET, UBA, ANPCYT).

382. (12438) DIFERENCIAS SEXUALES EN EL EFECTO DEL OMC (OCTYL-METHOXY-CINNAMATE) SOBRE LA LIBERACIÓN DE AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES HIPOTALÁMICOS DURANTE EL DESARROLLO PUBERAL DE RATAS. SZWARCFARB, BERTA; CARBONE, SILVIA; REYNOSO, ROXANA; BOLLERO, GABRIELA; PONZO, OSVALDO; MOGUILVSKY, JAIME; SCACCHI, PABLO

Instituto de Fisiología - Fac. Medicina - UBA - CONICET

La exposición al disruptor endocrino OMC (octyl-methoxy-cinnamate) sustancia con propiedades anti U.V., puede alterar el neurodesarrollo y producir efectos adversos sobre el eje repro-

ductor. El riesgo se incrementa en la etapa prenatal y en períodos tempranos del desarrollo sexual. En el presente trabajo se estudió el efecto "in vitro" del OMC sobre la liberación de aminoácidos neurotransmisores en diferentes estadios de la maduración sexual. Se incubaron, en medio de Earle's, fragmentos de hipotálamo anterior y medio basal (n= 10) de ratas macho y hembra pre y peripúberales (15 y 30 días de edad, respectivamente). Luego de un período de estabilización y descarte se adicionó solución salina en los controles y OMC 10(-7) a los grupos en estudio, prosiguiendo la incubación hasta los 60 min. Se determinó la liberación (pm/100 ul de medio) de aspartato (ASP), glutamato (GLU) y GABA en el líquido de incubación, mediante la técnica de HPLC. El OMC aumentó significativamente ($p < 0.001$) la liberación del aminoácido inhibitorio GABA en ratas macho de 15 días (3410 ± 486 vs 8340 ± 530) y de 30 días de edad (5092 ± 268 vs 7263 ± 446) no observándose modificaciones en la liberación de aminoácidos excitatorios ASP y GLU. En ratas hembra, el OMC produjo un efecto inhibitorio de la liberación de GLU, en prepúberes (1215 ± 109 vs 652 ± 112) y peripúberes (3648 ± 614 vs 954 ± 42), no modificando la liberación de ASP y GABA. Se concluye que existen diferencias sexuales en el efecto del OMC durante el desarrollo puberal. Este disruptor podría afectar el eje hipotálamo-hipofísico-gonadal a través de un aumento del tono inhibitorio gabaérgico en machos y de la disminución del tono estimulante de GLU en hembras.

383. (12456) EXTRACCIÓN, RETROTRANSCRIPCIÓN Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DE TRANSCRIPTOS DE ARN OBTENIDOS DE BLOQUES DE PARAFINA DE TESTÍCULOS DE RATÓN FIJADOS EN FORMOL O EN LÍQUIDO DE BOUIN. QUINTANA, SILVINA; VENARA, MARCELA; REY, RODOLFO; CHEMES, HÉCTOR

Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños R. Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina

Tradicionalmente se ha considerado que el ARN contenido en tejidos fijados e incluidos en parafina está tan degradado que es imposible su utilización en estudios moleculares. Investigaciones recientes que informan resultados exitosos han cuestionado este concepto. Nuestro objetivo inmediato fue establecer si es factible realizar ensayos de expresión génica en estos tejidos para aplicarlos posteriormente al análisis de testículos de ratones transgénicos portadores de una construcción con la región promotora de la Hormona Antimülleriana y el oncogen Simian Virus 40. Estos animales desarrollan tumores testiculares del estroma gonadal. Para el presente estudio utilizamos cortes histológicos de 12 a 15 μ m de espesor de bloques de parafina de archivo de tejidos fijados en formol o en líquido de Bouin. Luego de la desparafinización e hidratación los cortes se incubaron con Proteinasa K a 60°C, y el RNA se extrajo con fenol cloroformo (pH4) y se precipitó con isopropanol. El material obtenido fue digerido con DNasa y precipitado. Se retrotranscribió con hexámeros "random" y se amplificó por PCR con primers de beta actina. Se pudo extraer ARN a partir de tejido procesado con diferentes fijadores y embebido en parafina, el que consistió en fragmentos de bajo peso molecular, no observándose las bandas del ARN ribosomal en una electroforesis en gel de agarosa. Con el cDNA retrotranscrito, consistente en fragmentos menores a 500 pares de bases, se amplificó por PCR un producto de 280 pares de bases del Exón 3 de la beta actina. Estos estudios demuestran que el ARN extraído de estas muestras se puede retrotranscribir y amplificar por PCR, lo cual convierte a los bloques de parafina de archivo en una invaluable fuente para estudios moleculares retrospectivos en patologías experimentales o clínicas.

384. (12535) EFECTO DEL MN SOBRE MEDIADORES IMPLICADOS EN LA LIBERACIÓN DE LHRH. PRESTIFILIPPO, JP(1); FERNÁNDEZ-SOLARI, J(1); MOHN, CE(1); BOLLERO, G(2); REYNOSO, R(2); RETTORI, V(1)

(1) Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET (PICT 03-14264), Facultad de Medicina, UBA.

(2) Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

Se sabe que la secreción de gonadotrofinas está bajo control hipotalámico de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH). Trabajos previos demostraron que el manganeso (Mn) incrementa la liberación de LHRH, mediada por la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) y producción de GMPC, sin embargo se desconoce cual es el efecto del Mn sobre los otros mediadores implicados en la liberación de LHRH. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del Mn in vitro sobre las prostaglandinas (PGs) y diferentes neurotransmisores. Hipotálamos medios basales (HMB) de ratas Sprague Dawley macho (250g) fueron incubados en Krebs Ringer bicarbonato en presencia o ausencia de Mn(+2). Se determinó por HPLC: ácido glutámico, ácido aspártico y GABA; PGE2 por RIA y la actividad de la ciclooxigenasa (COX) por radioconversión del sustrato marcado. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM, analizados por test-t Student, $p < 0.05$. El Mn (500 μ M) aumentó la liberación de GABA (3398 ± 149 pmol/HMB a 4716 ± 190 $p < 0.001$), disminuyó ácido aspártico (1647 ± 150 pmol/HMB a 1141 ± 126 $p < 0.05$) y ácido glutámico (868 ± 29 pmol/HMB a 743 ± 36 $p < 0.05$). Mn también disminuyó el contenido de PGE2 (64.8 ± 5.2 pg/HMB a 40.7 ± 4.2 $p < 0.01$) sin modificar la liberación de PGE2 (368.3 ± 21.7 pg/HMB vs 330.2 ± 22.1). Por otra parte Mn inhibió la actividad de la COX con la consecuente disminución de sus productos expresados como el porcentaje transformado de ácido araquidónico-(14 C) (%cpm/HMB), 6-ceto-PGF1 α (1.31 ± 0.11 a 0.87 ± 0.05 $p < 0.01$), PGE2 (1.13 ± 0.02 a 0.90 ± 0.02 $p < 0.001$), TXB2 (0.55 ± 0.01 a 0.44 ± 0.02 $p < 0.001$), sin modificar PGF2 α (0.62 ± 0.02 vs 0.52 ± 0.04). Mn tampoco modificó el contenido de AMPc (3.07 ± 0.38 pmol/HMB vs 2.99 ± 0.48). Estos resultados indican que la liberación de LHRH mediada por Mn utiliza la vía de NO-GMPC inhibiendo la vía de activación mediada por PGs. Dicha liberación de LHRH generaría una retroalimentación negativa a través de la inhibición de ácido glutámico y ácido aspártico e incremento de GABA.

385. (12619) MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES HIPOGONÁDICOS BAJO ANDROGENOTERAPIA. REPETTO, MARISA; ASZPIS, SERGIO (2); MORMANDI, EDUARDO (2); SANDONATO, NATALIA (1); CARLE, GERMÁN (1); GARCÍA, LAURA (2); LLESUY, SUSANA (1); LEVALLE, OSCAR (2)

(1) Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. (2) División de Endocrinología. Hospital Durand.

El estrés oxidativo es una situación que resulta del desbalance entre la generación de especies reactivas del oxígeno y los niveles de defensa antioxidante. El objetivo de este trabajo fue evaluar la defensa antioxidante de pacientes con hipogonadismo y su respuesta al tratamiento con testosterona y raloxifeno. Material y métodos: Estudiamos 22 pacientes varones hipogonadales en condiciones basales (H), T <3ng/mL, entre 18 a 43 años, sin tratamiento sustitutivo por lo menos 6 meses previos al ingreso. Control (C): 20 varones sanos (20 a 40 años). 8 pacientes fueron reevaluados después de recibir 250 mg de enantato de testosterona (T) i.m. cada 21 días durante 4 meses. Entre 7 y 10 días de la última aplicación se repitieron las determinaciones. Un grupo de 7 pacientes recibieron el mismo esquema de testosterona más 60 mg diarios de raloxifeno (T+R). Se determinó: capacidad antioxidante total (TRAP) y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Cat). Resultados: En H se observó una disminución del TRAP en 35 % con respecto a C (305 ± 64 uM Trolox, $p < 0.001$), disminución de SOD en 57% en H con respecto a C ($0,7 \pm 0,2$ U/mg prot) ($p < 0,001$) y de Cat en un 56% respecto a C ($3,4 \pm 0,8$ pmol/mg prot) ($p < 0,001$). En T, el TRAP no cambió y la actividad de SOD aumentó un 43% con respecto a H ($p < 0,03$). En T: TRAP: 167 ± 60 uM Trolox, SOD: $0,4 \pm 0,2$ U/mg prot, y Cat: $1,6 \pm 0,9$ pmol/mg prot. En T+R se observó un incremento del 66% del TRAP y

del 83 % de SOD con respecto a H ($p < 0,001$ y $p < 0,05$). Cat no cambió con los tratamientos respecto al basal ($1,7 \pm 0,9$ pmol/mg prot). Conclusiones: Esta patología está asociada a estrés oxidativo. La testosterona incrementa la actividad de la enzima antioxidante SOD pero no mejora el TRAP de pacientes hipogonádicos. El tratamiento conjunto con raloxifeno normalizó el TRAP y SOD, indicando un aumento de la defensa antioxidante no enzimática y enzimática.

386. (12767) MUERTE CELULAR INDUCIDA POR BROMOCRIPTINA EN PROLACTINOMAS EXPERIMENTALES: EXPRESION DE P38 MAPK. PALMERI, CLAUDIA; MUKDSI, JORGE; PETITI, JUAN; DE PAUL, ANA; AOKI, AGUSTÍN; TORRES, ALICIA

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. UNC

La Bromocriptina (BC) es utilizada como fármaco de primera línea en el tratamiento de prolactinomas, generando la regresión del tumor. Objetivo: Estudiar los tipos de muerte celular y el grado de participación de p38 en la involución del prolactinoma inducida por BC. Materiales y Métodos: Ratas Wistar macho fueron separadas en los siguientes grupos: E+B) Estrogenizadas con Benzoato de estradiol ($2\mu\text{g}/100\text{g}/\text{día}$) durante 20 días y luego tratadas 5 días con BC ($0,3\text{mg}/100\text{g}/\text{día}$). E) Estrogenizadas e inyectadas con vehículo. C) Control. Se realizó inmunocitoquímica a nivel de microscopía fotónica para estudiar los cambios en la población de células lactotropas y la detección de p38. La caracterización ultraestructural de los distintos tipos de muerte se realizó por microscopía electrónica. La presencia de apoptosis fue confirmada por el método de TUNEL. La expresión de p38 fosforilado (P-p38) fue analizada por Western Blot en lisados de homogenatos hipofisarios de los grupos descriptos. Los resultados fueron tratados por ANOVA-Tukey. Resultados: La estimulación estrogénica indujo un cuadro proliferativo de células lactotropas, que fue revertido por BC. El grupo E+B presentó células en diferentes estadios involutivos, algunas compatibles con apoptosis, hallazgo confirmado por TUNEL y otras con características de un proceso necrótico-autofágico. La inmunomarcación para p38 en el grupo E fue más intensa a nivel citoplasmático y en el grupo E+B fue prevalente en el núcleo de las células adenohipofisarias. La expresión de P-p38 en el grupo E+B mostró un marcado aumento con respecto al grupo E ($p < 0,05$) y al C ($p < 0,01$) La acción antitumoral de BC generó diferentes tipos de muerte celular programada en células adenohipofisarias entre los que se describen figuras apoptóticas y otros procesos que incluyen autofagia y necrosis. Los resultados obtenidos sobre la expresión de P-p38 y su probable translocación nuclear indicarían que esta quinasa media los procesos de muerte inducidos por BC.

387. (12775) HAPLOTIPOS DEL $\beta 2$ AR, UN BUEN MARCADOR GENÉTICO EN OBESIDAD?. CERRONE, GE; PÉREZ, MS; CAPUTO, M; TARGOVNIK, HM; FRECHTEL, GD

Cátedra de Genética y Biología Molecular

El desencadenante de las complicaciones en obesidad es la liberación de ácidos grasos (AG) al torrente sanguíneo. La actividad lipolítica en células grasas es regulada por catecolaminas que actúan a través de receptores adrenérgicos, entre ellos el receptor $\beta 2$ adrenérgico ($\beta 2$ - AR) que se expresa en células del tejido graso estimulando la lipólisis. Se han descrito varios polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en el gen $\beta 2$ - AR, existiendo una relación controvertida entre la presencia de los mismos y el desarrollo de obesidad. Objetivo: Considerando la posibilidad de asociación de los SNPs en 3 haplotipos mayoritarios I, II y III, se analizó la relación existente entre los 3 haplotipos y el desarrollo de la obesidad. Mediante una técnica de SSCP, estudiamos una población de 65 individuos normales, 51 con sobrepeso y 113 con obesidad central. A través de la técnica PCR se amplificó un fragmento que comprende el péptido señal y región codificante del gen $\beta 2$ - AR con primers específicos. Se identificaron los

haplotipos mediante la técnica de SSCP en gel de poliacrilamida al 8% con glicerol. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Instat. Resultados: se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto en la herencia alélica como genotípica para el haplotipo I.

	Obesos (%)	Sobrepesos (%)	Normales (%)	p Ob/N
I	58 (26)	34 (33)	54 (41)	0.0029
II	99 (44)	37 (36)	44 (34)	0.0728
III	69 (30)	31 (31)	32 (25)	NS

Conclusiones: una menor frecuencia del haplotipo I en obesos estaría asociado al desarrollo de la enfermedad. Este haplotipo aumenta la estimulación de lipólisis en células del tejido graso con el consecuente aumento de AG libres en circulación. El $\beta 2$ AR se constituye entonces en un buen marcador genético en obesidad.

388. (12785) EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS A (IRA) Y B (IRB) DEL RECEPTOR DE INSULINA (IR) EN TEJIDO ADRENAL HUMANO (TAH) PREPUBER Y PUBER EN FUNCION DE LA EDAD. BAQUEDANO, MA. SONIA; SARACO, N; BERENSZTEIN, E; GOÑI, J; RIVAROLA, MA; BELGOROSKY, A

Laboratorio de Investigación. Hospital de Pediatría Garrahan

La adrenerca (A) humana ocurre entre los 6 y 8 años y se asocia al desarrollo de la zona reticularis (ZR). Los factores involucrados no se conocen, se postula que la disminución de la expresión de 3β -HSD en la ZR contribuye al aumento de andrógenos adrenales en la A. Hemos propuesto que en la vida postnatal las células adrenales (CA) progenitoras se localizan en la periferia de la corteza y que los IGFs participarían en la proliferación y migración de las mismas. Hay evidencias de que la insulina (I) aumenta la expresión de 3β -HSD de CA humanas en cultivo. Existen 2 isoformas de IR por splicing alternativo del exón 11. Su expresión esta regulada por factores tejido-específicos, el estado de desarrollo y la diferenciación celular. IRA posee alta afinidad por I e IGF-2 mientras que IRB posee menor afinidad por I y no une IGF-2. Con el objetivo de evaluar el rol de la I en el desarrollo adrenal humano se estudió la distribución del IR en 28 TAH en función de la edad. Según se estableció previamente (Baquedano et al Ped Res 58:1-9, 2005) las muestras se dividieron en 3 grupos (Gr) etarios. Por RT-PCR semicuantitativa se observó que IRA y IRB se expresan en la adrenal humana. El ARNm de IRA y IRB fue significativamente más alto en el Gr1 (<3 meses) que en el Gr2 (3 meses a 6 años) y Gr3 (>6 años) ($p < 0,05$), mientras que la relación IRA/IRB fue significativamente mayor en el Gr2 comparado con el Gr1 y Gr3 ($p < 0,05$). Por inmunohistoquímica se observó expresión de IR en la corteza adrenal en los 3 Gr, si bien la señal más intensa se localizó en la zona glomerulosa en lo 3 Gr. Finalmente se concluye: 1) la I, al igual que los IGFs podría estar involucrada en la proliferación y migración de CA progenitoras participando en el proceso de zonación postnatal, y 2) la mayor relación IRA/IRB en el Gr2 con respecto al Gr3 podría estar vinculada a la regulación diferencial de la esteroidogénesis adrenal en las distintas etapas de la vida postnatal.

389. (12786) ANÁLISIS DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN PPAR-GAMMA EN PACIENTES CON SOBREPESO Y OBESIDAD. PÉREZ, MS; CERRONE, GE; LOPEZ, AP; TARGOVNIK, HM; FRECHTEL, GD

Cátedra de Genética y Biología Molecular

La obesidad se considera una enfermedad multifactorial, causada por la interacción de factores genéticos de predisposición y ambientales desencadenantes. La adipogénesis y el metabolismo energético están bajo la regulación de varios genes, entre ellos

el receptor activado del receptor de peroxisomas tipo gamma. Es un receptor nuclear que tiene varios ligandos sintéticos y naturales, que actúa como un factor de transcripción y estimula la expresión de genes que aumentan la sensibilidad periférica a la insulina. Entre los diferentes SNPs en este gen, se analizó el cambio CCG / GCG (Pro12Ala). La presencia de Pro ha sido asociada a obesidad central y síndrome de insulino-resistencia. La detección de este SNP se realizó en una población de 108 individuos obesos, 49 con sobrepeso y 70 normales. La técnica utilizada fue PCR-RFLP con la enzima HpaI. El fragmento amplificado por PCR de 236 pb, se digiere en fragmentos de 216 y 20 pb que corresponde a la presencia del codon CCG. La estadística se realizó por el test de Fischer. Resultados: La frecuencia genotípica Ala/Ala entre la población normal y los pacientes obesos presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.023$).

	Obesos n (%)	Sobrepeso n (%)	Normales n (%)
Ala / Ala	8 (7.4)	1 (2.0)	0
Ala / Pro	24 (22.2)	10 (20.4)	16 (22.8)
Pro / Pro	76 (70.3)	38 (77.5)	54 (77.1)

Conclusiones: La presencia de la forma homocigota Ala/Ala en obesos está determinando una mayor predisposición a la sensibilidad periférica a insulina en esta población. Postulamos que los pacientes obesos presentan resistencia a la insulina por otra causa genética y que la presencia del alelo Ala favorece el desarrollo de obesidad central por aumentar la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina, fundamentalmente por su acción lipogénica.

390. (12799) PREGNENOLONA ESTIMULA LA LIBERACION DE LH EN MACHOS CASTRADOS: EFECTO DEPENDIENTE DE LA ACCION DE ESTRÓGENOS. CELEDON, VERONICA; FARRÉ, EUGENIA; CABRERA, RICARDO

(LINCE-IMBECU-CONICET. FCM. Universidad Nacional de Cuyo)

Pregnenolona (Preg) es un neuroesteroide de la vía neuroesteroidogénica astrocitaria sintetizado a partir de colesterol el cual actúa modulando receptores ionotrópicos como NMDA y GABAA. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la acción de Preg 6uM administrada intracerebro ventricular (icv) en machos castrados y estrogenizados. Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley, divididas en dos grupos 1) control: machos adultos orquidectomizados impregnados con estrógeno (ORX+LCR+E) (n=6) a los que se les administró líquido cefalorraquídeo artificial i.c.v (LCR), 2) experimental: machos adultos orquidectomizados impregnados con estrógeno a los que se les administró Preg 6uM i.c.v (ORX + E+ Preg) (n=10). La administración de Preg y LCR se realizó mediante cánulas de acero inoxidable implantadas estereotáxicamente en ventrículo lateral. 48 hs previas al experimento se administró una inyección subcutánea de estrógeno 25 ug/rata. En el día del experimento se implantó un catéter en la vena yugular para la extracción seriada de sangre. Se tomaron 8 muestras de sangre durante una hora. Los resultados se expresaron como la media + SEM en ng/ml de LH liberada y analizados estadísticamente por ANOVA 1 y post Hoc test. Preg facilitó la liberación de LH comparado con el grupo LCR a los 10, 20 y 30 minutos posteriores a la administración (10': 2.19 ± 0.2 vs 1.27 ± 0.07 $P<0.003$; 20': 2.02 ± 0.21 vs 0.8 ± 0.21 $P<0.0007$; 30': 2.19 ± 0.23 vs 0.9 ± 0.13 $P<0.001$). Concluimos que la administración de Preg, en ratas macho castradas impregnadas con estrógeno potencia la descarga de LH. Este novedoso mecanismo de acción central de este neuroesteroide proyecta a los mismos como importantes moléculas neuroactivas asociadas a la función reproductiva en la rata macho.

391. (12811) NIVELES DE 6-SULFATOXIMELATONINA URINARIA EN NIÑOS Y NIÑAS OBESAS EN EDAD PUBERAL. FIDELEFF, HUGO (1); PEREZ LLORET, SANTIAGO (2);

BOQUETE, HUGO (1); FIDELEFF, GABRIEL (1); ALBORNOZ, LILIANA (2); SUAREZ, MARTHA (1); ESQUIFINO, ANA (2); HONFI, MARGARITA (1); CARDINALI, DANIEL (2)

(1) Dto. de Endocrinología, Hospital T. Alvarez, Bs. As. (2) Dto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Antecedentes: la secreción de melatonina disminuye con la edad e influye en la regulación de la masa adiposa corporal. Asimismo podría relacionarse con el inicio de la pubertad. Objetivos: estudiar la concentración urinaria de 6-sulfatoximelatonina (6-SM) en niños y niñas obesos o con peso normal en distintos momentos del desarrollo puberal. Métodos: Se estudiaron 50 niños y niñas obesos y 44 con peso normal, entre 4 y 16 años (48 niños). Se los clasificó en niños (4-8 años), pre-púberes (8 a 12) y púberes (estadios Tanner II-IV). Obesidad se definió como índice de masa corporal (IMC) > percentilo 75 y peso normal como IMC entre los percentilos 25 y 75 de normalidad. Se recolectó orina durante los periodos entre 20:00 y 08:00 (nocturno) y entre 08:00 y 20:00 (diurno). Se midió 6-SM mediante RIA en cada muestra. Los resultados se expresan como 6-SM diurna, nocturna, total y como la diferencia entre nocturna y diurna (amplitud del ritmo circadiano) y fueron analizados mediante ANOVA previa transformación logarítmica de los datos. Resultados: La excreción nocturna de 6-SM y la amplitud del ritmo fueron significativamente mayores en los obesos vs normales (nocturna: 13.9 ± 1.0 vs 10.5 ± 1.0 ; amplitud: 11.6 ± 1.0 vs 9.2 ± 0.8 , ambas $p<0.05$), especialmente en púberes (nocturna: 14.9 ± 2.0 vs 9.3 ± 2.0 ; amplitud: 12.6 ± 1.8 vs 8.1 ± 1.2 , ambas $p<0.05$). Análisis individualmente, sólo se identificaron diferentes en la secreción de 6-SM cuando se compararon los niños púberes obesos vs normales. Por otro lado, 6-SM total, diurna y nocturna fue significativamente más alta en mujeres comparada con los varones (total: 20.3 ± 1.7 vs 7.7 ± 1.6 ; diurna: 2.7 ± 0.5 vs 0.9 ± 0.4 ; nocturna: 17.6 ± 1.6 vs 6.9 ± 1.4 , todas $p<0.05$). El incremento en la secreción de melatonina en niños obesos púberes podría ser uno de los mecanismos causantes de retraso en la pubertad que se observa frecuentemente en ellos.

NEFROLOGIA

392. (11855) EXPRESIÓN DE NA(+)/K(+)-ATPASA Y SU INTERACCIÓN CON LA PROTEÍNA DE GOLPE DE CALOR HSP70 EN DESNUTRICIÓN PROTEICA. RUETE, MC; CARRIZO, L; RODRIGUEZ PEÑA, M; MANUCHA, W; VALLES, P

IMBECU - Fac. Cs. Médicas

La desnutrición por bajo aporte de proteínas produce cambios significativos en la función renal, resultando en alteraciones de la hemodinamia renal, en la capacidad de concentración urinaria y en la excreción de hidrogeniones y electrolitos. Objetivos: a) examinar los niveles de expresión de los transportadores de sodio y su relación con el transporte tubular de K(+), b) evaluar la expresión de HSP70 y su probable rol citoprotector mediante su interacción con la Na(+)/K(+)-ATPasa. Ratas wistar hembras recién destetadas fueron sometidas a una dieta hipoproteica (8%) y su respectivo control normoproteico (24%) por 14 días. La expresión de los transportadores (NHE3, Na(+)/K(+)-ATPasa, ENaC) se evaluó por inmunohistoquímica y Western Blot en corteza (C), médula (M), porción externa de la médula externa (OSOM). Se realizó inmunoprecipitación para estudiar la interacción de HSP70 y Na(+)/K(+)-ATPasa. Resultados: Los valores séricos de Na(+) no mostraron diferencias significativas en ratas desnutridas (D) vs. control (C), con descenso en los niveles de K(+) en D vs. C (3.57 ± 0.1 vs 5.1 ± 0.2 , $p<0.05$); y aumento de la diuresis en D vs. C (19.23 ± 1.0 vs 16.47 ± 0.27 , $p<0.05$). Se observó un descenso en la expresión de NHE3 en MD vs. MC (0.84 ± 0.05 vs 1 ± 0.02 , $p<0.05$, n=8) y un aumento en la expresión de la Na(+)/K(+)-ATPasa en MD vs MC (1.3 ± 0.09 vs 1 ± 0.03 , $p<0.05$); CD vs. CC

(1.12 ± 0.02 vs 1 ± 0.03 , $p < 0.05$, $n=8$), con incremento de la inmunomarcación en la membrana basolateral en OSOM. Las subunidades de ENaC no mostraron diferencias significativas en OSOM. El ensayo de inmunoprecipitación con la Na(+)/K(+)-ATPasa se realizó en OSOM y posterior western blot contra la HSP70 mostrando interacción entre estas dos proteínas. El descenso en la expresión de NHE3 y el aumento en la expresión de Na(+)/K(+)-ATPasa participarían en el transporte distal de K(+). Frente al estrés iónico, la interacción entre la HSP70 y la Na(+)/K(+)-ATPasa podría sugerir un rol citoprotector de esta chaperona molecular en desnutrición.

393. (11877) ALTERACIONES EN EL MANEJO RENAL DE AGUA EN RATAS CON COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA DE 21 H. BRANDONI, ANABEL; VILLAR, SILVINA R.; TORRES, ADRIANA M.

Area Farmacología. Dpto de Cs. Fisiológicas. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. CONICET.

En ratas con colestasis extrahepática de 21 h de duración hemos demostrado un aumento en la excreción renal de agua además de modificaciones en parámetros hemodinámicos renales. El objetivo de este trabajo fue evaluar algunos factores que puedan influenciar en el manejo renal de agua en este modelo experimental. Se trabajó con ratas Wistar macho adultas, un grupo control, S ($n=5$) y un grupo con ligadura del conducto biliar de 21 h, L ($n=7$). El grado de concentración de la orina depende de la permeabilidad al agua del túbulo colector y de factores como la correcta formación del gradiente corticomedular, entre otros. En este trabajo se evaluó el flujo urinario (F.U., $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g p.c.}$) mediante técnicas convencionales de clearance y se determinó la relación osmolaridad urinaria/plasmática (U/P). En homogenizados de corteza (c) y médula (m) renal, se evaluó el flujo plasmático renal (FPR, $\text{mL}/\text{min}/100\text{g p.c.}$) utilizando microesferas fluorescentes, se determinó la actividad de la enzima Na,K-ATPasa por técnica espectrofotométrica y se estudiaron las abundancias de aquaporina 2 (AQP2, %) y del cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2, %) mediante técnica de Western Blot. Se obtuvieron los siguientes resultados: F.U.: $S=4.76 \pm 0.53$, $L=9.02 \pm 0.96^*$; U/P: $S=5.16 \pm 0.65$, $L=2.85 \pm 0.33^*$; FPRc: $S=3.81 \pm 0.32$, $L=2.02 \pm 0.30^*$; FPRm: $S=0.30 \pm 0.07$, $L=0.89 \pm 0.13^*$; AQP2c: $S=100 \pm 5$, $L=69 \pm 4^*$; AQP2m: $S=100 \pm 3$, $L=129 \pm 5^*$; NKCC2c: $S=100 \pm 6$, $L=142 \pm 12^*$; NKCC2m: $S=100 \pm 4$, $L=82 \pm 3^*$ ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas en la actividad de Na,K-ATPasa en corteza y en médula. El aumento observado en el FPRm disiparía el gradiente osmótico corticomedular en ratas con colestasis extrahepática, explicando en parte el aumento descrito en la excreción renal de agua. Este aumento podría estar a su vez asociado a alteraciones en el asa de Henle, en el túbulo colector o en ambos. La disminución observada en las abundancias de AQP2 en corteza y de NKCC2 en médula también explicarían la alteración descrita en la reabsorción de agua en este modelo.

394. (12126) ESTUDIO DEL EFECTO DEL FLUORURO (F) SOBRE EL MANEJO RENAL DE FOSFATO (P). DI LORETO, VERÓNICA; INCHAUSPE, GABRIEL; DE CANDIA, LUCAS; MORENO, HILDA; PUCHE, RODOLFO; RIGALLI, ALFREDO

Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Cs. Médicas, UNR

Hemos demostrado que la administración de una dosis de F en la rata produce aumento de la fosfatemia sin participación de la parathormona ni pérdida de P de tejidos blandos. El tratamiento crónico con F durante 30 días produce disminución significativa del P óseo. Es motivo de estudio si la hiperfosfatemia se debe a una pérdida de P óseo o a una falla en el manejo renal del P. El F no afecta la hemodinamia renal. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto directo del F sobre el manejo renal de P utilizando el modelo de perfusión de riñón aislado de rata. Se utiliza-

ron ratas macho de la línea IIM/FcM sublínea "m" ($n = 6$). Se recolectaron muestras de orina y buffer de perfusión durante 20 minutos en períodos de 5 min. Luego se ajustó la concentración de F a 50 mM en el buffer y se recolectaron muestras durante 40 minutos más. Se determinó el porcentaje de reabsorción tubular de fosfato (%RTP) y se evaluó la funcionalidad renal con medidas de velocidad de filtración glomerular, reabsorción tubular de glucosa, sodio y agua. Los resultados se expresan como media \pm SD, la comparación se realizó con test "t" de Student para datos apareados. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$. Los parámetros de funcionalidad renal no mostraron diferencias antes y después del agregado de F. Se observó una disminución significativa del %RTP a los 5 minutos de adicionado el F (basal: 53.6 ± 10 , post F: 36.6 ± 12.0). Luego de alcanzado el valor mínimo, el %RTP restablece sus valores basales con una pendiente de $0.51 \pm 0.24 \text{ min}^{-1}$, significativamente diferente de cero. Esto ocurre aún cuando la concentración de F en orina y plasma permanece constante. Este resultado no explica la hiperfosfatemia observada in vivo, pero podría ser la causa de la disminución del P óseo en tratamientos crónicos. Experimentos adicionales con diferentes dosis de fluoruro y variaciones temporales de su concentración, simulando la variación de fluoremia in vivo, deben realizarse para confirmar este hallazgo.

395. (12216) ÁREA DE GLOMÉRULOS SUBCAPSULARES VERSUS YUXTAMEDULARES EMPLEANDO DIFERENTES MEDIOS DE FIJACIÓN. OSSANI, GEORGINA PAULA; MARTINO, MARÍA FERNANDA; UCEDA, ANA MARGARITA; MONSERRAT, ALBERTO JUAN

Centro de Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA.

El objetivo de este trabajo fue determinar si el tamaño de los glomérulos yuxtamedulares es mayor que el de los subcapsulares en ratas de 2, 4 y 8 meses, empleando diferentes medios de fijación. Ratas hembra Wistar fueron pesadas y anestesiadas con tiopental sódico (40 mg/kg de peso corporal), se clampearon ambas arterias y venas renales simultáneamente y se extirparon ambos riñones. Estos se pesaron y se cortaron sagitalmente. El riñón izquierdo se fijó en formaldehído (4%) y la mitad posterior del riñón derecho en Bouin alcohólico (Duboscq Brazil). Ambos fueron coloreados con hematoxilina-eosina. El área glomerular se midió con analizador de imágenes (Image Pro Plus 3.0) en los glomérulos subcapsulares (aquellos que se encontraban inmediatamente por debajo de la cápsula, a no más de 250 micrones) y en los yuxtamedulares (aquellos que se encontraban inmediatamente encima de la médula, cerca de las arterias arcuatas). Se midieron 4622 glomérulos y los resultados de la medición de área para los diferentes grupos se muestran en la tabla. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un test de ANOVA a 3 vías (Statistica 5.0), empleando como variable dependiente el área glomerular y como variables independientes la localización del glomérulo, el fijador y la edad de la rata.

Fijador	Formol (Media \pm DE)	Formol (Media \pm DE)	Bouin (Media \pm DE)	Bouin (Media \pm DE)
Edad \				
Localización	Yuxtamedulares	Subcapsulares	Yuxtamedulares	Subcapsulares
2 meses	8209 \pm 371,8	5406 \pm 324,8	5818,2 \pm 372,7	4380,5 \pm 256,4
4 meses	9473,5 \pm 861,3	5943,2 \pm 933,2	7418,8 \pm 687,7	5873,7 \pm 665,7
8 meses	9771,5 \pm 773,7	6564,7 \pm 861,2	8742,5 \pm 730,1	6894,7 \pm 549,4

El área de los glomérulos yuxtamedulares fue significativamente mayor que la de los glomérulos subcapsulares independientemente del fijador o la edad del animal, ($p < 0,01$; $F=45,33$; $F=58,92$ respectivamente).

396. (12280) ROL DE LA REMODELACION VASCULAR RENAL EN LA ESCLEROSIS GLOMERULAR FOCAL Y SEGMENTARIA DE LA PREECLAMPSIA. CAO, GABRIEL(1); CAO,

NESTOR(1); HULIEV, ALEXIA(1); NADAL, MIGUEL(2); MONSERRAT, ALBERTO(1)

(1) Centro de Patología Experimental. Depto. de Patología, Facultad de Medicina, UBA. (2) Nefrología, Hospital de Clínicas, UBA.

El compromiso renal por la preeclampsia (PE) puede acompañarse de esclerosis glomerular focal y segmentaria (EGFS) caracterizada por el incremento matricial mesangial y el colapso capilar, la cual es propuesta como la resultante de la hipertrofia glomerular compensatoria. Algunos autores postulan a la hipertensión arterial (HTA) desarrollada por las pacientes y a la arterioesclerosis como determinantes de la EGFS, mientras que otros proponen la presencia de factores circulantes como responsables de los cambios glomerulares. Estudios realizados en modelos animales y en humanos señalan que la HTA provoca modificaciones adaptativas iniciales en los vasos de resistencia (remodelación), posterior pérdida de la autorregulación glomeruloarteriolar y esclerosis. El objeto del trabajo es analizar morfológicamente el posible rol de la remodelación vascular renal en las alteraciones glomerulares. Se estudiaron retrospectivamente las biopsias renales de 20 mujeres con diagnóstico clínico de PE, divididas en dos grupos: sin EGFS (n=10) y con EGFS (n=10). Se midieron los siguientes parámetros: área glomerular (AG) mesangial (AM) y capilar (AC), diámetro arteriolar externo (DAE) e interno (DAI), superficie de la pared vasular (SPV), espesor de la misma (EP) y relación pared:luz (Rel P/L) con un programa para análisis de imágenes (Image-Pro Plus®). Los valores se expresaron como media \pm DS. Para el estudio estadístico se empleó el test de Mann-Whitney.

PARA-METRO	AG (μm^2)	AM (μm^2)	AC (μm^2)	DAE (μm)	DAI (μm)	SPV (μm^2)	EP (μm)	REL P/L
SIN EGFS	24547.3 \pm 3687.9	6932.3 \pm 946.2	4203.9 \pm 729.3	40.1 \pm 6.3	14.6 \pm 3.9	1109.8 \pm 342.1	12.7 \pm 1.8	0.9 \pm 0.2
CON EGFS	17355.6 \pm 2073.3	9095.6 \pm 632.4	1640.9 \pm 638.9	39.8 \pm 6.8	10.2 \pm 2	1194.9 \pm 365.3	14.8 \pm 2.8	1.5 \pm 0.3
P	0.0002	0.0002	<0.0001	0.9397	0.0052	0.4359	0.0524	0.0004

Los hallazgos sugieren que la remodelación vascular no es causa suficiente para justificar la EGFS en la PE.

397. (12321) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN RIÑÓN DE RATA HIPERTENSA (SHR) UNINEFRECTOMIZADA (UNX) CON VALSARTAN. ANGEROSA, MARGARITA; CAO, GABRIEL; MADALENA, LETICIA; TOBLI, JORGE

Laboratorio de Medicina Experimental del Hospital Alemán.

Objetivo: Evaluar la respuesta de Valsartan (VAL), bloqueante del Receptor AT1 de Angiotensina II en relación con: 1) la expresión de la quimoquina Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); 2) el infiltrado de células mononucleares inflamatorias, macrófagos y monocitos (células ED1); y 3) la expresión de citoquina Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) en tejido renal de rata con severa hipertensión arterial y daño renal progresivo. Métodos: Machos SHR y control Wistar Kyoto (WKY). Se practicó uninefrectomía (UNX) a continuación durante seis meses: [G1] UNX-SHR (n= 8) agua. [G2] UNX-WKY (n= 8) agua. [G3] UNX-SHR+VAL (n= 8) con VAL 50mg/kg/día. [G4] UNX-WKY+VAL (n= 8) con VAL 50mg/kg/día. Se evaluó en riñón por inmunohistoquímica: MCP-1; células ED1; TGF β 1. Resultados: Al sexto mes: CICr $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gPC}$: G1=1.2 \pm 0.1*, G2= 2.9 \pm 0.1; G3= 2.6 \pm 0.3, G4=3.9 \pm 0.2**. Proteinuria (mg/día): G1= 253 \pm 39, G2= 63 \pm 10; G3= 67 \pm 9, G4= 15 \pm 7**. Presión Arterial (mmHg): G1= 218 \pm 17, G2= 154 \pm 7; G3= 147 \pm 8, G4= 121 \pm 3**. MCP-1 (% / mm(2)): G1= 30.2 \pm 2.6*, G2= 18.2 \pm 3.2; G3= 21 \pm 2.3, G4= 2.0 \pm 0.9 **. ED1 (Células/ mm(2)): G1= 464 \pm 32*, G2= 147 \pm 16; G3= 203 \pm 18**, G4= 38 \pm 10**. TGF β 1 (% / mm(2)): G1= 24.9 \pm 2.7*, G2= 9.9 \pm 1.8; G3= 11.1 \pm 2, G4= 3 \pm 0.7**. (p<0.01 * vs. todos G; p< 0.01 ** vs. G2 & G3; p< 0.01*** vs. G2). Conclusiones: El bloqueo del Receptor AT1 de la Angiotensina II a través de la utilización de Valsartán, reduce la inmunexpresión tanto de MCP-1 como de TGF β 1 junto con el infiltrado de células

mononucleares (ED1), controlando de esta manera la respuesta inflamatoria en riñón de rata UNX.

398. (12375) ROL DEL PODOCITO EN LA ESCLEROSIS GLOMERULAR FOCAL Y SEGMENTARIA DE LA PREECLAMPSIA. LAGO, NESTOR(1); HULIEV, ALEXIA(1); CAO, GABRIEL(1); NADAL, MIGUEL(2); MONSERRAT, ALBERTO(1)

(1) Centro de Patología Experimental. Depto. de Patología, Facultad de Medicina, UBA. (2) Nefrología, Hospital de Clínicas, UBA.

La preeclampsia (PE) se caracteriza histológicamente por el engrosamiento de las paredes capilares glomerulares con tumefacción endotelial (endoteliosis) e imágenes en dobles contornos. También puede acompañarse de esclerosis glomerular focal y segmentaria (EGFS). Esta lesión es morfológicamente semejante a las de la forma primaria, sin embargo clínicamente se diferencia por el curso autolimitado. El podocito es una célula postmitótica que juega un rol preponderante en la patogenia de la EGFS por lo que en los últimos tiempos su biología, funcionalidad y desarrollo han sido objeto de numerosos estudios, poniendo énfasis en sus modificaciones de adaptación y respuesta a la injuria. El objetivo del presente trabajo fue explorar las modificaciones de expresión fenotípica con marcadores de maduración podocítica (GLEPP1) y proliferación (Ki67) en biopsias renales de pacientes con PE. Se realizó el estudio retrospectivo de biopsias renales efectuadas en el puerperio inmediato de 12 pacientes con diagnóstico clínico de PE. Las lesiones de esclerosis fueron evaluadas con el índice semicuantitativo de Raij. Se realizaron técnicas de inmunohistoquímica con los marcadores Ki67 y GLEPP1. En los 12 casos estudiados no se observó positividad en podocitos con Ki67. La marcación con GLEPP1 fue positiva en todos los podocitos a excepción de los adyacentes a las áreas de esclerosis. Los resultados muestran que una disregulación del fenotipo de los podocitos podría estar involucrada en la patogenia de la EGFS en la PE.

399. (12393) SOLUBILIDAD EN TRITÓN X-100 DE NA+, K+ ATPASA (NKA) E INDUCCIÓN DE HSP70 EN UN MODELO IN VIVO DE NEFROTOXICIDAD AGUDA POR PARACETAMOL (APAP) EN RATAS. NAHUEL, WAYLLACE; MOLINAS, SARA (1); MONASTEROLO, LILIANA A (1); ELÍAS, MÓNICA (1); TRUMPER, LAURA (2)

Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. (1) CONICET, (2) CIUNR

Previamente observamos que la administración in vivo de una dosis tóxica de APAP provoca un aumento de la cantidad de NKA en homogenados de corteza renal y una redistribución de NKA hacia membranas apicales. In vitro APAP provocó el desprendimiento de NKA de su unión a membrana. Los daños funcionales revirtieron luego de 48 hs de la administración de APAP. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en la solubilidad en Tritón X-100 de NKA inmediatamente después de la administración in vivo de una dosis tóxica de APAP hasta la recuperación del cuadro. Se estudió además la participación de HSP70. Se trabajó con las cortezas renales de ratas Wistar macho adultas obtenidas 1 (A1), 6 (A6), 16 (A16) y 48 (A48) horas luego de la administración de APAP (1000 mg/kg p.c., i.p.) y de ratas controles (C, n= 4). Se las homogeneizó en buffer con Tritón X-100 0.1%, se tomó una muestra de homogenado (H) y por centrifugación se obtuvieron las fracciones solubles (S) e insolubles (I) en Tritón. En H, S, e I se detectó la presencia de la subunidad alfa de NKA por Western blot. En H se detectó la presencia de HSP70. Se midió además creatinina en plasma: C=8.5 \pm 0.4, A1= 22.4 \pm 4.7*, A6=21.3 \pm 4.7*, A16=28.2 \pm 1.6*, A48=11.5 \pm 3 mg/dl, * p< 0.05 comparado vs C. En H se observó un aumento de la cantidad de subunidad alfa en A1 y A6 (C= 100%, A1=119.3 \pm 1*, A6=197.9 \pm 10 *, A16=100.8 \pm 7, A48=92.7 \pm 11%, * p< 0.05 vs C). La solubilidad de NKA aumentó significativamente en los grupos A1 y A6. HSP70 aumentó

tó significativamente en A16 y A48. Los resultados corroboran que APAP en dosis tóxicas promueve en primera instancia un aumento de NKA. Los cambios en la solubilidad en Tritón demostraron el desprendimiento y restablecimiento de la unión de NKA al citoesqueleto durante el tiempo estudiado. Esta recuperación ocurrió conjuntamente con el aumento de HSP70 en riñón, asignándole a esta proteína un posible rol reparador.

400. (12537) ESTADO OXIDATIVO EN RIÑÓN E HÍGADO INDUCIDO POR UNA HEPATECTOMÍA PARCIAL EN RATAS. MAHIEU, STELLA TERESITA; CONTINI, MARIA DEL CARMEN (1); MILLEN, NESTOR (1); GONZALEZ, MARCELA (1); ELIAS, MARIA MONICA (2)

Fisiología. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL. (1). Farmacología. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR (2)

La resección hepática es una situación que induce cambios en la vinculación hepato-renal. Nuestro propósito fue investigar los cambios secuenciales en parámetros del estrés oxidativo en riñón e hígado durante los 7 días posteriores a una hepatectomía parcial (HP) del 65%. Se trabajó con 24 ratas Wistar macho adultas distribuidas en 4 grupos según el tiempo de regeneración hepática: 0 Control (C), 2 (Hp2), 4 (Hp4), 7 (Hp7) días a partir de la cirugía. En homogenados renales y hepáticos se determinó el estado de lipoperoxidación (LPO), glutatión reducido (GSH) y la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GSH-Px) y catalasa (Cat). En riñón se observó un descenso de GSH ($\mu\text{mol/g tej.}$) en Hp2 ($1,41 \pm 0,19^*$) y Hp4 ($1,89 \pm 0,09^*$) respecto a C ($2,36 \pm 0,06$), restableciéndose en Hp7. La LPO (nmol MDA/g tej.) solo estuvo aumentada significativamente en Hp 4 ($465,9 \pm 39,6^*$) vs C ($231,4 \pm 9,2$). GSH-Px (nmol NADPH min/mg prot) se mantuvo reducida durante el período controlado: Hp2 ($24,9 \pm 0,97^*$) vs C ($51,3 \pm 3,44$). Cat. (U/mg prot.) disminuyó en Hp2 y Hp4 ($0,31 \pm 0,05^*$ y $0,32 \pm 0,01^*$) vs C ($0,468 \pm 0,03$), restableciéndose su actividad en Hp7. En hígado la LPO estuvo aumentada en Hp2 ($842 \pm 61^*$) y Hp4 ($702 \pm 55^*$) vs C (290 ± 85) normalizándose en Hp7, sin cambios en GSH. GSH-Px y Cat estuvieron reducidas en Hp2, Hp4 y Hp7. Resultados: media \pm SEM. * $p < 0,05$ Después de una hepatectomía se inicia la regeneración hepática acompañada de bajo estrés oxidativo. En el riñón se incrementa el estrés oxidativo, que se normaliza a los 7 días en los parámetros estudiados a excepción de GSH-Px. Estas respuestas se podrían explicar por la mayor producción de GSH a medida que avanza la regeneración hepática, lo que permitiría su captación desde circulación por el riñón.

401. (12550) FUNCIONES RENALES DURANTE LOS PRIMEROS DÍAS POSTHEPATECTOMÍA. MAHIEU, STELLA TERESITA; MILLEN, NESTOR (1); GONZALEZ, MARCELA (1); CONTINI, MARIA DEL CARMEN (1); ELIAS, MARIA MONICA (2)

Fisiología. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL. (1). Farmacología. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (2)

Numerosas observaciones sugieren la existencia de una relación entre hígado y riñón. Nuestro objetivo fue caracterizar la evolución de la función renal a partir de una hepatectomía parcial (HP-65%) y por 7 días. Se trabajó con 28 ratas Wistar macho adultas distribuidas en 4 grupos según el tiempo de regeneración hepática: 0 Control (C), 2 (Hp2), 4 (Hp4), 7 (Hp7) días a partir de la cirugía. Se efectuaron balances de agua y sodio, se estudiaron parámetros hemodinámicos y tubulares, y la evolución de la función hepática a partir de LDH, ALT y albúmina sérica. Durante el período estudiado se observó reducción del peso corporal en Hp4 que tendió a restablecerse en Hp7. Los datos indicaron: VFG (ml/min.100g): C $0,81 \pm 0,02$; Hp2 $0,70 \pm 0,025^*$; Hp4 $0,67 \pm 0,05^*$; Hp7 $0,68 \pm 0,04^*$ ($p < 0,05$), sin cambios en CPAH. La EF% H₂O aumentó: C $0,34 \pm 0,04$, Hp2 $0,59 \pm 0,07^*$, Hp4 $0,50 \pm 0,03^*$, Hp7 $0,56 \pm 0,1^*$ ($p < 0,05$), con un patrón similar en la EF%Na. Solo se obser-

vó un aumento significativo de reabsorción de agua libre de solutos en Hp2. No existieron cambios en la excreción de Fosfatasa Alcalina por orina. Los balances de agua y sodio estuvieron reducidos, asociados a una disminución en la ingesta de alimento y con retención de Na en Hp2 y Hp4, e incremento de aldosterona sérica en Hp4 (pg/ml) $664 \pm 160^*$ vs C $359,2 \pm 48,3$. No se observaron cambios en la diuresis, pero se redujo la osmolaridad de la orina en Hp2 y Hp4. Disminuyó la fosfatúria en Hp2, Hp4 y Hp 7, así como la concentración de fosfato inorgánico sérico. La función hepática coincidió con un aumento de LDH y ALT en Hp2 y Hp4 que tendió a normalizarse en Hp7, mientras que la albúmina sérica se mantuvo reducida. Estos resultados sugieren que el proceso de regeneración hepática es capaz de inducir cambios en parámetros hemodinámicos y tubulares de la función renal, que no alcanzarían a normalizarse a los 7 días de realizada la cirugía, tiempo donde se ha comprobado la recuperación de algunas funciones hepáticas.

402. (12598) REGULACIÓN DE LA PERMEABILIDAD AL AGUA EN CÉLULAS PRINCIPALES DEL TÚBULO COLECTOR QUE EXPRESAN AQUAPORINA 2 INDUCIBLE POR AVP. FLAMENCO, MARIA DEL PILAR; CHARA, OSVALDO (1); VANDEWALLE, ALIAN (2); FORD, PAULA (1); CAPURRO, CLAUDIA (1)

Dpto. Fisiología, Fac. Medicina (UBA). INSERM U478, Faculté de Medecine Xavier Bichat, Paris, France

La permeabilidad al agua de los túbulos colectores (TC) es regulada por la incorporación de la AQP2 a la membrana bajo la acción de la AVP. Varios estudios muestran que además de esta regulación transcripcional existiría una regulación post-transcripcional en la expresión de AQP2 pero la funcionalidad de la proteína durante estos procesos no ha sido evaluada. El objetivo de este trabajo fue investigar las características de la permeabilidad al agua durante la inducción o inhibición de la expresión de AQP2. Utilizamos un modelo celular derivado de TC de ratones transgénicos (mpkCCDcl4) que constituye la primera línea celular con altos niveles de expresión de AQP2 inducible por AVP o forskolina (FK). Para estimular la expresión de AQP2, las células fueron tratadas 24 h con $10(-8)$ M AVP, $5 \times 10(-6)$ M FK o vehículo (control). La medición de la permeabilidad osmótica al agua se realizó a nivel transepitelial (Posm), con un dispositivo computarizado y a nivel transcelular (Pf), por videomicroscopía de fluorescencia. El Posm ($10(-4)$, cm.s(-1)) fue significativamente mayor en células tratadas 24 h con AVP ($27,3 \pm 8,22$, n=5) o FK ($25,6 \pm 3,20$ n=5) con respecto a los controles ($4,55 \pm 0,75$, n=4). A nivel transcelular, luego de la inducción de la expresión de AQP2 (24 h con FK), el Pf ($10(-4)$, cm.s(-1)) fue significativamente mayor que el control (24 h con vehículo) (FK: $18,10 \pm 1,35$, n=118 vs. Control: $8,03 \pm 0,94$ n=82, $p < 0,001$). Sin embargo, en las células que expresan AQP2 (24 h con FK), la remoción de FK del medio durante 1 h, aumenta aún más los valores de Pf (n=151, $p < 0,01$). Resultados moleculares anteriores sugieren que, en las células mpkCCDcl4, ante la remoción de la AVP del medio, existe un aumento transitorio en la expresión de AQP2, previo a su degradación. Nuestros resultados muestran que, en esta etapa, la AQP2 es funcional, tal cual vemos reflejado en los cambios del transporte de agua tanto a nivel celular como transepitelial.

403. (12620) ACTIVIDAD DEL COTRANSPORTADOR SODIO-GLUCOSA RENAL EN RATAS CON HIPERTENSION ARTERIAL EXPERIMENTAL POR ADMINISTRACIÓN DE L-NAME. ALBERTONI BORGHESE, MARIA FLORENCIA; MAJOWICZ, MÓNICA P; VIDAL, NORBERTO

Cátedra de Biología Celular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Objetivos: Estudiar la captación de alfa-metilglucosa (MG) en vesículas de membrana luminal (VML) de corteza renal de ratas normales (N; n=16) e hipertensas por administración oral de 20 mg/kg/día de L-NAME durante 6 (H6; n=13) y 12 semanas (H12;

n=14) y el entorno lipídico del transportador. La presión arterial sistólica (PA) se midió semanalmente por el método indirecto. Al finalizar el tratamiento se determinó: diuresis (D), natriuresis (Na), osmolaridad urinaria (Uos) y sérica (Pos), creatinina sérica (Cr), proteinuria 24 horas (P) y excreción urinaria de metabolitos del NO (NOx). Luego del sacrificio, se extrajeron los riñones, se disecaron las cortezas y se obtuvieron (VML) mediante centrifugación diferencial. Se midió la captación de ^{14}C -MG en VML durante 20 segundos, los datos obtenidos se ajustaron a una hipérbola y se calcularon los parámetros cinéticos Velocidad Máxima ($V_{\text{máx}}$) y constante de afinidad ($K_{0.5}$). Resultados: Los resultados no significativos no se muestran. H6: PA: 127.6 ± 1.4 vs 158.6 ± 2.2 mmHg**; NOx: 0.647 ± 0.062 vs 0.379 ± 0.102 $\mu\text{moles}/24\text{h}/100\text{g}^*$, $V_{\text{máx}}$: 29.5 ± 7.3 vs 13.9 ± 2.5 nmol MG/mg proteína/min**, $K[0.5]$: 7.1 ± 1.5 vs 4.6 ± 1.6 nM* para N e H respectivamente. H12: PA: 134.3 ± 2.1 vs 165.2 ± 3.4 mm de Hg**; Uos: 1181 ± 99 vs 843 ± 112 mOsm/l*; D: 12.3 ± 1.1 vs 18.2 ± 2.3 vs y NOx: 0.785 ± 0.110 vs 0.521 ± 0.049 $\mu\text{moles}/24\text{h}/100\text{g}^*$, $V_{\text{máx}}$: 29.5 ± 7.3 vs 25.9 ± 5.1 nmol MG/mg proteína/min, $K[0.5]$: 7.1 ± 1.5 vs 5.5 ± 1.7 nM* para N e H respectivamente. *H vs N $p < 0.05$ ** H vs N $p < 0.001$. No hubo cambios en el entorno lipídico. Los resultados se expresaron como media \pm ES usando ANOVA seguido del test de Bonferroni. En H6 y H12 aumentó la PA y disminuyó la excreción de NOx. En H12 disminuyó la Uos. $K_{0.5}$ disminuyó en ambos grupos, mientras que $V_{\text{máx}}$ solo en 6H. Los cambios no dependen del entorno lipídico. La menor actividad del SGLT2 podría ser un intento de compensar el estado hipertensivo, aunque su menor actividad no se ve reflejada en la excreción de sodio.

404. (12664) ANTI-FIBRONECTINA Y ENFERMEDAD RENAL. IVANCOVICH, JUAN (1); BOTTAI, HEBE (1); MORENO, JOSÉ (2); SALVARREY, MARCELA (2); SABALL, ESTER (2); LEIVA, MERCEDES (1)

Área Estadística. Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR. (2) Área Inmunología. Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR.

La determinación de autoanticuerpos (AuAcs) dirigidos a antígenos endógenos conjuntamente con la de los anticuerpos dirigidos a antígenos exógenos y el análisis de Complemento, son las principales pruebas serológicas utilizadas en la evaluación diagnóstica de pacientes con enfermedad renal. La capacidad diagnóstica de una prueba está determinada por su utilidad para categorizar correctamente a los pacientes según su relación con una enfermedad. Esta capacidad se expresa a través de la sensibilidad y la especificidad de la prueba, ambas dependientes, en el caso de una variable continua, del valor de corte (VC) elegido. En este trabajo se relatan los resultados obtenidos en base a la determinación por ELISA de anti-Fibronectina (a-Fn) y anti-Histonas (a-His) en 42 individuos normales y 159 pacientes con enfermedad renal diagnosticada. Se modeló la respuesta "enfermedad renal" mediante un análisis de regresión logística con selección de variables paso a paso utilizando tanto a a-Fn como a a-His como variables predictivas. La única que ingresa al modelo es a-Fn (probabilidad asociada al valor de la estadística de Hosmer Lemeshow para probar la bondad del ajuste: $p = 0.57$). Similares resultados se obtienen analizando las curvas que representan la sensibilidad (SENS) en función de [1-especificidad (ESP)], conocidas como curvas ROC, que indican la capacidad diagnóstica de la prueba para cada VC. Las áreas bajo la curva ROC (AUC) estimadas resultan: 0.70 para a-His, 0.89 para a-Fn y 0.90 para a-His y a-Fn simultáneamente. La AUC para a-Fn es significativamente mayor que la AUC para a-His ($p < 0.0001$). El VC que, trabajando con $\text{ESP}=100\%$, permite lograr la mayor SENS (70.4%) es 0.168, aproximadamente igual a la media más 2DS ($0.867 + 2 \cdot 0.039$) del conjunto de individuos normales. Los resultados muestran que los AuAcs a-Fn se asocian con enfermedad renal y sugieren la importancia de su inclusión como prueba serológica adicional en la evaluación y monitoreo de pacientes con esta patología.

405. (12689) DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE SINDROME UREMICO HEMOLITICO (SUH) EN RA-

TAS INOCULADAS CON TOXINA SHIGA TIPO 2. OCHOA, FEDERICO(1); GARCÍA JURADO, S(2); ISERN, E(2); REPETTO, H(2); IBARRA, C(1); ZOTTA, E(1)

(1) Lab. de Fisiopatogenia, Depto. de Fisiología, Fac de Medicina, UBA. (2) Serv. de Pediatría, Htal Posadas

El SUH es causado por la acción de numerosos factores etiológicos y patológicos que resultan en anemia hemolítica microangiopática con signos y síntomas de agresión microangiopática especialmente en tubo digestivo, riñón y encéfalo y están asociados a trombocitopenia e Insuficiencia Renal Aguda (IRA). En Argentina, el SUH secundario a la infección por *E. coli* productor de toxina Shiga, es la causa más frecuente de IRA en niños menores de 5 años. Los modelos animales utilizados hasta el momento se asemejan a la enfermedad en el humano solo en algunos aspectos siendo entonces útiles para estudiar aquellas características comunes de la fisiopatología. Sin embargo los modelos de rata hasta el presente son similares, pero difieren con los hallazgos en humanos donde la presentación del cuadro es siempre con poliuria, asociada a necrosis tubular aguda (NTA) sin microangiopatía trombótica (MAT). El objetivo de nuestro trabajo es obtener un modelo de IRA en rata que se asemeje al cuadro humano. Para ello se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 200 g de peso que fueron inoculadas con 0.2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de toxina Shiga tipo 2 (Stx2) pura en el plexo retroocular (grupo Exp1) o con 3 ml de sobrenadante de cultivo de *E. coli* DH5? recombinantes que contiene 80 ng/ml de Stx2 por vía intraperitoneal (grupo Exp2). En ambas condiciones experimentales se desarrolló IRA luego de 48 hs de tratamiento. En el grupo Exp1 se observó poliuria y NTA sin lesiones trombóticas. En cambio, en el grupo Exp2 se observó oliguria, focos aislados de NTA y trombosis glomerular. Estos resultados parecen indicar que el grupo Exp2 es más parecido al cuadro humano caracterizado por oliguria y trombosis glomerular. Es importante continuar estudios para determinar cuál de los constituyentes de sobrenadante del cultivo bacteriano es el que complementa la acción de Stx2 en el desarrollo del SUH en rata.

406. (12751) LA TOXICIDAD RENAL DEL CL2HG (HG2+) INVOLUCRA TAMBIEN AL SISTEMA DE COMPLEMENTO (SC). SABALL, ESTER; MORENO, JOSÉ; ELÍAS, MÓNICA (1); SALVARREY, MARCELA

Área Inmunología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Área Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

El SC es un potente mediador inflamatorio cuyos estrictos mecanismos de regulación deben ser superados para permitir su activación por alguna de las tres vías posibles. Estas convergen en el clivaje de C3 por las convertasas estabilizadas por Mg^{2+} : C4b2a (clásica/lectinas) y C3bBb (alterna), con posterior formación del Complejo de Ataque a la Membrana (MAC). Previamente observamos depósitos renales de MAC en el modelo de insuficiencia renal aguda (IRA) inducida por Hg^{2+} en ratas (5 mg/kg peso,sc). En el presente trabajo estudiamos in vitro si el Hg^{2+} , en forma análoga a lo que ocurre con Ni^{2+} , es capaz de aumentar la estabilidad de las convertasas. Se midió la actividad de B y C2 en presencia de 5mM Mg^{2+} y 55 μM Hg^{2+} (concentración en plasma 1 h post inyección en el modelo de IRA) y se la comparó con la que se alcanza en presencia de sólo Mg^{2+} . Se emplearon ensayos hemolíticos que permiten determinar el número de sitios hemolíticos efectivos (Z) generados por las convertasas. Para B se utilizó suero depletado de B por calentamiento 15 minutos a 50°C y glóbulos rojos de conejo, en buffer veronal salino (VBS), 5 mM Mg^{2+} y 10 mM EGTA. Para C2 se utilizaron células EAC1-4 preparadas con eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina de conejo y suero depletado de C2 por calentamiento 5 minutos a 56°C (inactiva C2 sin afectar C1). Como reactivo final que aporta C3-C9 se empleó suero de rata 1/50 en VBS-EDTA. Todos los datos representan la media de al menos 3 experimentos independientes por duplicado. Para formar 1 Z en presencia de 55 μM Hg^{2+} , se requirió 1.33 ± 0.04 veces menos fac-

tor B y 1.57 ± 0.07 menos C2 que lo requerido empleando sólo Mg^{2+} ($p < 0.05$). A concentraciones menores a $10 \mu M$ Hg^{2+} no se observó efecto. Los resultados muestran que el Hg^{2+} , a la concentración que se alcanza en el modelo experimental de IRA, aumenta la actividad hemolítica de B y C2 y por tanto de las convertasas, sugiriendo un efecto amplificador que superando los mecanismos regulatorios, podría resultar en activación del SC.

407. (12757) LA DOPAMINA INDUCE CAMBIOS EN LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PKC ζ EN CÉLULAS DE TÚBULO PROXIMAL. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO 20-HIDROXIEICOSATETRAENOICO, UN METABOLITO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO. KIRCHHEIMER, CAROLINA(1); ACQUIER, ANDREA(2); MENDEZ, CARLOS F.(2); NOWICKI, SUSANA(1)

(1) Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) CONICET. (2) Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina UBA

Reportamos previamente que el ácido 20 hidroxieicosatetraenoico (20HETE) y la isoforma ζ de la Proteína Kinasa C (PKC ζ) están involucrados en la regulación de la actividad de la Na $^{+}$,K $^{+}$ -ATPasa renal por la dopamina (DA). La PKC ζ es una isoforma atípica, cuya activación se relaciona con cambios en su distribución subcelular y es independiente del calcio y del diacilglicerol. El objetivo de este trabajo fue analizar si la DA modifica la localización subcelular de la PKC ζ en el túbulo proximal, y si el 20HETE interviene en este proceso. Se utilizaron ratas controles y tratadas con 1-aminobenzotriazol (ABT, 50 mg/kg, i.p.), un inhibidor selectivo en el riñón del citocromo P4504A, responsable de la producción de 20HETE. Se aislaron células de túbulo proximal, se incubaron con DA ($10 \mu M$) ó 20HETE ($1 \mu M$), se separaron las fracciones soluble (citósol) y particulada (membranas) por ultracentrifugación, y se determinó el contenido de PKC ζ por Western blot. La producción de 20HETE se determinó por TLC y radioautografía de los productos de incubación de lisados de células proximales con [^{14}C] ácido araquidónico (AA) y NADPH. Tanto la DA como el 20HETE disminuyeron el contenido de PKC ζ en membranas y lo aumentaron en el citósol (contenido de PKC ζ en membranas y citósol, expresado en %: basal 47 ± 8 y 53 ± 8 ; DA 33.5 ± 9.5 y 66.5 ± 9.5 ; 20HETE 25 ± 14 y 75 ± 14). El tratamiento con ABT inhibió el efecto de la DA, pero no el del 20HETE (contenido de PKC ζ en membranas y citósol, expresado en %: basal 25 ± 10 y 75 ± 10 ; DA 20 ± 7 y 80 ± 7 ; 20HETE 7 ± 3 y 93 ± 3). La incubación de lisados celulares con [^{14}C]AA resultó en la producción de diversos metabolitos del AA, entre los cuales se identificó al 20HETE. La producción de 20HETE fue inhibida selectivamente por el ABT. Se sugiere que el 20HETE participa en la vía de transducción de señales de la dopamina en el túbulo proximal, mediando cambios en la distribución subcelular de la PKC ζ .

NEUROCIENCIAS C

408. (12470) LA HIPOXIA AGUDA PRENATAL PRODUCE ALTERACIONES BIOQUÍMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES EN MITOCONDRIAS DEL SNC. GIUSTI, SEBASTIÁN (1); CONVERSO, DANIELA (2); PODEROSO, JUAN JOSÉ (2); FISZER DE PLAZAS, SARA (1)

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis". Facultad de Medicina. Laboratorio Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas

Se ha demostrado en modelos de hipoxia/isquemia en adultos que las mitocondrias juegan un rol importante como blancos del daño y como fuente de moléculas señalizadoras del mismo. Sin embargo, es escasa la información sobre el daño mitocondrial inducido por falta de oxígeno en el cerebro en desarrollo. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar los cambios tempranos en la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales

NADH-ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I) y Citocromo c oxidasa (Complejo IV) y analizar la ultraestructura de las mitocondrias en el lóbulo óptico de embriones de pollo en el día embrionario 12 sometidos a una hipoxia (H) aguda prenatal (8% [O $_2$], 60 min.) seguida de distintos tiempos de reoxigenación (ROX): 1hs, 2hs, 3hs, 4hs, 24hs y 48hs. Las actividades de los Complejos I y IV se midieron en fracciones mitocondriales monitoreando la oxidación de NADH a 340nm y la oxidación de citocromo c a 550nm, respectivamente. La ultraestructura mitocondrial se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Los resultados obtenidos muestran una disminución del 50% ($p < 0.01$) de la actividad máxima del Complejo I al cabo de la hipoxia y durante las 4 hs siguientes de ROX, recuperándose totalmente al cabo de las 48hs, en tanto que el Complejo IV no presenta variaciones en su actividad máxima. Mediante MET se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) en la proporción de mitocondrias con daños en la doble membrana y vacuolas durante las 2 primeras horas de ROX. Por último, se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) en la superficie de las mitocondrias durante la primer hora de ROX. En conclusión, en estadios tempranos del desarrollo, los eventos de H/ROX producen en las mitocondrias una disminución de la tasa respiratoria, acompañada de alteraciones morfológicas asociadas a una permeabilización no específica de la membrana interna. Esto conduce a un aumento de volumen de la organela y a una eventual ruptura de su membrana externa.

409. (12533) EFECTO DE LA HIPERTENSION OCULAR CRÓNICA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA NITRERGICO RETINIANO. BELFORTE, NICOLÁS; MORENO, MARÍA CECILIA; KELLER SARMIENTO, MARÍA INÉS; ROSENSTEIN, RUTH ESTELA

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana

El glaucoma es una disfunción ocular frecuente caracterizada por la pérdida progresiva de las funciones visuales que se asocia a la muerte de células ganglionares retinianas. El aumento en los niveles de óxido nítrico (NO) podría formar parte de los mecanismos etiopatogénicos de esta enfermedad. En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un modelo de glaucoma experimental en ratas a través de la administración de ácido hialurónico (AH) en la cámara anterior del ojo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la hipertensión ocular crónica inducida por AH sobre la actividad del sistema nitrérgico retiniano. Para ello, se inyectaron ratas con AH (1 vez/semana, durante 3 ó 6 semanas) en la cámara anterior de un ojo y vehículo en el ojo contralateral y se determinó la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) (a través de la conversión de (3)H-arginina en (3)H-citrulina), los niveles de las isoformas neuronal (nNOS) e inducible (iNOS) (determinados por Western blot), el flujo de L-arginina (usando (3)H-arginina) y el efecto de la arginina sobre la acumulación de GMPc (determinado por radioinmunoensayo). Los resultados obtenidos indican que la actividad de NOS (pero no los niveles de nNOS ni de iNOS) fue significativamente mayor en ojos tratados con AH durante 3 y 6 semanas respecto a los controles inyectados con vehículo (** $p < 0.01$, Tukey). El flujo de L-arginina y el efecto de arginina (2mM) sobre la acumulación de GMPc fueron significativamente mayores en retinas de ojos hipertensos durante 3 y 6 semanas (** $p < 0.01$, Tukey). En suma, estos resultados indican un aumento significativo de la actividad del sistema nitrérgico retiniano en períodos tempranos de hipertensión ocular. Dado que estos cambios precedieron a las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la hipertensión ocular, los resultados avalan la participación del NO en la neuropatía glaucomatosa.

410. (12571) PACIENTES EPILÉPTICOS CON HETEROTOPÍAS NODULARES PERIVENTRICULARES: FACTORES PRONÓSTICOS DE FARMACORRESISTENCIA. CONSALVO, DAMIÁN (1, 2, 4); KAUFFMAN, MARCELO (1);

PAPAYANNIS, CRISTINA (1); GIAGANTE, BRENDA (1,4); ODDO, SILVIA (1); SALGADO, PABLO (1); KOCHEN, SILVIA (1,2,3,4)

(1)Centro de Referencia de Epilepsia. División Neurología. Hospital Ramos Mejía. (2)SECyT. (3)CONICET. (4)UBA.

Antecedentes: Los pacientes con malformaciones corticales constituyen un grupo heterogéneo de enfermos con diversas manifestaciones clínicas y EEG. Las Heterotopías Nodulares Periventriculares (HNP) constituyen un grupo dentro de estas malformaciones, en los cuales los factores pronósticos no están claramente definidos. Objetivo: Evaluar factores pronósticos de farmacoresistencia en pacientes epilépticos portadores de HNP. Material y Método: Diecinueve enfermos fueron clasificados en: Grupo 1-Respondedores al tratamiento farmacológico y Grupo 2-No Respondedores. Se analizó: edad, edad de inicio de la epilepsia (EIE), antecedentes perinatales (AP), frecuencia anual de crisis (FAC), localización de la zona ictal sintomática (LZIS), anomalías epileptiformes (AE) en el EEG, localización de las HNP y anomalías asociadas en las IRM (AAIRM). Resultados: G1 (n=11): 7 mujeres (63.6 %), edad 28.2 ± 10.2 años (rango 15-44), EIE 13.7 ± 6.8 años (rango 2-21), 2 enfermos (18.1%) con AP, FAC 30.7 ± 34.7 (rango 0-120). LZIS temporal en 5 enfermos (45.4%) y multifocal en 3 (27.2%), 8 enfermos (72.7%) con EEG anormal, 5 (62.5%) de ellos con AE. En 6 casos (54.6%) la HNP fue difusa y en 5 (45.4%) focal. En 7 enfermos (63.6%) se observaron AAIRM, ninguno mostró una esclerosis del hipocampo (EH). G2 (n=8): 6 mujeres (75%), edad 36.8 ± 16 años (rango 18-59), EIE 12.7 ± 8.7 años (rango 1-23), 3 enfermos (37.5%) con AP, FAC 135.7 ± 251.4 (rango 24-750). LZIS temporal en todos los enfermos (100%) y multifocal en 4 (50%), todos (100%) con EEG anormal y 7 (87.5%) AE. En 3 casos (37.5%) la HNP fue difusa y en 5 (62.5%) focal. En 6 enfermos (75%) se observaron AAIRM, 4 mostraron EH. La LZIS temporal ($p=0.01$ - OR 2.2; IC 1.1-4.2) y la EH asociada G2 ($p=0.01$ - OR 3.7; IC 1.6-8.6) fueron más frecuentes en el G2. La LZIS temporal y la presencia de EH asociada resultaron factores de mal pronóstico en los pacientes con HNP.

411. (12605) EFECTOS DE UN BLOQUEANTE ENDOTELI-NÉRGICO SOBRE LA RESPUESTA DE LA RETINA A LA ENDOTOXINA. IRIBARNE, MARÍA; LOBASSO, KARINA; TORBIDONI, VANESA; STELLA, ANA MARÍA; SUBURO, ANGELA M.

Facultad de Cs Biomédicas, UA. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales-UBA

La endotelina-1 (ET-1) es un potente vasoconstrictor involucrado en la patogenia del shock séptico. También se ha demostrado que aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Existe evidencia de que tezosentán (T), un bloqueante no selectivo de los receptores endotelinérgicos A y B (ET-A y ET-B), reduce la injuria séptica en pulmón e intestino. Observamos en la uveitis experimental murina inducida por endotoxina (LPS), los astrocitos que controlan la barrera hemato-retiniana presentan aumento de inmunoreactividad para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y el tratamiento con T disminuye el edema y la extravasación celular, dos signos de la uveitis. Para comprender los mecanismos endotelinérgicos en la uveitis estudiamos la expresión de GFAP por Western blot, y la actividad de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), glutathion peroxidasa (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX). Los animales (n = 60) recibieron salina (S) o T (10 mg/kg, sc) una hora antes de la administración de LPS (5 mg/kg, ip) y se repitió la dosis de S o T a las 24 horas. El tratamiento con T duplicó la expresión de GFAP mientras que LPS la aumentó 4 veces. La combinación T-LPS disminuyó GFAP, pero sin llegar a los niveles basales. La actividad de las enzimas antioxidantes siguió un patrón semejante, con niveles máximos en los animales tratados con LPS y mínimos en los tratados con S o con T-LPS. T proudujo tanto el aumento de GFAP como de la actividad de estas enzimas, aún en ausencia de estímulo endotóxico. El aumento de GFAP indica que tanto el

bloqueo de endotelina como la estimulación endotóxica producen activación glial en la retina. Sin embargo, T-LPS, reduce la expresión de GFAP, sugiriendo una menor activación glial. Ya que las tres actividades antioxidantes (GPX, CAT y APX) siguen un patrón similar, postulamos que el bloqueo de los receptores endotelinérgicos promueve un estado antioxidante que protegería a la retina del daño endotóxico

412. (12625) LA TOXINA SHIGA 2 (STX2) PRODUCIDA POR ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICO (STEC) SE LOCALIZÓ EN EL CEREBRO DE RATA LUEGO DE SU ADMINISTRACIÓN Y ALTERÓ LA ESTRUCTURA NEURONAL. PISTONE CREYDT, VIRGINIA(1); LOIDL, C.FABIÁN(2); IBARRA, CRISTINA(1); GOLDSTEIN, JORGE(1)

(1) Lab. Fisiopatogenia, Depto Fisiología, Fac. Medicina, UBA. (2)IBC y Neuroc E. de Robertis, Fac. Medicina, UBA.

La Stx2 producida por STEC es la causa principal de colitis hemorrágica en humanos que puede derivar en Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). El 6% de los casos de SUH producen lesiones permanentes del Sistema Nervioso Central (SNC) con riesgo de muerte. El objetivo de este trabajo fue el estudio de la acción tóxica de Stx2 en el SNC de ratas machos SD inyectadas vía i.p. con 3ml de sobrenadante de E. coli recombinante que contiene Stx2 (80ng/ml). Luego de 48hs de tratamiento se observó diarrea, pérdida de peso, oliguria, debilidad y muerte. Los animales fueron seguidamente perfundidos intracardíacamente con paraformaldehído 4%, se extrajo el encéfalo y Stx2 se inmunolocalizó en células parenquimatosas cercanas a vasos sanguíneos situadas en el núcleo periacueductal gris. En la misma zona se observaron neuronas hipertrofiadas muy intensamente teñidas con Nissl, núcleo desplazado, prolongación festoneada y neuronas amorfas. Estos resultados sugieren que la toxina logra atravesar la barrera hematoencefálica y altera la estructura neuronal. La lesión de los animales tratados puede deberse a la acción directa de Stx2 en neuronas del encéfalo la cual puede estar potenciada por factores del sobrenadante bacteriano. A continuación se purificó Stx2 por cromatografía de afinidad, se cuantificó por geles de SDS-PAGE y Western blot, se midió su actividad citotóxica en células renales en cultivo (10(8)CD50/ml) y se usó en microinfusión intracerebroventricular (MI-ICV). Se administró 6µl de Stx2 purificada (1ng/µl) en cerebro de rata vía MI-ICV pudiéndose observar alteraciones en la ultraestructura neuronal. El modelo de MI-ICV permite estudiar la fisiopatología de la intoxicación cerebral por toxina Shiga para conocer sus consecuencias en la evolución de la enfermedad.

413. (12714) HIPOXIA AGUDA PRE-NATAL Y APOPTOSIS: VIAS INVOLUCRADAS EN EL SNC EN DESARROLLO. VACOTTO, MARINA; FISZER DE PLAZAS, SARA

Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Prof. Dr. E. De Robertis, Facultad de Medicina, UBA.

En estudios previos, mediante ensayos de TUNEL, hemos demostrado que una hipoxia hipóxica aguda normobárica (8%O₂, 92%N₂, durante 1 hora) produce un aumento significativo de más del 200% ($P<0.01$, n=3) en el número de células picnóticas en el día embrionario (DE) 12 a las 6 hs. post-hipoxia (P-H) vs controles. En el DE 18, en cambio, no se encontraron diferencias significativas entre los embriones controles y los hipóxicos en ninguno de los tiempos evaluados (Vacotto y Fiszser de Plazas, 2004). El objetivo del presente trabajo ha sido establecer una correlación temporal entre la muerte neuronal previamente observada y la activación de proteínas pro y anti apoptóticas. A tal fin, se determinó la expresión de los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, y de las proteínas pro-apoptóticas Caspasa 9 y Caspasa 3, en fracciones citosólicas de lóbulo óptico de pollo, mediante Western Blot. Los resultados obtenidos muestran en el DE 12 que los valores de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 aumentan un 50% ($p<0.05$, n=4) al terminar el tratamiento hipóxico de 1 hora, se-

guidos por un aumento significativo de los niveles de Caspasa 9 del 50% ($p < 0.05$, $n=4$) a los 30 min. P-H y Caspasa 3 superior al 60% ($p < 0.01$, $n=7$) a los 60min. P-H. En el DE 18 no hay diferencias significativas entre los controles y los hipóxicos durante la cinética evaluada. En conclusión, la exposición del SNC en desarrollo a una injuria hipóxica produce un equilibrado desbalance de los marcadores celulares anti y pro-apoptóticos que en conjunto conducen a un proceso de muerte celular apoptótica, la cual se desencadena únicamente en los estadios tempranos del desarrollo.

414. (12724) VULNERABILIDAD DIFERENCIAL DE LAS LÁMINAS DEL TECTUM OPTICO ANTE UN EVENTO HIPOXICO EN EL DESARROLLO. POZO DEVOTO, VICTORIO MARTIN; MITRIDATE, ALBA; FISZER DE PLAZAS, SARA

Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Prof. Dr. E. De Robertis, Facultad de Medicina, UBA.

Los eventos de hipoxia-isquemia producen en el sistema nervioso central un daño irreversible que se puede evidenciar como muerte celular (MC) necrótica y/o apoptótica. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el efecto de una injuria hipóxica en el tectum óptico (TO), analizando la cinética temporal de la MC. A tal fin, se utilizaron embriones de pollo de día 12, los cuales fueron sometidos a una hipoxia (H) aguda (8% O₂, 60 min.) para ser restablecidos a una atmósfera normóxica durante 0, 3, 6, 9 y 12 hs., tiempos en los cuales fueron sacrificados. Las determinaciones se realizaron en cortes de TO con el objeto de analizar las láminas que lo componen, desde el ventrículo hacia la pia: SvZ, EGC, C^{h-i-j} y CCT3. Como marcadores de MC se utilizó la tinción de Hoechst para analizar morfología nuclear, inmunofluorescencia con anticuerpos anti caspasa-3 activa y la técnica de TUNEL. Los resultados de colocalización obtenidos con Hoechst y caspasa-3 activa, mostraron que tres láminas (CCT3, C^{h-i-j} y EGC) presentan un aumento significativo de MC a las 6 hs. post-H comparados con sus respectivos controles ($p < 0.01$), no detectándose diferencias en la lámina SvZ en ninguno de los tiempos analizados. La colocalización de Hoechst, caspasa-3 activa y TUNEL, evidenció que existe en el TO un gradiente de MC propia del desarrollo (embriones controles), siendo mayor en la lámina SvZ y disminuyendo hacia la lámina CCT3. Además, se observó a las 6 hs. post-H diferencias significativas en la tasa de MC respecto a su control en las láminas CCT3, C^{h-i-j} y EGC ($p < 0.05$), obteniéndose el mayor aumento en la lámina CCT3 el cual disminuye gradualmente hacia la lámina SvZ, donde no hay aumento. En conclusión, en el TO en desarrollo existe un retraso temporal entre la injuria hipóxica y la manifestación de la MC igual en todas las láminas, aunque la vulnerabilidad de las láminas sea distinta al evento hipóxico. La colocalización de los marcadores utilizados, indicaría que la MC observada es del tipo apoptótico.

415. (12726) MÚLTIPLES EFECTOS DEL ACIDO 5-AMINOLEVULICO EN CEREBRO DE RATON. BUZALEH, ANA MARIA; RODRIGUEZ, JORGE (1); GEREZ, ESTHER (1); BATLLE, ALCIRA (1)

(1) CYPY-CONICET, Hospital de Clínicas, (2) Depto. Química Biológica, FCEN, UBA

El ácido 5-aminolevulico (ALA), precursor del hemo, que se acumula en la Porfiria Aguda Intermitente, sería el responsable de las manifestaciones neurológicas de esta enfermedad. Se ha demostrado que los oxirradicales generados por el ALA causan lesiones oxidativas en las membranas sinápticas de cerebro de rata. Hemos observado que la acumulación de ALA en cerebro de ratón produce alteraciones sobre el metabolismo del hemo, el sistema metabolizante de Fase I y el sistema colinérgico (SAIC 2003-2004). El objetivo de este trabajo fue determinar si la administración aguda (una única dosis de 40 mg/kg) o crónica (40 mg/kg cada 48 horas, 2 semanas) de ALA a ratones alteraba el sistema antioxidante de cerebro. Para ello se midieron las activida-

des de las enzimas Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa, Glutacion peroxidasa (GPx) y Glutacion reductasa (GRed) y los niveles de malondialdehído (MDA) y glutacion reducido (GSH). La administración aguda de ALA provocó un aumento en los niveles de MDA (30%, $p < 0,05$; VN: 0,76±0,18 nmol/mg) y la actividad de Catalasa (46%, $p < 0,05$; VN: 1,7±0,5 U/mg); y disminución en la actividad de SOD (33%, $p < 0,05$; VN: 732,2±235,2 U/mg). Luego de la administración crónica de ALA, además se detectó un incremento en la actividad de GPx (20% $p < 0,05$; VN: 22,2±4,3 U/mg), mientras que la actividad de catalasa se encontraba en los niveles basales. Los niveles de GSH se encontraron significativamente disminuidos en todos los casos (25%, $p < 0,05$; VN 31,3±7,3 nmol/mg). El incremento del 80% en los niveles de ARNm de la enzima Hemo oxigenasa indicaría una respuesta antioxidante con el fin de proteger al cerebro del daño provocado por el ALA. Los resultados descriptos conjuntamente con los previamente observados, indican que el ALA no sólo estaría provocando un rápido aumento en las especies reactivas de oxígeno sino que afectaría también el sistema metabolizante de drogas con la consecuente alteración en la regulación del metabolismo del hemo y en la metabolización de cualquier otra droga exógena o endógena en cerebro.

416. (12750) EFECTO CITOPROTECTOR DE LA MELATONINA SOBRE LA NEUROTOXICIDAD POR CORTICOIDES EN HIPOCAMPO DE RATA. FURIO, ANALÍA; FONTAO, RAMIRO; FALCO, NICOLÁS; RUIZ, JUAN; CACCURI, ROBERTO; CARDINALI, DANIEL

Laboratorio de Neurociencias – Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina – Universidad de Buenos Aires

Algunas enfermedades tales como la Depresión Mayor y la Enfermedad de Alzheimer muestran una disminución en el volumen del hipocampo al mismo tiempo que un aumento en los niveles del cortisol. La dexametasona, un agonista sintético de receptores de glucocorticoides, tiene una comprobada acción neurotóxica sobre el hipocampo. Por otro lado, el objetivo de este trabajo fue analizar si la melatonina, una hormona liberada por la glándula pineal con efectos cronobióticos, citoprotectores, y antioxidantes ejerce efectos neuroprotectores en ratas tratadas con dexametasona. Un grupo de animales fue tratado durante 9 días con 0,5 mg/kg de dexametasona s.c.. La mitad de éste grupo recibió 25 µg/ml de melatonina en agua de bebida por 10 días previos y durante el tratamiento con dexametasona. Ambos grupos fueron comparados con sus respectivos controles inyectados con solución salina. En el análisis morfométrico de la histología del hipocampo, se observó que los animales tratados con dexametasona mostraron un 25,6 % de células anormales por campo a diferencia de aquellos tratados con dexametasona y melatonina los cuales tuvieron un 5,7 % de células dañadas ($p < 0,001$). También se detectó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el porcentaje de células anormales del hipocampo izquierdo (31,44%) y el hipocampo derecho (18,69%) en las ratas tratadas con dexametasona, diferencia que desapareció luego de la administración de melatonina. Puede concluirse que la melatonina ejerce un importante efecto citoprotector sobre las alteraciones neurotóxicas producidas por la dexametasona en el hipocampo.

417. (12756) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ÓXIDO NITRICO SINTASA Y DE NITROTIROSINA EN EL CEREBELO Y NÚCLEOS DEL RAJE DE RATAS SOMETIDAS A ASFIXIA PERINATAL. LOIDL, C. FABIÁN; CAPANI, FRANCISCO; REY FUNES, MANUEL; IBARRA, MARIANO; VEGA, M. CRISTINA; CACCURI, ROBERTO; COIRINI, HÉCTOR

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. E. De Robertis". Instituto de Biología y Medicina Experimental, Depto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

Un alto porcentaje de consecuencias neurológicas y psiquiátricas que se observan en la clínica, coinciden con antecedentes de complicaciones obstétricas cuando se indaga en la historia

clínica de los pacientes. En el presente estudio centramos nuestra atención en el cerebelo y en los núcleos del rafe, utilizando ratas de 21 días de edad que fueron sometidas a una asfíxia perinatal global (AP) con la cual hemos previamente descrito alteraciones en el cerebro de animales de 3 meses de edad. El cerebelo y los núcleos del rafe, están implicadas en la regulación del tono muscular y equilibrio y el tono afectivo respectivamente. Se emplearon técnicas de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y anticuerpos anti-nitrotirosina (N-tyr). En el grupo AP se observó una intensa inmunomarcación en todas las capas del cerebelo (mayor del 70%) en comparación con lo observado en el grupo control, incluyendo a las células de Purkinje, que fueron negativas en el control. De la misma forma la inmunomarcación con N-tyr, prácticamente no presente en los animales controles, fue por el contrario muy intensa en el grupo AP, en particular en las células de Purkinje y en la astrogliá de la sustancia blanca. Los núcleos dorsal, medio y ventral del rafe evidenciaron una mayor inmunomarcación en el grupo AP (del orden 50-80%) tanto con anticuerpos para nNOS como para N-Tyr. En todos los casos la densidad óptica relativa obtenida por análisis de imágenes computarizado fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$, test de "t"). De esta manera, disturbios en el sistema nitrérgico del rafe y del cerebelo, áreas que han sido poco estudiadas, podrían ser responsables de algunos signos y síntomas neurológicos y psiquiátricos que se evidencian en pacientes que han padecido asfíxia durante el parto. (UBACYT -M020)

NEUROCIENCIAS D

- 418. (12303) DAÑO OXIDATIVO DE LÍPIDOS EN SEGMENTOS EXTERNOS DE FOTORRECEPTORES EQUINOS.** GUAJARDO, MARGARITA; TERRASA, ANA MARÍA; ZAPATA, GUSTAVO(1)

Cátedra de Bioquímica Fac. Cs. Veterinarias UNLP. (1)Cátedra de Patología Médica y Hospital de Clínicas Fac. Cs Veterinarias UNLP

La uveítis recurrente equina (URE) es la causa más común de ceguera. La fisiopatología de la URE se desconoce, actualmente la teoría más aceptada es que se trata de una enfermedad inmunomediada producida por causas diversas. Tanto la retina como la coroides están involucradas, observándose infiltración de células inflamatorias. Recientemente se ha investigado el rol de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como iniciadores del daño retinal en la uveítis. Estas especies, liberadas por neutrófilos y macrófagos actúan como iniciadores de la peroxidación lipídica. Las membranas de los segmentos externos de los fotorreceptores (ROS) son estructuras lipoproteicas enriquecidas en ácidos grasos polinosaturados principalmente docosahexaenoico (22:6n3). Este entorno fluido, que permite los cambios conformacionales de la rodopsina durante el proceso visual, hace a estas membranas susceptibles al ataque por radicales libres. El propósito de este trabajo fue estudiar la lipoperoxidación no enzimática, inducida por Fe(+2)-ascorbato, de membranas ROS de retina equina. El proceso se monitoreó por quimioluminiscencia (QL) midiéndose cpm cada 10 minutos durante 180 minutos. El daño oxidativo producido sobre los lípidos se analizó por cromatografía gaseosa. Las curvas de QL en función del tiempo en las muestras peroxidadas alcanzan un pico máximo de 221.515 ± 10.719 cpm a los 80 minutos, retornando a los valores basales a los 180 minutos. La composición de ácidos grasos de membranas ROS equinas muestra un elevado porcentaje de ácidos grasos polinosaturados, principalmente 22:6n-3 ($20,55 \pm 3,341$ %). El proceso de lipoperoxidación produjo un marcado descenso de éste ácido graso, con el concomitante incremento porcentual de ácidos grasos saturados. Los resultados observados nos permiten concluir que los fotorreceptores equinos son altamente sensibles al daño oxidativo sugiriendo que los antioxidantes podrían utilizarse como herramientas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del segmento posterior del ojo equino.

- 419. (12311) EFECTO DEL GLAUCOMA SOBRE EL SISTEMA GABAÉRGICO RETINIANO.** MORENO, CECILIA; DE ZAVALÍA, NURIA; GOLDIN, ANDREA; KELLER SARMIENTO, MARÍA I; ROSENSTEIN, RUTH ESTELA

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Bioquímica Humana

En la retina de vertebrados, el GABA (ácido gama-amino-butírico) y el glutamato son los principales neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, respectivamente. Por lo tanto, el ajustado balance entre ambas señales es un aspecto clave en la organización de la función retiniana. Si bien la excitotoxicidad por glutamato es una de las principales causas del daño de las células ganglionares en el glaucoma, la actividad GABAérgica retiniana no ha sido analizada en esta patología. El objetivo de este trabajo fue estudiar el sistema GABAérgico retiniano en ojos con hipertensión ocular inducida por la inyección de ácido hialurónico (AH). Para ello, se inyectaron semanalmente ratas con AH en la cámara anterior de un ojo y el ojo contralateral se inyectó con vehículo. Luego de 3 y 6 semanas de hipertensión ocular se estudiaron los siguientes parámetros: el turnover de GABA (por el método de radioreceptor), la actividad de glutámico descarboxilasa (GAD) (utilizando 1-(14)C-glutamato) y el uptake y la liberación de GABA (usando (3)H-GABA). Asimismo, se analizó la unión específica de t-butilbiciclofosforotionato (TBPS) usando (35)S-TBPS. Luego de 3 semanas de hipertensión ocular, el turnover de GABA y la actividad de GAD disminuyeron significativamente (** $p < 0.01$). La liberación de GABA inducida por glutamato y por alto K(+) disminuyó (* $p < 0.05$) y el uptake de GABA aumentó significativamente en ojos tratados con AH (** $p < 0.01$). La unión de TBPS aumentó luego de 3 semanas de hipertensión (** $p < 0.01$). Los cambios en el uptake y la liberación de GABA así como en el binding de TBPS persistieron a las 6 semanas de hipertensión ocular (** $p < 0.01$). Estos resultados demuestran por primera vez, una alteración significativa en la actividad GABAérgica retiniana en ojos con glaucoma experimental. Teniendo en cuenta que estos cambios preceden las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la hipertensión ocular, estos resultados podrían vincular causalmente al GABA con el desarrollo de la neuropatía glaucomatosa.

- 420. (12335) ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS SUBTIPOS DE MALFORMACIONES DEL DESARROLLO CORTICAL (MDC).** PAPAYANNIS, CRISTINA; SILVA, WALTER; CONSALVO, DAMIÁN; KAUFFMAN, MARCELO; ODDO, SILVIA; GIAGANTE, BRENDA; SAIDÓN, PATRICIA; KOCHEN, SILVIA

Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía

Antecedentes: Las MDC son alteraciones estructurales cerebrales secundarias a una falla en el desarrollo embriológico. Son la segunda causa de epilepsia refractaria en adultos. El pronóstico post quirúrgico no es bueno y el manejo de estos pacientes es a veces dificultoso. Objetivos: Se compararon características clínicas, epidemiológicas y EEG de los distintos subtipos de MDC. Métodos: Se dividieron a los pacientes con epilepsia secundaria a MDC en 3 grupos: Grupo 1: anormal proliferación (Displasia cortical focal y Neoplásias), Grupo 2: anormal migración (Heterotopías), Grupo 3: anormal organización (Polimicrogirias y Esquizencefalías). Se analizaron: sexo, edad media (EM), tiempo de seguimiento medio (TS), edad primer crisis (EPC), antecedentes personales (AP), antecedente familiar de epilepsia (AF), retraso mental (RM), déficit neurológico (DN), refractariedad, presencia de discordancia clínica-EEG interictal-imagen (discordancia). Resultados: 80 pacientes en total. G1 (n=40): mujer 42.5%, EM 34,4 años; TS 45.9 meses; EPC 13.9 años; sin AP 62.5%, AF 12.5%, RM: 20%, DN 7.5%, refractariedad 80%, discordancia 12.5%. G2 (n=24): mujer 75%, EM 34.5 años; TS 52.2 meses; EPC 12.0 años; sin AP 75%; AF 4.2%, RM 25%; DN 8.3%; refractariedad 95.8%, discordancia 16.7%. G3 (n=16): mujer 43.7%; EM 29.9 años; TS 30.5 meses; EPC 11.9 años; sin AP

56.2%; AF 0%; RM 43.7%, DN 75%, refractariedad 87.5%, discordancia 31.2%. Dos variables alcanzaron diferencias estadísticamente significativas: la presencia de DN (mayor en G3, $p=0.0001$) y el sexo femenino (más frecuente en G2, $p=0.031$). Los subtipos de MDC presentan características clínicas y epidemiológicas similares, salvo la presencia de déficit neurológico y la distribución por sexo. Además encontramos un gradiente de discordancia menor en G1 y mayor el G3, coincidiendo con el peor pronóstico post-quirúrgico reportado en estos últimos. El estudio de las MDC, permitirá un mejor manejo de estos pacientes.

421. (12360) AURAS Y TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS EN EPILEPSIA PARCIAL. GIAGANTE, BRENDA; D'ALESSIO, LUCIANA; IBARRA, VIVIANA; ODDO, SILVIA; PATRICIA, SOLIS; CONSALVO, DAMIAN; SILVA, WALTER; CRISTINA, PAPAYANNIS; KAUFFMAN, MARCELO (1); SAIDON, PATRICIA; MELCON, CARLOS; KOCHEN, SILVIA (1)

(1) Centro de Referencias de Epilepsia. Div Neurología. Htal JM Ramos Mejía. Inst de Biología Celular y Neurociencias Prof Dr Eduardo De Robertis. CONICET. CEFYBO. UBA.

Introducción: Existe controversia en la literatura acerca de la asociación entre determinados tipos de auras con la presencia de trastornos psiquiátricos en pacientes con diagnóstico de epilepsia parcial. Objetivo: Analizar las auras presentes en pacientes con epilepsia parcial, y su asociación con la presencia de los principales trastornos psiquiátricos. Método: Se incluyeron 124 pacientes con diagnóstico de epilepsia parcial y evaluación psiquiátrica completa (entrevistas estructuradas del DSM IV, SCID I y II). Se analizó la presencia de Trastornos Afectivos, Trastornos de la Personalidad y Psicosis y se relacionó con la presencia de los diferentes tipos de auras, y el lado de origen de las crisis. Las auras fueron clasificadas en 9 categorías. Se utilizó Test de Regresión Logística para el análisis estadístico (SSPS version 12) Resultados: 104 pacientes presentaban aura. Las auras más frecuentes fueron: experiencial y viscerosensorial. Localización de la ZE: 105 p. temporal, 16 p frontal, y 3 p occipito-parietal; 43 p presentaron ZE del lado derecho y 56 p del lado izquierdo. Ciento-dieciséis p. tenían antecedentes o presencia actual de al menos un trastorno psiquiátrico para las categorías psiquiátricas analizadas. Los pacientes con Trastornos Afectivos presentaron mayor frecuencia de aura experiencial (miedo/angustia) ($p<0.05$), y de ZE derecha ($p<0.05$). Los pacientes con Psicosis presentaron mayor frecuencia de aura céfalica ($p<0.05$), y ausencia significativa de otros tipos de aura ($p<0.05$). Los pacientes con Trastornos de Personalidad no presentaron asociación con algún tipo de aura. Conclusión: En el presente estudio encontramos diferencias entre los tipos de aura observados y la presencia de trastornos psiquiátricos. El tipo de aura "miedo/angustia" se asoció a la presencia de trastornos afectivos, y la presencia de "aura céfalica" se asoció a Psicosis.

422. (12392) CAMBIOS TEMPRANOS EN LA EXPRESIÓN DE ÓXIDO NITRICO EN RETINA DE RATAS ASFICTICAS. REY FUNES, MANUEL E. (2); CAPANI, FRANCISCO (1); RODRIGO, JOSÉ(3); BOTTI, VALERIA (2); SARACENO, EZEQUIEL (1, 2); LOIDL, CÉSAR FABIÁN (1); COIRINI, HÉCTOR (2)

Dept. Bioquímica Humana - Facultad de Medicina - UBA. (1) IBCyN "Prof. E. De Robertis" - (2) Instituto de Biología y Medicina Experimental - (3) Instituto Cajal, Madrid España

En estudios previos hemos observado, en ratas de 60 días, alteraciones retinianas inducidas por asfixia perinatal (AP), las cuales son similares a las observadas en la fase II de la retinopatía de la prematuridad. Otros estudios de nuestro grupo han revelado que el óxido nítrico (NO) es un importante agente neurotóxico en retina asfícticas de 60 días. Sin embargo poco se sabe acerca de la expresión del NO a corto plazo. Con el objeto de evaluar los cambios tempranos del NO, se estudió en retinas de ratas ma-

chos de 21 días de edad sometidas a AP en normotermia (37°C) o en hipotermia (15°C), la inmunoreactividad de la forma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS) así como la nitración de proteínas, indicador de la formación de peroxinitrosos, y por lo tanto de neurotoxicidad por NO, utilizando un anticuerpo anti-nitrotirosina. Las secciones fueron evaluadas por análisis de imágenes computarizado. En todos los grupos se observó inmunoreactividad positiva para nNOS sobre neuronas amácrinas y ganglionares. El grupo AP mostró un aumento de aproximadamente un 30% en la densidad óptica relativa ($p < 0.01$) en ambos tipos de neuronas en comparación con las de los animales controles. En el grupo AP se observó además mayor inmunoreactividad para nitrotirosina en las células ganglionares, que son las que había mostrado mayores signos de neurodegeneración en animales AP de 60 días. Todos los efectos observados en retinas AP no fueron observados en los animales con el tratamiento hipotérmico. Estos resultados sugieren que la AP desencadena cambios neurotóxicos en la retina mediados por el NO, los cuales se manifiestan tempranamente. La hipotermia durante la asfixia disminuye la acción nociva de NO evitando el desarrollo de este tipo de patologías, por lo que el desarrollo de técnicas similares podrían ser utilizarlas como una terapéutica eficaz. (UBACYT- M020)

423. (12442) EFECTO DE LA ALFA-MSH SOBRE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LPS + INF-GAMMA EN ASTROCITOS. DURAND, DANIELA; CARUSO, CARLA; REY, RODOLFO; SEILICOVICH, ADRIANA; LASAGA, MERCEDES

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA

La hormona melanocito estimulante alfa (alfa-MSH) es un péptido que presenta acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras. En este estudio investigamos el efecto de la alfa-MSH sobre la apoptosis inducida por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) e interferón-gamma (INF-g) en cultivos de astrocitos de rata. El tratamiento por 24 h con LPS (1 µg/ml) + INF-g (50 ng/ml) produjo un aumento en el porcentaje de astrocitos TUNEL-positivos, que fue atenuado por alfa-MSH (5 µM) (Control: 1.25%, LPS+INF-g: 12.78%, $p<0.01$, LPS+INF-g+alfa-MSH: 8.80%, $p<0.01$ vs Control y $p<0.05$ vs LPS+INF-g). La combinación LPS + INF-g aumentó la actividad de caspasa 3 mientras que la presencia de alfa-MSH revirtió este aumento (Control: 0.370 ± 0.0267 , LPS+INF-g: 0.501 ± 0.0312 , $p<0.05$ y LPS+INF-g+alfa-MSH: 0.381 ± 0.045 OD/ng proteína). Alfa-MSH (5 µM) per se no modificó el número de astrocitos TUNEL-positivos ni la actividad de Caspasa 3. Además, el LPS + INF-g incrementó la expresión de la proteína proapoptótica Bax un 60%, mientras que disminuyó los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en un 78% determinados por Western Blot. La alfa-MSH (5 µM) no modificó la expresión de Bax, pero aumentó 2 veces la expresión de Bcl-2. Por otra parte, el tratamiento con LPS + INF-g o con alfa-MSH no modificaron la expresión génica del receptor Fas. Estos resultados indican que la alfa-MSH puede atenuar la apoptosis inducida por LPS + INF-g en astrocitos por un mecanismo relacionado con el balance de proteínas de la familia Bcl-2.

424. (12457) EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LAS ALTERACIONES FUNCIONALES E HISTOLÓGICAS EN UN MODELO DE UVEITIS EXPERIMENTAL. SANDE, PABLO HORACIO; ALDANA MARCOS, HERNÁN; SALIDO, EZEQUIEL; CHIANELLI, MÓNICA; ROSENSTEIN, RUTH; SÁENZ, DANIEL

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, U.B.A

La uveítis es un proceso inflamatorio que afecta la úvea y puede extenderse a la retina, provocando un déficit de la función visual. Hemos desarrollado un modelo de uveítis en el hámster inducido por la inyección intravítrea de lipopolisacárido bacteriano

(LPS). La melatonina (Mel) es un potente antioxidante e inhibidor del sistema nitrérgico retiniano. El aumento en los niveles de NO y el daño oxidativo podrían ser factores causales en la uveítis. En este trabajo se examinó el efecto de la Mel sobre las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por la inyección de LPS. Para ello, se examinó el efecto de un pellet subcutáneo de 20 mg de Mel sobre los signos clínicos (hiperemia conjuntival, alteraciones de vasos episclerales, córnea, iris, cristalino y segmento posterior) asignándole una puntuación a cada uno. Para la función retiniana, se registraron las amplitudes de las ondas a y b del electroretinograma (ERG) escotópico. Asimismo, se analizó por microscopía óptica la morfología retiniana. Los resultados descriptos en la Tabla indican que el efecto producido por el LPS evaluado por el score clínico (LPS vs Mel+LPS, $p < 0.05$, test de Mann Whitney) y el ERG fue revertido parcialmente por la Mel. (LPS vs Mel+LPS, $p < 0.01$, Tukey). En cuanto al análisis morfológico los cortes histológicos mostraron una menor infiltración leucocitaria y ausencia de hemorragia en los ojos con Mel +LPS con respecto a los ojos con LPS.

	control	LPS	Mel	Mel+LPS
amplitud onda a / b	128±6 / 293±8	69±9 / 232±18	116±9 / 251±16	134±6 / 296±10
score clínico	0.50±0.16	6.12±0.49	0.17±0.12	4.57±0.43

Estos resultados indican que la melatonina disminuye las manifestaciones clínicas, funcionales e histológicas del proceso inflamatorio y por lo tanto podría constituir una nueva estrategia en la terapéutica de la uveítis.

425. (12464) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ÁCIDOS SIÁLICOS EN CEREBRO DE RATAS ADULTAS Y NEONATOS. MORALES, VANINA PAOLA; HIDALGO, ALEJANDRA; SANCHEZ, DANIEL; ARGIBAY, PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires

El cerebro es uno de los órganos con una expresión diferencial típica de algunos glicoconjugados, siendo reconocido el rol de estas estructuras en procesos fisiológicos (Ej. migración) y patológicos (Ej. epilepsia). En particular es característica la expresión de ácidos polisialícos. Sin embargo, no ha sido evaluada la presencia diferencial de ácidos siálicos no polimerizados característica de otras localizaciones. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión de sialiltransferasas (STs) sobre dos zonas del cerebro (corteza (Co) e hipocampo (Hc)) en dos etapas del desarrollo (adultos (Ad) y neonatos (Neo)). Los mensajes estudiados corresponden a STs que transfieren ácidos siálicos, una en unión a-2,3 a galactosa terminal usando como sustrato Galb1-3/4GlcNAcR (ST3G3) y la otra usando como sustrato aceptor a Gal a1-4GlcNAcR, haciendo una unión de tipo a-2,6 (ST6G1). Material y Métodos: Se extrajo ARN de cerebros de Ad y Neo. La expresión diferencial de ARN mensajeros se analizó a través de Northern blot (NB) y la presencia de ácido siálico se analizó directamente en cortes de cerebro por medio de inmunohistoquímica con la lectina WGA (Wheat Germ) en sus formas succinilada (sWGA) y natural (WGA) y la presencia específica de uniones en a-2,3 o a-2,6 a través de MAL (Maackia amurensis) y SNA (Sambucus nigra) respectivamente. Resultados Por NB observamos que ST6G1 se expresa exclusivamente en la Co de Ad. Por otra parte, ST3G3 se expresa en Hc y Co de Neo. A través de WGA se detectó la presencia de estructuras sializadas (WGA + y sWGA -) en Hc y Co tanto de Neo como de Ad. Sin embargo estas estructuras no parecen tener uniones a2,3 (MAL -), ni a2,6 (SAM -), sugiriendo algún tipo de regulación final de la sialización. La expresión diferencial de ambos genes en Ad y Neo sugiere un rol funcional diferente del producto de estas enzimas en dos etapas del desarrollo. Por otra parte la presencia de una estructura final diferente sugiere una glicosilación a través de complejos mecanismos de regulación.

426. (12513) DISFUNCIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES RETINIANAS INDUCIDA POR HIPERTENSIÓN OCULAR

CRÓNICA. DE ZAVALÍA, NURIA; MORENO, MARÍA CECILIA; GOLDIN, ANDREA; PLANO, SANTIAGO; GOLOMBEK, DIEGO; ROSENSTEIN, RUTH ESTELA

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana. Universidad Nacional de Quilmes

Evidencias recientes indican que una población de células ganglionares retinianas es intrínsecamente fotosensible (a través de la expresión de un fotopigmento específico, la melanopsina), y transmite la información luminosa que regula diversas respuestas no-visuales, como la sincronización del reloj biológico y el reflejo pupilar. En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un modelo de glaucoma experimental en ratas a través de la administración de ácido hialurónico (AH) en la cámara anterior del ojo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la hipertensión ocular crónica inducida por AH sobre la expresión de melanopsina, el reflejo pupilar y la expresión de cfoS en células ganglionares inducida por un pulso de luz. Para ello, se inyectaron ratas con AH (1 vez/semana, durante 10 semanas) en la cámara anterior de un ojo y vehículo en el ojo contralateral. En un grupo de animales, las inyecciones de AH o vehículo se realizaron bilateralmente. Tanto la expresión de melanopsina (determinada por Western blot) como la velocidad y la magnitud de la contracción pupilar (evaluada por filmación digital) fueron significativamente menores en ojos tratados con AH respecto a los controles ($p < 0.01$). En animales con glaucoma bilateral, un pulso de luz (600 lux por 10 minutos) indujo una expresión de cfoS (analizada por inmunohistoquímica) significativamente menor que en animales control. Estos resultados demuestran que la hipertensión ocular crónica induce un déficit funcional significativo de células ganglionares retinianas. Asimismo, dada la participación de células ganglionares fotosensibles en la sincronización de ritmos circadianos, estos resultados podrían sugerir un vínculo significativo entre el glaucoma y la fisiología circadiana.

427. (12772) MAPEO INMUNOHISTOQUÍMICO CORTICAL EN EL CEREBRO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. DOPAZO, VALERIA (1); IELPI, MARCELO (2); ARGIBAY, PABLO

ICBME, Hospital Italiano de Bs As

El aumento en la expectativa de vida ha traído aparejado un aumento en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas. La enfermedad de Alzheimer (EA), es una de las enfermedades más prevalentes en pacientes añosos. Si bien se ha avanzado en la comprensión de la fisiopatología, no se ha establecido claramente el fenotipo celular y la arquitectura predominante en el cerebro de estos pacientes. Objetivo: presentar un mapa de los fenotipos celulares preponderantes en diversas regiones del cerebro en la EA. Materiales y métodos: bajo un programa de decisiones anticipadas consensuado con la familia del paciente, se desarrolló un proyecto de autopsia parcial de pacientes fallecidos diagnosticados como EA. Los cerebros mantenidos a 4°C, fueron procesados para ser estudiados a través de técnicas de inmunohistoquímica. Se estudiaron diversas regiones corticales (Frontal, Occipital, Temporobasal, Hipocampo) a través de anticuerpos específicos para: Nestina (Ne) (progenitores neurales), B III tubulina (neuronas inmaduras), Ki67 (neurogénesis), GFAP (glía), NeuN (neuronas maduras), Neuricam (redes perineuronales). Como controles se utilizaron preparados histológicos obtenidos de material quirúrgico. Resultados: En las diferentes regiones estudiadas se observó negatividad para Ne, BIII y Ki67. Incluso el hipocampo, región en la que en los controles se han encontrado células con doble tinción Ki67-BIII indicadoras de procesos neurogenéticos, en los cortes de EA la marca fue negativa tanto para BIII como para Ki67. En relación a la tasa de NeuN/GFAP, se observó una diferencia significativa por campo (20% Vs. 80%, $p < 0.05$, Z test), en todas las regiones de EA versus los controles. En los cerebros de EA se observó una doble marca NeuN-NuCam esporádica contrastando con la presencia de esta marca en los controles. Conclusión: El cerebro de EA presenta un pa-

trón específico de expresión de proteínas caracterizado por un desbalance de la relación NeuN-GFAP, la ausencia de neurogénesis y gliogénesis y una disminución en la matriz celular.

PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR

- 428. (11878) MENADIONA Y CALCITRIOL: POTENCIACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CELULAS TUMORALES DE MAMA.** PICOTTO (1), GABRIELA; MARCHIONATTI (1), ANA MARÍA; NARVAEZ (2), CARMEN; WELSH (2), JOELLEN; TOLOSA (1), NORI

(1) *Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.* (2) *Dep. of Biological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, USA*

El 1,25 dihidroxi-vitamina D₃ (1,25D) inhibe el crecimiento e induce apoptosis en células de cáncer de mama mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En estudios previos se demostró que la menadiona (MEN) produce depleción de los niveles de glutatión reducido (GSH) y aumenta ROS, potenciando así el efecto de otras drogas antitumorales. El objetivo de este trabajo fue investigar si MEN modifica la respuesta a la apoptosis inducida por 1,25D en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Las células fueron incubadas en presencia de 1,25D (100 nM), MEN (5 mM) o vehículo en el medio de cultivo (DMEM, 5 % FBS) durante 24 horas. El crecimiento celular se determinó por la técnica de violeta de cristal; la producción de ROS por citometría de flujo y las actividades de superóxido-dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), por espectrofotometría. Ambos compuestos inhibieron el crecimiento celular. El efecto conjunto (1,25D + MEN) resultó aditivo. La producción de ROS también aumentó. Este efecto se acompañó de un incremento transitorio de las actividades enzimáticas de SOD y GPx. En conclusión, MEN potencia el efecto inhibitorio del calcitriol sobre el crecimiento celular en la línea MCF-7 en parte por mecanismos moleculares propios del stress oxidativo, desencadenando además un incremento de las enzimas involucradas en las defensas antioxidantes como mecanismo compensatorio.

- 429. (11974) RESPUESTA DE CÉLULAS DEFICIENTES EN SISTEMAS DE REPARACIÓN DE ADN A RADIACIONES IONIZANTES DE DIFERENTE TRANSFERENCIA LINEAL DE ENERGÍA (LET).** MAGLIOCO, A(1); MOLINARI, B(1); DURÁN, H(1); KREINER, A(1); BURLÓN, A(1); MINSKY, D(1); PALMIERI, M(2); VALDA, A(3); DAVIDSON, J(1); DAVIDSON, M(1); DEBRAY, M(1); KESQUE, J(1); SOMACAL, H(3); OZAFRÁN, M(1); VÁZQUEZ, M(1)

(1) *Departamento de Radiobiología y Departamento de Física, Comisión Nacional de Energía Atómica.* (2) *Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.* (3) *Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Martín.*

Las diferencias en la reparación del daño por radiación en distintas células es un factor importante para determinar el éxito o el fracaso en radioterapia clínica. Las radiaciones ionizantes emitidas por distintas fuentes producen efectos variables en células con distinta radiosensibilidad. En este trabajo se estudió la respuesta de células con diferente radiosensibilidad sometidas a radiaciones de LET variable. Las células IRS-20, derivan de su parental CHO y presentan alteraciones en los mecanismos de reparación del daño radioinducido al ADN. Se realizaron análisis clonogénicos y de inducción de apoptosis irradiando con Cs(137) (LET 0,2 KeV/μ) y con protones generados por el acelerador TANDAR (plateau LET 3,4 KeV/μ y pico de Bragg LET 14 KeV/μ). Se analizó la sobrevida de células CHO e IRS-20 irradiadas con dosis crecientes de radiación gamma (0-10 Gy) y protones (0-5 Gy en plateau y pico de Bragg) utilizando el modelo lineal-

cuadrático. Si bien ambas líneas mostraron una sobrevida dosis-dependiente, cuando se prolongó el tiempo de cultivo pre-irradiación (4-12 hs) se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) en la sobrevida de las células CHO con respecto a las células IRS-20, deficientes en reparación. Se observaron aumentos significativos en la fracción de células apoptóticas en la línea IRS-20 con respecto a CHO ($p < 0,01$) luego de dosis crecientes de radiación gamma. Al comparar los porcentajes de células apoptóticas obtenidas al someter células CHO a los tres tipos de radiación mencionados, se encontraron diferencias significativas entre ellos ($p < 0,03$). Esta diferencia no fue hallada en el mismo ensayo con las células IRS-20. Este modelo experimental permitió caracterizar la respuesta diferencial a radiaciones de distinto LET entre las células CHO y su mutante radiosensible IRS-20.

- 430. (12181) SUSTANCIAS OXÍGENO REACTIVAS (ROS) Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS AISLADOS DE RATAS CON CIRUGÍA SIMULADA (SH) Y HEPATECTOMÍA PARCIAL (HP).** FRANCÉS, DANIEL; OCHOA, ELENA; ALVAREZ, LUJÁN; QUIROGA, ARIEL; PARODY, JUAN P; MONTI, JUAN; CARRILLO, CRISTINA; RONCO, M TERESA; CARNOVALE, CRISTINA

Instituto de Fisiología Experimental - CONICET - Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - U.N.R.

En trabajos "in vivo", demostramos que a la hora post-HP existe en el hígado remanente un aumento de ROS. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la producción de ROS y la capacidad antioxidante en cultivos primarios de hepatocitos aislados de Sh y HP. Ratas Wistar machos adultos fueron sometidas a HP (65%) o Sh (n=5 c/grupo). 1h post-cirugía se obtuvieron hepatocitos aislados por el método de perfusión con colagenasa y se sembraron. Se determinaron a 1, 3, 18 y 24 h de cultivo: contenido de ROS (método de fluorescencia utilizando 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína), glutatión oxidado (GSSG, método Tietze) y actividades enzimáticas de superóxido dismutasa (SOD, método Beauchamp-Fridovich, expresado como % del Sh considerado el 100%) y catalasa (Cat, método Beers-Sizer, en UI/mg de prot.). * $p < 0,05$ vs el correspondiente Sh.

	1 hora		3 h		18 h		24 h	
	Sh	HP	Sh	HP	Sh	HP	Sh	HP
ROS	555,9±99,8	601,7±65,1	532,3±19,8	567,7±45,5	367,8±49,6	542,9±34,8*	292,9±49,8	566,5±85,5*
% GSSG			1,87±0,29	3,46±1,07			2,75±0,20	10,87±0,60*
% SOD	100	96,0±3,9	100	98,6±1,5	100	97,2±5,9	100	117,5±2,1*
Act. Cat.	406,6±25,3	419,4±33,3	436,3±54,9	421,0±70,1	382,2±35,8	460,8±17,1	415,8±23,6	620,1±67,1

A 1 y 3 h no existen diferencias entre hepatocitos Sh y HP lo cual podría deberse al estrés producido por la técnica de obtención. A 18 h comienza una diferenciación entre hepatocitos Sh y HP (sólo en ROS), que se manifiesta en su totalidad a las 24 h (ROS, GSSG y SOD), sugiriendo que a este tiempo de cultivo primario los hepatocitos expresan una diferenciación debida a HP, pudiendo utilizarse en estudios del proceso de regeneración.

- 431. (12203) EFECTO PROAPOPTÓTICO DE ESTREN SOBRE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS.** ZÁRATE, SANDRA; JAITA, GABRIELA; ZALDIVAR, VERÓNICA; RADL, DANIELA; PISERA, DANIEL; SEILICOVICH, ADRIANA

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que los estrógenos sensibilizan a las células adenohipofisarias a estímulos proapoptóticos como el TNF-alfa, el LPS o el FasL. También hemos demostrado el efecto proapoptótico por se del estradiol (E2) sobre somatotropos. En el presente trabajo investigamos el efecto de estren (4-estren-3a,17β-diol), un ligando sintético del receptor para estrógenos que no posee actividad transcripcional clásica. Evaluamos el porcentaje de hipodiploidía (determinado por citometría de flujo) en cultivos de células adenohipofisarias de ratas hembras ovariectomizadas (OVX) incubadas en presen-

cia de E2 (10-9M) o estren (10-7M). Ambos compuestos aumentaron el porcentaje de células hipodiploides totales (C: 4.2%, E2: 28.4%, estren: 39.3%, $p < 0.01$, ANOVA) como así también el porcentaje de somatotropos en sub-G1 (C: 5.1%, E2: 29.9%, estren: 40.8%, $p < 0.05$ ANOVA). Para corroborar estos resultados, determinamos la apoptosis de células adenohipofisarias provenientes de cultivos primarios de ratas OVX incubadas en presencia de E2 o estren por la técnica de TUNEL. El estren indujo apoptosis en dichas células (C: 0.8%, estren: 2.1%, $p < 0.05$, Chi, $n > 874$) También observamos un aumento no significativo de somatotropos apoptóticos (identificados por inmunofluorescencia) cuando las células fueron incubadas en presencia de estren (C: 2.5%, estren: 5.7%, $p = 0.0653$, Chi, $n > 201$). Estos resultados indican que el estren induce apoptosis de somatotropos y sugieren que el efecto proapoptótico del estradiol en células adenohipofisarias podría estar mediado al menos en parte por mecanismos no genotrópicos.

432. (12223) INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR DOS VÍAS INDEPENDIENTES MEDIADA POR GALECTINA-1 EN CÉLULAS TUMORALES DE LEYDIG. BIRON, VA(1); TRONCOSO, MF(1); BESIO-MORENO, M(2); PIGNATARO, OP(2); IGLESIAS, MM(1); WOLFENSTEIN-TODEL, C(1)

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Lab. De Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, IByME-CONICET

Previamente demostramos que la galectina-1 (Gal-1), lectina que ejerce control sobre la proliferación y muerte celular, afecta la viabilidad de las células de Leydig normales y la línea tumoral MA-10 (cLMA-10). Demostramos además que Gal-1 (400 $\mu\text{g/ml}$) induce apoptosis en las cLMA-10, dado que el tratamiento con Gal-1 aumenta la actividad de caspasa-3 (170.6 \pm 13.8%, 24h, $p < 0.01$; método fluorométrico) e incrementa el porcentaje de células con núcleos apoptóticos (14.2 \pm 0.5 vs 33.0 \pm 4.1, $p < 0.01$; citofluorometría). Con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares de dicho efecto, estudiamos la participación de la vía intrínseca en la inducción de apoptosis. La incubación con Gal-1 aumentó significativamente el porcentaje de células con pérdida del potencial de membrana mitocondrial (42.4 \pm 3.0%, 6 hs, $p < 0.01$; tinción con el fluorocromo DiOC6), seguido de un incremento en el contenido citosólico de citocromo c (155.5 \pm 12.1%, 6 hs, $p < 0.01$; 447.5 \pm 15.2%, 12 hs, $p < 0.001$; WB) y un aumento en la actividad de caspasa-9 (271.3 \pm 4.2%; 8 hs, $p < 0.01$; método fluorométrico). Por otra parte, evaluamos la activación de la apoptosis por la vía extrínseca. El tratamiento con Gal-1 resultó en un aumento en la actividad de caspasa-8 (243.2 \pm 15.5%, 8 hs, $p < 0.01$; método fluorométrico), mientras que no detectamos la presencia de la principal molécula adaptadora, FADD, en células controles o tratadas con Gal-1 (WB). Finalmente, evaluamos si ambas vías se activaban en forma independiente. El ensayo de fragmentación del DNA reveló que, si bien Gal-1 aumentó significativamente el porcentaje de células con núcleos apoptóticos, la presencia del inhibidor específico de caspasa-8 o caspasa-9 inhibió sólo parcialmente el efecto de Gal-1 (24.2 \pm 0.6% o 25.3 \pm 1.2%, respectivamente, $p < 0.05$). Los resultados sugieren que Gal-1 afecta la viabilidad de las cLMA-10 por inducción de la apoptosis activada tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca de la apoptosis, en forma independiente.

433. (12224) PARTICIPACIÓN DE TP53INP1 Y BAX EN LA APOPTOSIS DE GLÁNDULAS SALIVALES DE RATONES NOD. CALAFAT, MARIO; LAROCCA, LUCIANA; ROCA, VALERIA; PREGI, NICOLÁS; NESSE, ALCIRA; DUSSETTI, NELSON; PEREZ LEIROS, CLAUDIA

Depto Qca. Biológica FCEN-UBA. CONICET. INSERM U.624, Marsella, Francia

Los ratones NOD (non obese diabetic) constituyen un modelo adecuado de la sintomatología sicca característica del Síndrome de Sjogren. Estos ratones desarrollan a partir de las 12 semanas

una sialadenitis espontánea con pérdida de la función secretoria. En trabajos anteriores demostramos que la pérdida de la función secretoria esta asociada a una menor actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en glándulas submaxilar y parotida de ratones NOD. El gen TP53INP1 codifica dos proteínas TP53INP1alfa y TP53INP1beta. La expresión de este gen se encuentra incrementada durante el estrés celular. Se ha demostrado que TP53INP1alfa y beta regulan la actividad transcripcional de p53 sobre los promotores de bax, p21 PIG3 y mdm2. La sobre expresión de TP53INP1 en diferentes líneas celulares induce apoptosis, sugiriendo una participación de este gen en la muerte celular mediada por p53. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de fenómenos apoptóticos en la disfunción secretoria y el rol de p53 y bax en este efecto. Utilizamos hembras NOD de 16 a 20 semanas, determinamos la expresión de bax y Trp53 por western blot y RT-PCR y evaluamos la apoptosis por el método de Hoechst y ladder en acinos aislados de glandula submaxilar (SM) y parótida (P). Se usaron ratones BALB/c como control. En glándulas SM y P de ratones NOD con una menor actividad de la NOS observamos un aumento de la apoptosis en acinos (% células apoptóticas $X \pm ES$: SM NOD= 27,5 \pm 0.9; SM BALB/c= 7,3 \pm 1.4; $P < 0.05$. P NOD=38.4 \pm 4.5; P BALB/c= 10.0 \pm 0.5; $P < 0.01$) asociado a un aumento en la expresión del RNAm y proteína de TP53INP1 y bax en ambas glándulas de ratones NOD. Las glándulas submaxilares y parotidas de ratones NOD presentan un aumento en la apoptosis asociado a una mayor expresión de bax y TP53INP1 y una menor actividad de NOS.

434. (12229) EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 EN LAS CÉLULAS TUMORALES DE LEYDIG. EFECTO PROLIFERATIVO Y MODULACIÓN DE LA ADHESIÓN. BIRON, VA(1); TRONCOSO, MF(1); BESIO-MORENO, M(2); PIGNATARO, OP(2); IGLESIAS, MM(1); WOLFENSTEIN-TODEL, C(1)

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Lab. De Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, IByME-CONICET

Las células de Leydig (cL) son las responsables de la producción de testosterona, esencial para la correcta maduración de las células germinales. Los niveles circulantes de testosterona dependen del número y la capacidad esteroideogénica de las cL. Anteriormente demostramos que la galectina-1 (Gal-1), proteína con afinidad por β -galactósidos que ejerce control sobre el crecimiento y muerte celular, disminuye la viabilidad a altas dosis (400 $\mu\text{g/ml}$) por inducción de apoptosis en las cL tumorales MA-10 (cLMA-10). Los objetivos de este trabajo son estudiar la expresión y distribución subcelular de Gal-1 y evaluar un posible efecto bifásico de Gal-1 sobre la viabilidad y adhesión en las cLMA-10. Detectamos por inmunofluorescencia e inmunocitometría que Gal-1 se expresa significativamente en el citoplasma de las cLMA-10 (intensidad de fluorescencia media: control: 2.19 \pm 0.25 vs Gal-1: 6.80 \pm 0.86, $p < 0.01$), mientras que no se halla presente en la membrana plasmática ni a nivel nuclear. Por otro lado, evaluamos el efecto de Gal-1 a menores dosis (0.5-2 $\mu\text{g/ml}$) por recuento con azul tripan. A estas concentraciones, Gal-1 aumentó el número de células en cultivo, alcanzando un efecto proliferativo máximo luego de 48 hs de incubación con Gal-1 (1 $\mu\text{g/ml}$) (130.7 \pm 5.4%, $p < 0.01$). Además, la presencia de lactosa (ligando específico) fue capaz de inhibir la proliferación mediada por Gal-1. A estas dosis, Gal-1 no produjo diferencias significativas en el porcentaje de células con núcleos apoptóticos (citofluorometría). Finalmente, estudiamos la adhesión celular por ensayo con cristal violeta. Mientras que Gal-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) aumentó muy significativamente la adhesión (184.5 \pm 15.1%, 1 hs, $p < 0.005$), la presencia de altas dosis de Gal-1 (400 $\mu\text{g/ml}$) resultó en un efecto inhibitorio sobre la misma (46.7 \pm 13.1%, 1 hs, $p < 0.001$). Estos datos indican que Gal-1, proteína presente en las cLMA-10, podría ser un nuevo modulador del crecimiento y la adhesión celular.

435. (12233) LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO ES UN PASO CLAVE EN LA CASCADA

APOPTÓTICA INDUCIDA POR ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. MACHIAVELLI, LETICIA; QUINTEROS, FERNANDA; POLIANDRI, ARIEL; CABILLA, JIMENA; DUVILANSKI, BEATRIZ

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET

Previamente demostramos que el óxido nítrico (NO) induce apoptosis en células adenohipofisarias y que este efecto es sólo parcialmente revertido por inhibidores de caspasas, sugiriendo la participación de otros mecanismos. Existen evidencias de que el NO inhibe la cadena respiratoria mitocondrial promoviendo la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y que éstas juegan un papel importante en el mecanismo apoptótico. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del NO sobre la producción de ROS y su relación con la inducción de apoptosis en células adenohipofisarias en cultivo. Como dador de NO se utilizó DETANONOato 1 mM (DETA). El NO provocó un aumento rápido y transitorio de las ROS (medido por FACS con la sonda DHR123), alcanzando un máximo a las 3 h (143% del control). El NO incrementó la actividad de caspasa 3 a las 12 h (técnica colorimétrica; Abs/mg prot; 234 ± 2 % del control, $p < 0.05$). El NO afectó el potencial de la membrana mitocondrial recién a las 24 h de tratamiento (51% del control; medido por FACS con la sonda DiOC[6]). La apoptosis inducida por NO fue casi completamente revertida con N-acetil-cisteína 5 mM (NAC), antioxidante precursor del glutatión (análisis por FACS con Anexina V + IP; % células apoptóticas; control: 6 ± 1 ; DETA: 38 ± 1 , $p < 0.001$ vs. control; NAC: 9 ± 0.1 ; DETA + NAC: 14 ± 3 , $p < 0.001$ vs. DETA, $p < 0.05$ vs. control). El NO inhibió la actividad de la catalasa (método enzimático, act. enz./mg prot; % del control; 2 h: 20 ± 4 ; 8 h: 21 ± 1 ; 20 h: 14 ± 2 ; $p < 0.01$). Estos resultados sugieren que el incremento de ROS constituye un evento temprano clave en la cascada apoptótica inducida por el NO en las células adenohipofisarias. La alteración del sistema de defensa antioxidante celular, causada por el NO, podría potenciar su efecto deletéreo. La disrupción del potencial de membrana mitocondrial parece no formar parte de los eventos tempranos disparadores del proceso apoptótico.

436. (12249) BAX ALFA MODULA LA VÍA APOPTÓTICA MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS GERMINALES (CG) EN LA ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE). THEAS, MARÍA SUSANA; RIVAL, CLAUDIA; GUAZZONE, VANESA; JACOBO, PATRICIA; LUSTIG, LIVIA

Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. UBA.

En la OAE previamente demostramos que las vías externa y mitocondrial están involucradas en la apoptosis de las CG mediante la activación de las caspasas 8, 9 y la liberación del citocromo c. Bax beta (24kDa) y Bax alfa (21kDa) son las isoformas citosólica y traslocable a membrana respectivamente, de la proteína proapoptótica Bax. En la OAE demostramos expresión de Bax en las CG (inmunohistoquímica) y un aumento del contenido de Bax beta (Western Blot, Wb). Dado que también detectamos expresión de Bax alfa (Wb) nos propusimos estudiar el rol de esta proteína en la regulación de la apoptosis. Ratas macho fueron inmunizadas con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo OAE) o sólo con adyuvantes (grupo control, C). La expresión de Bax alfa fue estudiada por Wb en homogenado de testículo total (HTT) y de las fracciones citosólica (FC), mitocondrial (FM) y de retículo endoplasmático (FRE). El contenido del citocromo c fue determinado por Wb en la FC y en la FM. El contenido de Bax alfa en el HTT fue similar en las ratas C y con OAE (C: 0.239 ± 0.015 , OAE: 0.290 ± 0.112 unidades arbitrarias de DO). Sin embargo, el contenido de Bax alfa disminuyó en la FC (C: 1.002 ± 0.002 , OAE: 0.780 ± 0.028 veces de incremento, $p < 0.01$) y aumentó en la FM (C: 1.000 ± 0.001 , OAE: 1.787 ± 0.499) y en la FRE (C: 0.966 ± 0.004 , OAE: 1.589 ± 0.084 $p < 0.01$) de ratas con OAE vs C. El contenido del citocromo c disminuyó en la FM (C: 1.000 ± 0.001 , OAE: 0.482 ± 0.151 $p < 0.05$) y aumentó en la FC (C: 1.066 ± 0.066 , OAE: 3.269 ± 1.152). La traslocación de Bax alfa

a la mitocondria y la liberación del citocromo c al citoplasma sugieren que Bax alfa modula la vía apoptótica mitocondrial en la OAE. El aumento de Bax alfa en el RE indica que esta proteína podría estar también involucrada en la apoptosis mediada por dicha organela.

437. (12275) EL CROMO VI INDUCE ESTRÉS OXIDATIVO Y REDUCE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. QUINTEROS, FERNANDA; MACHIAVELLI, LETICIA; POLIANDRI, ARIEL; CABILLA, JIMENA; DÍAZ, MARIA C; DUVILANSKI, BEATRIZ

Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires

Diversos estudios indican que el cromo VI (Cr VI) afecta el sistema reproductivo, sin embargo, se conoce poco sobre su acción a nivel hipofisario. Previamente, demostramos que el Cr VI induce apoptosis y disminuye la liberación de PRL y LH de células adenohipofisarias en cultivo. Nuestro objetivo fue investigar los mecanismos por los cuales el Cr VI afecta la viabilidad celular. El Cr VI (10 microM) produjo un aumento temprano de las especies reactivas del oxígeno (ROS), (FACS, % del control, 1 h: 134, 2 h: 342, 3 h: 280, 6 h: 150). Además, el Cr VI produjo peroxidación lipídica (TBARS) luego de 24 hs de tratamiento (nmoles MDA/mg de prot., control: 6.5 ± 0.5 , Cr VI: 10.25 ± 0.2 , $p < 0.01$ vs. control). La N-acetil cisteína (NAC), antioxidante y precursor del glutatión, revirtió tanto la disminución en la actividad celular (MTT, Abs 595 nm, % del control, Cr VI: 55.4 ± 3.3 , $p < 0.001$ vs. control; Cr VI + NAC 5 mM: 76.2 ± 3.1 , $p < 0.001$ vs. Cr VI) como la apoptosis inducida por el Cr VI (FACS, Anexina V-IP, % células apoptóticas, control: 9.8 ± 0.4 , Cr VI 9 h: 17.45 ± 2.3 , $p < 0.05$ vs. control, Cr VI + NAC 5mM: 11.4 ± 1.6 , $p < 0.05$ vs. Cr VI). El Cr VI produjo una disminución temprana y transitoria de la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) (método enzimático, activ. enz. (% de control); GPx: Cr VI 2 h: 36.8 ± 8.5 ; Cr VI 8 h: 60 ± 18.7 , * $p < 0.05$ vs. control; CAT: Cr 2 h: 63.86 ± 4.49 *; Cr VI 8 h: 83.22 ± 3.52 * $p < 0.05$ vs. control). Nuestros resultados sugieren que el estrés oxidativo producido por el Cr VI es un evento clave y temprano en la inducción de la apoptosis. El efecto inactivante del Cr VI sobre las enzimas antioxidantes contribuiría a la generación del estrés oxidativo y a la apoptosis.

438. (12292) ACCIÓN DE TNF-ALFA SOBRE CÉLULAS EN ETAPA DE DIFERENCIACIÓN ERITROIDE. VITTORI, DANIELA; GLADYS, PÉREZ; VOTA, DAIANA; NESSE, ALCIRA

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

La producción incrementada de citoquinas inflamatorias cumpliría un rol inhibitorio sobre la supervivencia de progenitores eritroides en la anemia de la enfermedad crónica. Para investigar la apoptosis mediada por receptores de muerte durante el proceso de diferenciación eritroide, se estudió el efecto de TNF-alfa (T) sobre las líneas celulares UT-7 (dependiente de eritropoyetina, E) y K562. En ambas, la diferenciación inducida por hemina (H) alcanzó valores de 86% de células hemoglobinizadas (DAF) y no afectó la viabilidad ni la proliferación celular. El T no indujo apoptosis sobre las células no diferenciadas. El tratamiento con H sensibilizó a las células K562 al efecto apoptótico de T (Hoechst) (H-T 37.6 ± 3.0 %; H 4.7 ± 0.5 %; $P < 0.002$), el cual fue incrementado por la inhibición de PI3K con Ly294002 (H-T-Ly 67.8 ± 2.4 %; H-Ly 14.2 ± 6.5 %; $P < 0.05$). La acción de T fue confirmada por neutralización con anti-T. En células UT-7 cultivadas con E e inducidas a diferenciación con H, sólo se observó apoptosis debida a T en presencia de Ly, la cual fue significativamente mayor a la debida a la inactivación de la señalización de E vía PI3K (E-H-Ly-T 92.2 ± 2.4 %; E-H-Ly 68.9 ± 5.3 %; $P < 0.01$). Los niveles de ARNm (RT-PCR) del factor antiapoptótico Bcl-x no se modificaron por ninguno de los tratamientos de las

líneas celulares. Los niveles de ARNm de c-FLIP, proteína supresora de señales apoptóticas inducidas por receptores de muerte, disminuyeron en células K562 diferenciadas, pero no en UT-7. Células con distinta dependencia de factores de crecimiento muestran diferente sensibilidad al efecto de citoquinas proinflamatorias bajo las mismas condiciones de diferenciación eritroide. La acción negativa de TNF-alfa sobre células K562 podría explicarse por la disminución de c-FLIP inducida durante la diferenciación eritroide, ya que no se observó apoptosis en células UT-7 con niveles inalterados de c-FLIP. Los mecanismos de protección celular frente a la acción de TNF-alfa estarían mediados por caminos de señalización vía PI3K y serían independientes de Bcl-x.

439. (12395) INFLUENCIA DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR FAS EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. JAITA, GABRIELA; FERRARI, LUCIANA; ZÁRATE, SANDRA; ZALDIVAR, VERÓNICA; PISERA, DANIEL; SEILICOVICH, ADRIANA

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Previamente hemos demostrado que tanto la expresión adenohipofisaria del sistema Fas/FasL como la apoptosis desencadenada por la activación del receptor Fas en células adenohipofisarias, en particular de lactotrofos, es mayor en proestro y dependiente de estradiol. En el presente trabajo, evaluamos el efecto proapoptótico de un anticuerpo agonista del receptor Fas (Mab-Fas) sobre somatotrofos y gonadotrofos (identificados por inmunocitoquímica) en cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas hembras Wistar. La activación del receptor Fas (Mab-Fas, 1µg/ml) indujo un incremento en el porcentaje de somatotrofos TUNEL positivos en cultivos de células adenohipofisarias provenientes de ratas sacrificadas en proestro (C: 5.8% Mab-Fas: 12.7% p<0.05, Chi) pero no en diestro. En cultivos de células adenohipofisarias provenientes de ratas ovariectomizadas (OVX), la activación del receptor Fas no produjo un incremento significativo del porcentaje de somatotrofos TUNEL positivos (C: 2.5% Mab-Fas: 4.7% ns, Chi). Sin embargo, cuando las células de ratas OVX fueron incubadas con 17β-estradiol (E2, 10-9M) la activación del receptor Fas incrementó el porcentaje de somatotrofos apoptóticos (C: 0.7% Mab-Fas: 6.5%; p<0.05, Chi) Cuando evaluamos la subpoblación de gonadotrofos, la activación del receptor Fas indujo un porcentaje de apoptosis mayor cuando las células de ratas OVX fueron incubadas con 17β-estradiol (OVX C: 0% OVX Mab-Fas: 7.7%; E2C: 0% E2 Mab-Fas: 25%). Estos datos sugieren que el sistema Fas/FasL estaría involucrado en los procesos de muerte celular por apoptosis no sólo de lactotrofos sino también de otras poblaciones celulares durante el ciclo estral.

440. (12557) PAPEL DEL METABOLISMO DE GLUCOSA EN LA REGULACIÓN DEL ENVEJECIMIENTO: LONGEVIDAD CRONOLÓGICA Y APOPTOSIS EN MUTANTES DE S. CEREVISIAE. FAVRE, C.; GUINOVART, J. (2); CARRILLO, M. C.

Instituto de Fisiología Experimental. CONICET-UNR. (2) Ingeniería Metabólica y Terapia de la Diabetes. Parque Científico de Barcelona, Universidad de Barcelona

En levadura, la extensión de la vida en la fase estacionaria no replicativa tras el agotamiento de nutrientes, se conoce como longevidad cronológica. Ésta depende de la resistencia al estrés oxidativo y resulta un modelo aceptado para el estudio del envejecimiento en tejidos de baja división celular y alta actividad metabólica, como el hepático o el nervioso. Las vías de señalización de la glucosa y del receptor de insulina están involucradas en la regulación del envejecimiento y han sido conservadas en diversos organismos. En este trabajo se comparó la longevidad de distintas cepas de *S. cerevisiae* mutantes nulas de enzimas del metabolismo de glucosa. MÉTODOS: Cepas BY4741 con deleciones de los genes en cuestión (provistas según Yeast

Deletion Project) se cotejaron con la salvaje respecto a: 1) Viabilidad en fase estacionaria al ser trasladadas de medio rico a agua (análisis citométrico con yoduro de propidio). 2) Evaluación de ROS y marcadores apoptóticos (actividad caspasa 1 y 3 y detección de anexina V-FITC). 3) Acumulación de glucógeno. RESULTADOS: Se estudiaron 16 deleciones de enzimas glucolíticas, gluconeogénicas y del metabolismo de glucógeno. Entre las mutantes que presentaron mayor longevidad respecto a las salvajes (p<0.05), se hallaron las deleciones de *gsy2*, *fbp1* y *hvk2*, homólogas a glucógeno sintasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, y hexoquinasa de mamífero, respectivamente; y con menor longevidad que las salvajes, *gph1*, homóloga a la glucógeno fosforilasa. En ellas, el depósito de glucógeno varió significativamente: aumentó en las longevas y disminuyó en la de menor sobrevida; siendo las medias (n=3) del contenido del mismo en la fase estacionaria de 8,3; 8,7; 16,3 y 59,4, respectivamente, contra 29 µg/10(8) cel. en la salvaje. El análisis de longevidad de mutantes del metabolismo de glucosa en levadura indicó que fenotipos con menor capacidad de acumular glucógeno poseen una ventaja de supervivencia que podría asociarse a características diferenciales de susceptibilidad al estrés.

441. (12586) HIERRO Y ÓXIDO NÍTRICO EN PRECURSORES NEURONALES EXPUESTOS A LA RADIACIÓN GAMMA. ROBELLO, ELIZABETH; DUBNER, DIANA (1); PÉREZ, MARÍA (1); MCHLIN, SEVERINO (1); PUNTARULO, SUSANA

Fisicoquímica - PRALIB - CONICET- Facultad de Farmacia y Bioquímica. (1) Autoridad Regulatoria Nuclear, Laboratorio de Radiopatología

El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto de la radiación en el contenido de Fe y óxido nítrico (NO) en células precursoras neuronales. Este modelo in vitro reproduce adecuadamente otros efectos observados in vivo. Se obtuvieron cultivos de células de cerebro de fetos de ratas Wistar en el día 17 de gestación. Los cultivos fueron irradiados con 2 Gy de radiación gamma. El contenido total celular de Fe fue medido por la formación del complejo Fe²⁺-batofenantrolina. El pool celular de Fe lábil fue medido por espectrofotometría de resonancia paramagnética a 77 K. El contenido de nitritos y nitratos en el medio de cultivo fue determinado por reacción de Griess y el contenido celular de NO fue medido con 4,5 Diaminofluoresceína-diacetato. El contenido total de Fe en los controles y al cabo de 2 y 4 h pi (post irradiación) fue de 2.9±0.1, 3.6±0.6 y 5.3±0.3 nmol/mg prot, respectivamente. El pool de Fe lábil en los controles y a las 2 y 4 h pi fue de 163±33, 44±36 y 591±60 pmol/mg prot, respectivamente. El contenido celular de NO fue máximo a 1 h pi (181% del control) volviendo a los valores iniciales a las 2 h pi. El contenido de nitratos y nitritos en el medio de cultivo de células control resultó de 0.07±0.01 µmol/mg prot y de 0.31±0.03 y 0.43±0.05 µmol/mg prot luego de 2 y 4 h pi, respectivamente. Se verificó un aumento significativo de la velocidad de generación de nitratos y nitritos con la irradiación obteniéndose en los controles 0.03±0.01 µmol/min/mg y 50±4 µmol/min/mg prot a 1 h pi. Estos resultados sugieren un aumento en el contenido celular de Fe a las 4 h pi, probablemente debido a un aumento en la captación de Fe por una alteración en la funcionalidad de la membrana. Esto determinaría un aumento en el pool de Fe lábil. Por otro lado, a las 2 h pi se observa una disminución en el pool celular de Fe lábil presumiblemente dependiente del aumento en el contenido de NO durante la 1ra. hora pi, que actuaría como quelante de Fe.

Financiado por CONICET, UBA y ANPCyT.

442. (12653) ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO DEL NITRATO DE URANILO SOBRE LA ACTIVIDAD OSTEÓBLÁSTICA. ORONA, NADIA (1); MANDALUNIS, PATRICIA (2); UBIOS, ANGELA (2); TASAT, DEBORAH (1, 2)

ECyT-UNSAM 1, FO-UBA 2

El Uranio y sus sales pueden ser incorporadas al organismo por vía endogástrica, percutánea o inhalatoria. La intoxicación por

uranio provoca necrosis renal y en el hueso una disminución del volumen óseo mediante la inhibición de la actividad osteoblástica. Dado que no se conocen los mecanismos celulares que provocan esta alteración, el objetivo del trabajo ha sido evaluar el efecto del Nitrato de Uranilo sobre la línea celular humana de osteoblastos fetales (hFOB 1.19) mediante parámetros celulares y bioquímicos. Se analizó la proliferación celular, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), y la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) sobre cultivos de osteoblastos expuestos a diferentes concentraciones de Nitrato de Uranilo (0.1 μ M –100 μ M). La generación de ROS se determinó mediante el test de nitroblue tetrazolium (NBT), evaluando el porcentaje de células capaces de reducir el NBT a cristales insolubles de formazana. La proliferación celular se cuantificó espectrofotométricamente (ABS: 570nm) mediante el ensayo del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) y la actividad de la FA se determinó mediante la conversión del p-nitrofenil-fosfato a p-nitrofenol (ABS: 415 nm). Los resultados obtenidos han demostrado que el nitrato de uranilo no modifica significativamente la proliferación celular, induce un incremento en la producción de ROS para todos las dosis empleadas, con diferencias estadísticamente significativas a partir de la dosis de 1 μ M respecto del control (Co: 38.62% \pm 4.04 vs 1 μ M: 47.87 \pm 3.17, $p < 0.01$), y reduce la expresión de la fosfatasa alcalina para la dosis de 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M respecto de los cultivos controles (Co: 80.37 FA/mg proteína \pm 10.58 vs 1 μ M: 55.46 FA/mg proteína \pm 9.74, $p < 0.001$). Estos resultados sugieren que la disminución de la actividad osteoblástica podría deberse a un aumento de

443. (12793) ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE CLOSTRIDIUM SEPTICUM Y CLOSTRIDIUM CHAUVOEI SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS. VILLA, MARÍA CECILIA; VEGA OROZCO, ADRIANA SOLEDAD; CORTIÑAS, TERESA INÉS; STEFANINI, ANA MARÍA

Área de Microbiología, UNSL.Chacabuco y Pedernera. 5700. San Luis.

Clostridium septicum y *Clostridium chauvoei* son microorganismos estrechamente relacionados que presentan más del 99% de similitud genética. Los dos producen mionecrosis en el ganado y en la mayoría de los animales de sangre caliente, sin embargo sólo *C. septicum* es capaz de producir enfermedades en el hombre, que cursan con un alto índice de mortalidad. Ambos microorganismos secretan al medio de cultivo exo- toxinas, pero sólo *C. septicum* produce una alfa-toxina necrotizante y letal, con actividad citotóxica sobre diversas células. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de la citotoxicidad de sobrenadantes libres de células (SLC) de los dos microorganismos obtenidos en diferentes condiciones de cultivo. Se emplearon las cepas tipo de *C. septicum* ATCC 12464 y *C. chauvoei* ATCC 10092. Los cultivos fueron desarrollados en sistema batch en condiciones de anaerobiosis. El efecto citotóxico se analizó por la técnica de MTT, sobre macrófagos y linfocitos humanos y de ratón incubados durante 24 h con distintas diluciones de SLC. Cambios morfológicos de las células compatibles con el proceso de apoptosis fueron observados por microscopía óptica y de fluorescencia. Los resultados obtenidos mostraron una mayor citotoxicidad de SLC de *C. septicum* ($p < 0,05$), con respecto a *C. chauvoei* en ambos tipos celulares. Sin embargo la citotoxicidad de *C. chauvoei* fue considerablemente alta (80%) en ambos tipos celulares cuando se incubó con SLC sin diluir. Estos resultado indicarían que *C. chauvoei* también podría ser considerado potencialmente tóxico para el hombre, como lo informado recientemente para otros clostridios, considerados hasta hace poco patógenos exclusivos de animales.

TRANDUCCION DE SEÑALES A

444. (11863) ATENUACIÓN SELECTIVA DE LA VÍA DE SEÑAL DE INSULINA EN EL HÍGADO DE RATAS OBESAS

ZUCKER: EFECTOS DEL IRBESARTAN SOBRE LA CASCADA DE SEÑAL DE INSULINA. MUÑOZ, M; ARGENTINO, D; DOMINICI, F; TOBLLI, J; TURYN, D

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán.

La resistencia a insulina (INS) se asocia frecuentemente a desórdenes metabólicos tales como obesidad, hipertensión, dislipemia y enfermedad cardiovascular. Una vez que la INS se une a su receptor (IR) e induce la activación de la quinasa intrínseca de IR y su autofosforilación en tirosinas, la vía de señalización de la INS diverge. Las dos principales cascadas de señalización incluyen la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa a través de IRS-1 y -2 y la activación de la vía de las kinasas activables por mitógenos (MAPK), las cuales median las funciones metabólicas y de promoción del crecimiento de la INS. La angiotensina II (AII) está implicada tanto en la patogénesis de la hipertensión como de la resistencia a la INS. La inhibición de la acción de la AII mediante bloqueantes de los receptores AT1 (BRA) no solo reduce la presión arterial sino que mejora la sensibilidad a la INS tanto en animales como en humanos con resistencia a INS. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del bloqueo crónico de los receptores AT1 con Irbesartan (IRB) sobre la vía de señal de la INS en el hígado de ratas obesas Zucker. Los animales se inyectaron con INS, se extrajo el hígado y luego por inmunoprecipitación seguida de Western Blotting se midió el grado de fosforilación de IR, IRS-1 y 2, Shc, la asociación entre IRS-1y 2 y la subunidad p85 de la PI3-K, la fosforilación de Akt y de ERK1/2. Las ratas obesas Zucker presentaron a nivel hepático una marcada disminución en los pasos de la señal que llevan a la activación de PI3-K/Akt, pero no se vio afectada la vía de las MAPK. Luego del tratamiento con IRB se produjo un aumento en la respuesta a la INS en varios pasos de la vía de señalización de la INS que lleva a PI3-K sin alterar significativamente la vía de las MAPK. El bloqueo crónico del receptor AT1 restaura la respuesta a la INS que lleva a la activación de PI3-K/Akt en hígado de ratas obesas Zucker, lo que enfatiza el uso de los BRA en el Síndrome X.

445. (12081) REGULACIÓN DE LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) POR EL SUPRESOR DE LA SEÑAL DE CITOQUINAS CIS. MIQUET, JG; SOTELO, AI; TURYN, D

IQIFIB - Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

La GH se une a su receptor de membrana (GHR) activando a la tirosina quinasa JAK2, que a su vez fosforila al GHR y a diversos mediadores de la señal. El principal mediador de la señal activado por la GH es el factor de transcripción STAT5, que se une a residuos de tirosina fosforilados en el GHR y es entonces fosforilado y activado por JAK2. Esta vía puede ser modulada por los supresores de la señal de citoquinas (SOCS), cuya síntesis es inducida por la GH. CIS es un miembro de la familia SOCS que compete con STAT5 por el sitio de unión al GHR, actuando como un regulador negativo de la señal de GH. Recientemente describimos que en hígado de ratones que expresan niveles elevados de GH la señal de STAT5 se halla inhibida, hecho que se correlaciona con un aumento del contenido proteico de CIS en este tejido. Al evaluar la activación de STAT5 en respuesta a la GH (dosis 5 μ g/g de peso corporal) en ratones con deficiencia de GH, se observó que la respuesta máxima no se encuentra alterada, mientras que el contenido proteico de CIS está disminuido en un 85% ($P < 0,001$). Con el fin de evaluar si la disminución de CIS se correlaciona con una mayor sensibilidad a la GH, se estimularon ratones deficientes en GH con dosis decrecientes de GH y se evaluó mediante inmunoprecipitación seguida de Western-blotting la fosforilación en tirosina de STAT5. Se observó que a bajas dosis de GH (50 y 15 ng/g de peso corporal) los ratones deficientes en GH presentan mayor fosforilación en tirosina de STAT5 que los ratones normales ($P < 0,01$). La hipersensibilidad a la GH en los ratones enanos podría deberse a la disminución

del supresor CIS que presentan estos animales. Analizando en conjunto los resultados obtenidos para ratones con deficiencia o con exceso de GH, se puede establecer in vivo una correlación positiva entre los niveles circulantes de GH y el contenido hepático de CIS, y una correlación negativa entre el contenido de CIS y la sensibilidad de respuesta de STAT5 a la GH.

446. (12188) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) DURANTE LA ETAPA DE CRECIMIENTO EN RATONES. SOTELO, AI; MIQUET, JG; TURYN, D

Depto de Química Biológica; Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; IQUIFIB-CONICET

La hormona de crecimiento (GH) promueve el crecimiento longitudinal y posee importantes efectos metabólicos. Ejerce su acción en forma directa y a través del factor de crecimiento similar-insulina (IGF-I). Actúa sobre diversos tejidos, es el hígado es el que presenta mayor cantidad de receptores para la GH y el que expresa la mayor proporción del IGF-I circulante. En el crecimiento intrauterino intervienen la insulina y el IGF-I pero no la GH ya que el feto no posee receptores para esta hormona. En las primeras etapas de la vida (niñez) empieza a actuar la GH, alcanzando el máximo en la adolescencia. Para evaluar la capacidad de acción de la GH en etapas tempranas de la vida se estimularon con GH ratones de distintas edades, se obtuvo el hígado y se determinó el grado de activación del factor de transcripción STAT5, el principal mediador de la acción de la hormona y que lleva a la síntesis de IGF-I. Contrariamente a lo esperado, la mayor respuesta no se obtuvo en la adolescencia temprana (cuatro semanas) sino hacia fines de la lactancia (dos-tres semanas) ($p < 0,001$). Este máximo coincide con el comienzo de la disminución de los niveles de la proteína supresora de la señal de citoquinas (SOCS) CIS, que presenta un máximo a los 10 días de vida y valores mínimos en el adulto joven (9 semanas) ($p < 0,001$). Las otras proteínas SOCS inducidas por GH, SOCS-1, -2 y -3 también varían en función de la edad, pero mientras que SOCS-1 presenta un perfil de expresión similar a CIS, SOCS-2 presenta valores máximos en el adulto y SOCS-3 en el recién nacido. Sin embargo, la variación en la concentración de estas proteínas no es tan importante como la observada para CIS. La principal vía de traducción de la señal de la GH, la de STAT5, presenta un máximo en la "niñez" tardía y no en la adolescencia temprana, hecho que se correlaciona con la disminución en la expresión de su principal supresor, la proteína CIS. Los niveles de CIS son elevados durante la lactancia, explicando, en parte, la menor actividad de la hormona en este período de la vida.

447. (12246) DIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS 3T3-L1 A ADIPOCITOS: ESTUDIOS SOBRE LOS EFECTOS DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA DE DIFERENCIACIÓN. MARTINI, CLAUDIA NOEMI; VILA, MARÍA DEL CARMEN

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Se sabe que los fibroblastos 3T3-L1 se diferencian a adipocitos por tratamiento con una mezcla que contiene: insulina, dexametasona y MIX (3-isobutil-1-metilxantina) en presencia de medio DMEM y suero fetal bovino. En este proceso de diferenciación existe una primera fase de proliferación denominada expansión clonal mitótica (ECM) y luego ocurre la diferenciación o adipogénesis. Se ha visto que mediadores de la respuesta de insulina como IRS-1 y PI3K son necesarios para la diferenciación. En este trabajo estudiamos el requerimiento de los componentes de la mezcla de diferenciación en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos (evaluada por tinción con "red oil" y medición de triglicéridos). Encontramos que al tratar los fibroblastos 3T3-L1 con insulina sola no se diferencian pero hay diferenciación con MIX + dexametasona, aunque significativamente menor a la obtenida con la mezcla completa. Además, vimos que el inhibidor

de PI3K, LY294002, bloquea la diferenciación producida por la mezcla completa y también la producida por MIX + dexametasona, lo que podría indicar que, en este último caso, la insulina presente en el suero fetal bovino podría estar activando PI3K y facilitando la diferenciación. Por otro lado encontramos que la mezcla completa de diferenciación produce un aumento significativo del número de células (ECM) pero ni MIX ni dexametasona ni insulina, separadamente, producen este aumento. En cambio, el tratamiento conjunto con MIX + dexametasona produce un aumento significativo del número de células aunque menor al de la mezcla completa. Estos resultados apoyan la propuesta de informes previos que sugieren que no puede haber diferenciación sin expansión clonal en oposición a un trabajo reciente que informó que el tratamiento de fibroblastos 3T3-L1 con insulina sola produce expansión clonal sin diferenciación y el tratamiento con MIX + dexametasona produce diferenciación sin expansión clonal.

448. (12444) PARTICIPACIÓN Y REGULACIÓN DE GRKS EN LA DESENSIBILIZACIÓN DEL RH2 A HISTAMINA EN CÉLULAS U937. FERNANDEZ, NATALIA (1) (2); MONCZOR, FEDERICO (2); BALDI, ALBERTO (1); SHAYO, CARINA (1); DAVIO, CARLOS (2)

*(1) Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET
(2) Lab. de Radioisótopos, FFYB, UBA.*

Han sido descritos 4 subtipos de receptores a histamina pertenecientes al grupo de receptores acoplados a proteínas G. El receptor H2 (rH2) se encuentra clásicamente acoplado a la vía del AMPc. Previamente, demostramos que las quinasas GRK2 y GRK3 son responsables de la desensibilización del rH2 en células COS-7 y que GRK2 participa en este proceso en células promonocíticas humanas U937. El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de GRK3 y GRK6 en la desensibilización del rH2 en células U937. Para ello se obtuvieron clones con menores niveles de expresión de estas quinasas (por transfección con cDNA antisentido) y se realizaron curvas dosis respuesta, cinéticas de producción de AMPc y curvas de desensibilización frente a agonistas H2. En los dos clones anti-GRK3 ensayados, la Rmax de AMPc resultó entre un 25% y 45% menor que en células U937; los niveles de AMPc durante la cinética resultaron inferiores y el t1/2 de desensibilización resultó mas corto que el de U937. Por ensayos de unión determinamos que esta respuesta no es explicada por una disminución del número de rH2. Esta variación en la respuesta resultó contraria a la esperada si GRK3 estuviese involucrada en la desensibilización del rH2. Por otro lado, los dos clones anti-GRK6 ensayados no mostraron diferencias en la respuesta respecto de U937, descartando la participación de GRK6 en este proceso. Paralelamente, evaluamos los niveles de GRK2 mediante western blot en los clones anti-GRK3 y anti-GRK6. Los clones anti-GRK3 presentan los niveles de GRK2 incrementados en un 50% y 70% respecto de U937, mientras que los clones anti-GRK6 no modificaron sus niveles. Esta modulación explicaría el comportamiento de los clones anti-GRK3 frente al estímulo con agonistas H2, reafirmando la importancia de GRK2 en la desensibilización del rH2. En la línea celular U937, GRK6 no está implicada en la desensibilización del rH2 y existe una regulación de los niveles de GRK2 por GRK3.

449. (12473) CARACTERIZACIÓN DE ZCD1, UN GEN NUCLEAR DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL DISMINUIDO EN FIBROSIS QUIÍSTICA. TAMINELLI, GUILLERMO L; VALDIVIESO, A GABRIEL; MARÍN, M CELESTE; TIRONI FARINATI, A CARLA F; CALABRÓ, VALERIA; DANKERT, MARCELO A; SANTA COLOMA, TOMÁS A

Instituto de Investigaciones Bioquímicas- UBA, CONICET- y Fundación Instituto Leloir

Mediante display diferencial, hemos caracterizado un nuevo gen dependiente del CFTR, ZCD1, el cual codifica una proteína de función desconocida. Posee un dominio Zn-Finger de un nuevo tipo denominado CDGSH y ZCD1 constituye el primer miem-

bro de esta familia. Su ARNm está modulado negativamente en células CFDE y los niveles son restaurados en células CFDE transfectadas con un plásmido que expresa CFTR wt (células CFDE/6RepCFTR). Los resultados fueron confirmados mediante FISH Confocal en células e hibridación in situ en cortes de tejidos de pulmón. El tratamiento con glibenclamida (inhibidor del CFTR, 50 μ M) de células CFDE/6RepCFTR y CFDE, produjo una reducción en los niveles del ARNm de ZCD1. La secuencia proteica predicha tiene un motivo de translocación mitocondrial y un motivo similar a ND2, una subunidad del Complejo I mitocondrial. El programa PSORT II predijo una localización mitocondrial. Transfectando células CFDE con una quimera de la proteína ZCD1 unida a EGFP y comparando dichas células con y sin tratamiento con TMRM (un colorante específico de mitocondrias activas), hemos observado en imágenes obtenidas por microscopía confocal que la predicción de su localización es correcta. Agradecimientos: Universidad de Buenos Aires, CONICET, ANPCYT y Beca Carrillo-Oñativía del Ministerio de Salud. Los resultados sugieren que ZCD1 tendría una localización mitocondrial, una probable función en el Complejo 1 de la cadena respiratoria y que se encontraría en FQ disminuida, como ocurre con la actividad mitocondrial.

450. (12489) MECANISMO DE INTERNALIZACIÓN Y RESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR H2 A HISTAMINA.

FERNANDEZ, NATALIA; MONCZOR, FEDERICO (2); BALDI, ALBERTO (1); DAVIO, CARLOS (2); SHAYO, CARINA (1)

(1) Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET. (2) Lab. Radioisótopos, FFYB, UBA.

En estudios previos mostramos la importancia del AMPc en la diferenciación de células U937, siendo la intensidad y duración de dicha respuesta factores determinantes en el proceso de diferenciación celular. En este sentido, hemos descrito que agonistas de receptores H2 a histamina si bien evocan una respuesta de AMPc no promueven la diferenciación de las células U937 debido a la rápida fosforilación del receptor mediada por miembros de la familia de quinasas de GPCRs. Es sabido que luego de ser fosforilado un GPCR puede ser internalizado y degradado o reciclado a la membrana celular. Dada la importancia de estos procesos como determinantes de la desensibilización/resensibilización de la respuesta evocada por un receptor, nos planteamos como objetivo estudiar el tráfico del rH2 luego del tratamiento con agonistas específicos. Mediante ensayos de unión y microscopía confocal realizados en células COS7 transfectadas con el rH2, observamos que a la hora de tratamiento con el agonista, el número de sitios H2 en membrana se redujo a la mitad y se recuperó en un 100% a la hora de retirado el estímulo. De la misma forma, la capacidad de dar respuesta del rH2 se redujo en un 90% luego de 1 h de tratamiento con el agonista y se recuperó en un 50% a la hora de retirado el mismo. Al cotransfectar al rH2 con construcciones dominantes negativas para 2 proteínas clásicamente involucradas en la internalización de GPCRs (arrestina y dinamina) observamos que si bien el tratamiento con el agonista no conduce a una pérdida de sitios en membrana, la capacidad del receptor de dar señal se pierde y no se recupera aún retirado el estímulo. Estos resultados indican que la internalización del rH2 no es necesaria para la desensibilización del mismo y sí para la recuperación o reciclado de sitios activos en la membrana celular. Por otra parte, señalan la importancia de arrestina y dinamina en los procesos de endocitosis y reciclado del rH2.

451. (12496) REGULACIÓN DEL GEN ND4 MITOCONDRIAL MEDIADA POR EL CANAL DE CLORURO CFTR. VALDIVIESO, A. GABRIEL; TAMINELLI, GUILLERMO L.; TIRONI FARINATI, ALICIA C. F.; CALABRO, VALERIA; REYES, G. BEATRIZ; DANKERT, MARCELO; SANTA COLOMA, TOMÁS A

Instituto de Investigaciones Bioquímicas (UBA y CONICET), Buenos Aires, Argentina. (angelvaldi@hotmail.com)

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más común en la población caucásica producida por una

falla en el canal de cloruro CFTR. Estudios previos de nuestro laboratorio han permitido identificar un gen regulado por la actividad del CFTR que corresponde a ND4, una subunidad del Complejo I mitocondrial. Se ha demostrado una regulación negativa de ND4 en FQ por ensayos de Northern blots e hibridaciones in situ realizadas en cortes de pulmón de individuos normales y FQ. Nuestro objetivo es confirmar si la falla del CFTR lleva a una disminución de la producción de la proteína ND4 y si esta afecta la actividad del Complejo I mitocondrial. Para medir la actividad del Complejo I se utilizaron Blue Native-PAGE. Estos ensayos se realizaron a partir de mitocondrias extraídas de células derivadas de un paciente con FQ (CFDE), las mismas células transfectadas con un plásmido que expresa de forma ectópica CFTR salvaje (CFDE/6RepCFTR), y con células T84 de cáncer de colon, las cuales no tienen afectado el CFTR. Se trataron estas células con glibenclamida, un inhibidor del CFTR, para modular la expresión de ND4. Se observó una disminución significativa de la actividad del Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) en células CFDE tratadas con glibenclamida en comparación con la actividad de las células CFDE/6RepCFTR. Estos estudios preliminares serán confirmados ahora con inhibidores más específicos del CFTR (siRNA y CFTR(inh)-172). Agradecimientos: Universidad de Buenos Aires, CONICET, ANPCYT y Ministerio de Salud (Beca Carrillo-Oñativía). Los resultados obtenidos indican una alteración en la actividad del Complejo I mitocondrial probablemente debida a la disminución de la proteína ND4 mitocondrial modulada por CFTR. Los resultados explicarían las anomalías mitocondriales descritas por otros autores, para las cuales se desconoce el mecanismo.

452. (12503) LA TRANSLOCACIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS) A LA MITOCONDRIA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO CONTRIBUYE AL DAÑO MITOCONDRIAL EN LA ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL. GONZALEZ, ANALIA; HOLOD, SILVIA; FRANCO, MARIA CLARA; PODEROSO, JUAN JOSÉ; CARRERAS, MARIA CECILIA

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas "José de San Martín"

La sepsis es una respuesta inflamatoria generalizada frente a una infección severa que puede desencadenar la disfunción de distintos órganos. El proceso fisiopatológico subyacente involucra la producción de citoquinas y la consecuente expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en diversos tejidos, resultando en la producción de óxido nítrico (NO), un mediador importante del daño tisular observado en esta patología. Anteriormente, hemos estudiado la participación del daño mitocondrial en la patogénesis de la sepsis debido a la translocación de iNOS a la mitocondria en hígado de rata. El objetivo del presente trabajo es determinar si la translocación de la enzima a través de la membrana mitocondrial en músculo esquelético contribuye también al daño mitocondrial. Para ello se inocularon ratas Wistar machos con 20 mg LPS (E. coli)/Kg de peso i.p. Se obtuvieron muestras de citosol y mitocondrias de músculo y plasma a las 2, 4, 6, 12 y 24 h post-tratamiento. El ARNm de iNOS se observó por RT-PCR entre las 2 y las 6 h y la proteína, tanto en citosol como en mitocondria, fue detectada mediante western blot entre las 2 y las 24 h, con pico máximo a las 6 h, coincidente con la máxima actividad enzimática Ca⁺⁺ independiente. Por otro lado, la actividad del Complejo IV disminuyó 55% a las 6 h, mientras que la actividad del Complejo I-III disminuyó 60% a partir de las 12 h post-tratamiento. En plasma se observó un aumento de la nitración de proteínas en tirosina. Los resultados sugieren que durante la endotoxemia experimental, en músculo esquelético, iNOS translocaría a la mitocondria ocasionando la inhibición de los complejos de la cadena respiratoria y la nitración de proteínas.

TRANSDUCCION DE SEÑALES B

453. (11864) TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE INSULINA EN RATONES RESISTENTES A LA HORMONA DE CRE-

CIMIENTO SOMETIDOS A RESTRICCIÓN CALÓRICA BREVE O PROLONGADA. ARGENTINO, D; MUÑOZ, M; TURYN, D; DOMINICI, F

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB); Facultad de Farmacia y Bioquímica; UBA

Los ratones que no expresan el receptor de la hormona de crecimiento (GHR-/-), constituyen un modelo de longevidad asociado a hipersensibilidad a la insulina. Otra intervención asociada a hipersensibilidad a la insulina y a un aumento de la duración de la vida en diversas especies es la restricción calórica (RC). En el presente trabajo se analizaron los mecanismos por los cuales la mutación GHR-/- y la RC extienden la duración de la vida. Para ello ratones normales (N) y GHR-/- de 2 meses de edad fueron sometidos a RC breve (20 días, RCB) o prolongada (14 meses, RCP). Se determinó luego la glucemia (GLU) y la insulinemia (INS) junto con el estado de activación de los primeros componentes de la señalización de insulina en el músculo esquelético que llevan a la captación de glucosa estimulada por insulina: la fosforilación en residuos de tirosina del receptor de insulina (IR) y la de su sustrato IRS-1 y el contenido de la subunidad reguladora (p85) de la enzima fosfatidilinositol 3 quinasa. Los ratones GHR-/- de 2 meses evidenciaron una disminución en la GLU, en la INS y en la cantidad de p85. La RCB disminuyó la INS en los ratones N mientras que los ratones GHR-/- no mostraron alteraciones a este nivel. La RCB no modificó el estado de la señalización de insulina en los ratones N ni en los GHR-/-. Los ratones GHR-/- de 16 meses presentaron una disminución en la cantidad de IRS-1 y de p85, junto con una disminución de la GLU e INS a comparación de los valores hallados en los animales N. Luego de la RCP se detectó un aumento de la cantidad de IRS-1. En los ratones N la RCP disminuyó la GLU e INS y generó un aumento del contenido de IRS-1, mientras que la fosforilación del IR o del IRS-1 en respuesta a insulina no se alteró. La RC, independientemente del tiempo de duración de la misma, no modifica la sensibilidad a la INS en los ratones GHR-/- indicando que el mecanismo por el cual la RC y la mutación aumentan la sensibilidad a la INS no involucra los pasos de la vía analizados.

454. (12135) MODULACIÓN POSITIVA DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA POR ANGIOTENSINA-(1-7) EN CORAZÓN DE RATA. GIANI, JF; GIRONACCI, MM; MUÑOZ, MC; PEÑA, C; TURYN, D; DOMINICI, FP

IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junin 956, 1113, Buenos Aires, Argentina.

El receptor de insulina (IR) se autofosforila en respuesta a insulina (INS). Dicho efecto resulta en la posterior fosforilación de varios sustratos citosólicos incluyendo el IRS-1 y el IRS-2 que funcionan como proteínas de anclaje para las enzimas PI 3-quinasa y JAK2 que resultan activadas luego de la unión a IRS-1 y -2. Posteriormente se estimula la actividad de la enzima Akt, que media varias de las acciones de la INS. a elevación crónica de angiotensina (Ang) II induce insulinoresistencia por mecanismos aún desconocidos. A través de la activación del receptor AT1 y JAK2, la Ang II estimula en forma aguda varios componentes de la cascada de señalización de la INS. Por el contrario, la co-administración de INS y Ang II produce una disminución en la respuesta a la INS, lo que explicaría la insulinoresistencia asociada a un exceso crónico de Ang II. Se ha sugerido que la Ang-(1-7) se opone a muchas de las acciones de la Ang II. En base a esta evidencia postulamos que la Ang-(1-7) podría modular positivamente las acciones de la INS. Para ello se investigó el efecto de la Ang-(1-7) sobre la transducción de la señal de insulina in vivo. Ratas Sprague Dawley fueron inyectadas vía vena cava inferior con Ang-(1-7), Ang II o INS y se midió el nivel de fosforilación de diversas proteínas en corazón. La administración de Ang-(1-7) 10 nM indujo un aumento significativo de la fosforilación de IRS-1 y -2, JAK2 y Akt; mientras que la Ang II estimuló la fosforilación de IRS-1, IRS-2 y JAK2 pero no de Akt. En ningún caso se observó fosforilación de IR. La coadministración de INS y Ang II originó un nivel de fosforilación de IRS-1, IRS-2 y Akt menor al inducido

por INS. Cuando a la mezcla de Ang II e INS se le agregó Ang-(1-7) se restauró la fosforilación de IRS-1, IRS-2 y Akt. La Ang-(1-7) estimula la transducción de la señal de la INS en corazón de rata y puede contrarrestar el efecto inhibitorio ejercido por la Ang II a este nivel. Así, la Ang-(1-7) contribuiría a mejorar la sensibilidad a la INS en el corazón.

455. (12185) CANAL DE POTASIO ERG1 EN CÉLULAS LEUCÉMICAS. CAVARRA, M SOLEDAD (1); DEL MÓNACO, SILVANA M (1); IBARRA, CRISTINA (2); KOTSIAS, BASILIO A (1)

(1) Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA-CONICET. (2) Laboratorio de Fisiopatología, Facultad de Medicina, UBA.

Se ha sugerido al canal de K(++) hERG1 como un posible regulador de la apoptosis, proliferación y diferenciación. Existen dos isoformas nativas: hERG1a contiene un extremo N-terminal largo con un dominio PAS (sensor de potencial redox) y hERG1b un dominio N-terminal corto. Éstas pueden formar canales homo o heterotetraméricos. Los canales hERG1b están poco caracterizados dado su patrón de expresión. Nuestro objetivo es estudiar con técnicas de patch clamp, RT-PCR y tinción con Trypan blue, la funcionalidad y expresión de los canales hERG1 en la línea celular K562, derivada de una leucemia mieloide crónica en su crisis blástica. El 81% de las células presentan corrientes tipo hERG1 que se inhiben con el bloqueante E-4031 (IC₅₀ = 5 nM). La constante de remoción de la inactivación fue de 3.8 ± 0.6 ms, y las de desactivación rápida y lenta de 27.5 ± 3.7 y 239 ± 36 ms (n=12, a -120 mV). Estos valores son similares a los descriptos para canales hERG1a con el extremo N-terminal truncado. La adición de 400 µM de H₂O₂ no afectó la amplitud ni la cinética del canal (n=6). El H₂O₂ (1 mM) disminuyó la viabilidad celular en un 31.4 ± 3.2 % (n=3, p<0.05), aunque este efecto no fue revertido con el agregado del E-4031 (n=3, p>0.05). Los experimentos con RT-PCR mostraron una banda correspondiente a hERG1b (n=3). Nuestros resultados sugieren la expresión exclusiva de la isoforma hERG1b en las células K562, presentándolas como un buen sistema para el estudio de las propiedades nativas de los canales homotetraméricos hERG1b y permitiendo la disección de su participación en las diversas funciones que se le han atribuido al canal. La variabilidad en la amplitud de las corrientes nativas de células hERG+ podría deberse a una expresión del canal dependiente del ciclo celular, ya que nuestro cultivo no se encuentra sincronizado. Los canales hERG1b no están involucrados en la regulación de la apoptosis.

456. (12314) SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN POR FSH DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE SERTOLI EN EL PERIODO NEONATAL. RIERA, MARÍA FERNANDA; GALARDO, MARÍA NOEL LUJÁN; PELLIZZARI, ELIANA H; MERONI, SILVINA B; CIGORRAGA, SELVA B

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE). Hospital de Niños R. Gutiérrez

La FSH regula la proliferación y la diferenciación de las células de Sertoli (CS) en distintos momentos de la maduración sexual. Demostramos previamente que una vía dependiente de PI3K/PKB participa en la regulación por FSH de la funcionalidad de la CS en proceso de diferenciación terminal. Por otro lado, la FSH es la principal hormona encargada de estimular la proliferación de CS durante el período fetal y neonatal. Las señales involucradas en este último proceso no han sido estudiadas. El objetivo de este trabajo fue en CS neonatales: 1) determinar si existe regulación de PI3K/PKB y de MAPK por FSH y 2) analizar la participación de PKA, PI3K/PKB y MAPK en el estímulo de la proliferación por FSH. Cultivos de CS provenientes de ratas de 5 días de edad fueron estimulados: a) por 15, 30 o 60 minutos con FSH (100ng/ml) para determinar los niveles de PKB y MAPK fosforiladas (PKB-P y MAPK-P) por Western blot y b) por 24 ho-

ras con FSH (100ng/ml) en ausencia o presencia de un inhibidor de PKA (H89:10 μ M), de PI3K (wortmanina, W:0.1 μ M) o de MEK (PD98059, PD:10 μ M) para evaluar la participación de estas vías en el estímulo proliferativo. La proliferación celular fue estimada determinando la incorporación de timidina tritiada. Se observó que FSH, además de la vía clásica AMPc/PKA, aumenta los niveles de PKB-P y disminuye los de MAPK-P. Por otro lado, se observó que la FSH aumenta la incorporación de timidina tritiada y que la presencia de H89 o de W inhibe el estímulo de FSH, mientras que PD no lo modifica (Basal: 36291 \pm 4687(a); FSH: 54353 \pm 3720(b); FSH+H89: 39640 \pm 5379(a); FSH+W: 34098 \pm 4593(a); FSH+PD: 51057 \pm 6292(b); dpm incorporadas/24horas, X \pm DS, n=4, un experimento representativo de tres, distintas letras indican los grupos con diferencias significativas, p<0.05). Los resultados obtenidos sugieren que en el período neonatal FSH regula la proliferación de la CS a través de la vía AMPc/PKA y de una vía dependiente de PI3K.

457. (12413) POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK) EN LA REGULACIÓN DE LA ENTRADA DE GLUCOSA A LA CÉLULA DE SERTOLI (CS). GALARDO, MARÍA NOEL LUJÁN; RIERA, MARÍA FERNANDA; PELLIZZARI, ELIANA H.; CIGORRAGA, SELVA B.; MERONI, SILVINA B.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños R Gutiérrez

La AMPK es una enzima clave en el control del nivel energético celular. Dicha quinasa es activada por un incremento en la relación AMP:ATP como consecuencia de procesos que disminuyen los niveles de ATP. En CS no se han analizado aún las consecuencias de la activación de esta quinasa. El objetivo de este trabajo fue analizar en CS el papel que la activación de esta quinasa podría tener sobre la entrada de glucosa (G), sustrato indispensable para la producción de lactato que es el metabolito energético utilizado por las células germinales. Cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron estimulados con adenina 5-aminoimidazol-4-carboxamida 1-beta-D-ribofuranósido (AICAR, 1 mM, activador de AMPK), por 3 horas y se observó que AICAR aumentó la entrada de G a CS (basal: 331 \pm 42, AICAR: 860 \pm 42* dpm/ μ g ADN, n=3, *p<0.001). Asimismo, se analizó la participación en el aumento observado de la traslocación de transportadores a la membrana y de señales de transducción dependientes de PI3K y p38MAPK. Para ello se utilizaron respectivamente las siguientes drogas: Citocalasina D (CitoD, 1 μ M, inhibidor de la polimerización de filamentos de actina), Nocodazol (Noc, 100 μ M, despolimerizante de microtúbulos), wortmanina (W, 0.1 μ M, inhibidor de PI3K) y SB203580 (SB, 10 μ M, inhibidor de MKK6). Se obtuvieron los siguientes resultados: AICAR: 990 \pm 78, AICAR+CitoD: 729 \pm 72*, AICAR+Noc: 921 \pm 38, AICAR+W: 883 \pm 72, AICAR+SB: 533 \pm 32*, dpm/ μ g ADN, n=3, *p<0.01. El AICAR aumentó asimismo la producción de lactato (basal: 11.18 \pm 0.97, AICAR: 17.88 \pm 0.56*, μ g/ μ g ADN/48 horas, n=3, *p<0.001). Los resultados obtenidos sugieren que la activación de AMPK en CS resulta en un aumento de la incorporación de G que es mediado en parte por traslocación de transportadores a la membrana dependiente de microfilamentos de actina y en parte por activación de una vía p38MAPK dependiente.

458. (12509) PERFIL FARMACOLÓGICO Y SEÑALIZACIÓN DE UNA MUTANTE TRUNCADA DEL RECEPTOR H2 A HISTAMINA. TUBIO, ROSARIO (1) (2); COPSEL, SABRINA (1); SHAYO, CARINA (2); DAVIO, CARLOS (1); MONCZOR, FEDERICO (1)

(1) Lab. de Radioisótopos, FFyB, UBA; (2) Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET.

En nuestro laboratorio estudiamos la señalización y propiedades farmacológicas del receptor H2 a histamina (rH2) perteneciente a la superfamilia de GPCRs caracterizados por poseer siete pasos transmembrana y señalizar a través de la vía del AMPc.

Contamos con una mutante del rH2 donde el codón que codifica para el ácido glutámico 229 fue reemplazado por un codón de terminación (rH2t). Esta mutante cuenta con los primeros cinco dominios transmembrana y una porción del tercer segmento intracelular. Para evaluar la expresión y funcionalidad del rH2t, se realizaron transfecciones transientes en células COS-7. En ensayos de unión, la afinidad del rH2t y del salvaje por el ligando de referencia resultó similar (73,9 \pm 26,8 nM vs 86,8 \pm 13,1 nM; p>0,05), pero los niveles de expresión del rH2t fueron menores que los del salvaje (1218 \pm 190 dpm vs 5617 \pm 384 dpm; p<0,05). Al realizar curvas dosis-respuesta con un agonista específico, el rH2t mostró una CE50 mayor (310,4 \pm 1,1 nM vs 23,9 \pm 2,1 nM; p<0,05) y una respuesta máxima menor (24,1 \pm 4,1 pmol vs 63,6 \pm 5,1 pmol; p<0,05) respecto al rH2. Resultados similares fueron obtenidos en células CHO transfectadas en forma estable y transiente. Por lo tanto, si bien el rH2t se expresa y localiza en la membrana celular, existe una diferencia en la señalización de ambas variantes, la cual no puede, en principio, adjudicarse a la interacción con el ligando ya que la afinidad fue similar. Sin embargo, el rH2t mostró un nivel de expresión menor, sugiriendo cierta alteración en el tráfico o la estabilidad de la proteína o de su RNAm. Esta podría ser la causa de la pérdida de potencia y eficacia del agonista específico. Ha sido descrito que la sola falta del extremo C-terminal del receptor H2 es suficiente como para impedir la correcta expresión del mismo. Sin embargo, nuestro trabajo muestra que una variante aún más corta que carece también de los dos últimos dominios transmembrana es capaz de expresarse y conservar su funcionalidad.

459. (12656) EFECTOS NO GENOMICOS DE HORMONAS TIROIDEAS (HT): ACTIVACION DEL NF-KB INDUCIDA EN UN LINFOMA T MURINO BW5147 (BW). BARREIRO ARCOS, MARÍA LAURA (1); FARIAS, RICARDO N (2); SILBERMAN, DAFNE M (1); KLECHA, ALICIA J (3); GENARO, ANA M (1,3); CREMASCHI, GRACIELA A (1,3)

(1) CEFYBO-CONICET. (2) INSIBIO, UNT-CONICET; (3) Lab Radioisotopos, FFyB, UBA.

Previamente demostramos que las isoformas α de la proteína quinasa C (PKC) e inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) son de crucial importancia para la proliferación de células BW. También comprobamos que las HT estimulan la proliferación de las células BW en forma concentración-dependiente (a las 24 hs de cultivo, T3, 10 nM: 98 \pm 9%; T4, 0.1 μ M:186 \pm 15%) y aumentan la expresión de PKC α y de iNOS. El objetivo de este trabajo fue profundizar los mecanismos intracelulares involucrados en los efectos de las HT. La incubación por 15 minutos con HT o por 24 hs con T3-agarosa indujo un incremento menor de la respuesta proliferativa celular (T3-agarosa, 10 nM: 32 \pm 5%, p<0.01). T3-agarosa, al igual que T4 y T3, indujo una rápida (5 minutos) traslocación de PKC a la membrana celular tal como se determinó por fosforilación del sustrato específico MBP[4-14]. También se observó la degradación del I κ B (determinada después de 15 min por Western blot a partir de extractos citosólicos) y la consecuente traslocación de NF- κ B al núcleo (determinado por EMSA). La T3-agarosa, a diferencia de las HT, no fue capaz de inducir el aumento de la expresión proteica y genómica de iNOS. El inhibidor de PKC, staurosporina bloqueó la traslocación mediada por HT del NF- κ B al núcleo e inhibió la expresión genómica y proteica de la iNOS, como fuera observado por RT-PCR y Western blot respectivamente. El tratamiento de las células BW con el pseudopeptido miristoilado de PKC α inhibió la proliferación celular inducida por HT, la traslocación de NF- κ B al núcleo y disminuyó la actividad de NOS (medida por formación de [14C]-citrulina). Dado que la T3-agarosa no atraviesa la membrana celular se puede concluir que los efectos de las HT sobre la modulación del crecimiento celular, a través de la inducción de la expresión genómica y proteica de iNOS observados previamente, incluyen la participación de la activación no genómica de PKC y NF- κ B.

460. (12681) CASCADA DE SEÑALES Y EXPRESIÓN DE GENES INDUCIDAS POR EL ESTRÉS MECÁNICO EN EL EPITELIO MAMARIO. QUAGLINO, ANA (1); TANOS, TAMARA (2); COSO, OMAR (2); KORDON, EDITH (1)

(1) LEGMA - IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. (2) LFBM - IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Se ha reportado que la fase inicial de la involución post-lactancia de la glándula mamaria se caracteriza por la apoptosis de las células secretorias. El inicio de este proceso depende de señales locales inducidas por la acumulación de leche en los espacios lobulillares. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto desencadenado por el estiramiento mecánico de células epiteliales mamarias, como modelo de lo que ocurre en los lobulillos mamarios al suspenderse el amantamiento. Para ello se diseñó especialmente un dispositivo que permite el estiramiento de células crecidas en monocapa. Así, células epiteliales mamarias HC11 fueron cultivadas sobre membranas de siliconas cubiertas de colágeno y al llegar a un 80% de confluencia fueron estiradas un 20% durante distintos tiempos, en un intervalo de 2 minutos a 4 horas. Dado que se ha reportado que durante la involución mamaria se produce la activación de cascadas de señalización que involucran la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 y del factor de transcripción STAT3, así como la inducción de la expresión de genes como c-fos y LIF, se procedió a determinar si el estiramiento mecánico por sí mismo era capaz de inducir tales cambios. Por análisis de Western blot, hallamos que el estiramiento indujo activación de ERK1/2 y STAT3 que alcanzó su máximo entre los 5 y 15 minutos y desapareció a la 1/2 hora de iniciado el estímulo. Por otro lado, por experimentos de RT-PCR en Tiempo Real, hallamos que el mismo nivel de estrés mecánico indujo un aumento de la expresión del mensajero de LIF (2.5 veces con respecto al control) y de c-fos (20 veces respecto al control). Estos resultados muestran la validez de un nuevo método para investigar el efecto del estiramiento sobre las células epiteliales e indica que el estrés mecánico podría desencadenar por sí mismo eventos de importancia fundamental para la apoptosis del epitelio mamario durante la involución post-lactancia.

CARDIOVASCULAR

461. (12026) EL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO ATE- NÚA LA DISFUNCIÓN VENTRICULAR POSTISQUÉMICA EN CORAZONES AISLADOS DE CONEJO. D'ANNUNZIO, VERÓNICA; DONATO, MARTÍN; MEDEL, M JIMENA; LO- RENZO CARRIÓN, CRISTINA; GELPI, RICARDO J

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Depto de Patología, Facultad de Medicina, UBA

El poscondicionamiento isquémico (Pos-con) es un fenómeno por el cual breves episodios de reperfusión/isquemia realizados luego de una isquemia prolongada reducen el tamaño de infarto. Sin embargo, no existe evidencia experimental que demuestre su efecto sobre el miocardio atontado, entidad en la cual el área de infarto es poco significativa. El objetivo fue evaluar si el Pos-con atenúa la disfunción ventricular postisquémica sistólica y diastólica (miocardio atontado). Corazones aislados e isovolúmicos de conejos perfundidos según técnica de Langendorff fueron sometidos a 15 min de isquemia global y 30 min de reperfusión (G1). En G2, luego 15 min de isquemia se realizaron dos ciclos de reperfusión/isquemia de 30 seg cada uno (Pos-con) seguidos por 30 min de reperfusión. Se midió la presión desarrollada del VI (PDFVI), la presión diastólica final del VI (PDFVI, rigidez miocárdica), y se calculó la constante de decaimiento de la presión ventricular (tau). Se midió el tamaño de infarto con trifenil de tetrazolium, y se expresó como porcentaje del área del VI. X±ESM. *: p<0.05 vs G1. R: reperfusión.

		Basal	1 min R	10 min R	20 min R	30 min R	Infarto (%)
G1 (n=8)	PdVI (mmHg)	87.9±4.1	64.7±7.4	49.6±4.4	57.7±3.9	59.9±3.6	3.4±0.9
	PDFVI (mmHg)	9.9±0.4	14.7±3.5	39.1±3.2	35.8±2.6	33.1±2.8	
	Tau (mseg)	29.9±1.6	70.1±8.1	41.3±2.4	34.4±0.8	28.1±3.6	
G2 (n=6)	PdVI (mmHg)	90.1±2.5	64.5±2.7	68.1±5.9*	71.8±6.2*	73.3±5.4*	1.9±0.4
	PDFVI (mmHg)	8.8±0.6	8.6±1.9	7.1±1.2*	6.4±1.2*	5.9±1.5*	
	Tau (mseg)	30.2±3.6	62.1±3.6	44.1±4.8	34.8±3.7	26.6±1.2	

El Pos-con atenúa las alteraciones sistólicas y el aumento de la rigidez miocárdica del miocardio atontado, sin cambios en la relajación isovolúmica, ni en el tamaño de infarto

462. (12266) EL DIMETILAMILORIDA (DMA) -INHIBIDOR DEL INTERCAMBIADOR NA/H- PRESERVA LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA GLOBAL (I)-REPERFUSIÓN (RP). MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA; GARCÍA, JIMENA; TORRESÍN, EMILIA; GONZÁLEZ, MARCELA; SAVINO, ENRIQUE; VARELA, ALICIA

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET

El DMA mejora la recuperación funcional y la viabilidad celular del corazón de rata sometido a I-RP. Se evaluó si esta protección se acompaña de preservación de la permeabilidad mitocondrial. Se trabajó con corazones perfundidos Langendorff sometidos a I (25 min)-RP (30min). El DMA 10 µM fue agregado al medio de perfusión 13 min antes de la I hasta los 2,5 min de RP. Para evaluar cambios en la permeabilidad mitocondrial se empleó el método de captación de (3)H-desoxiglucosa (DG). Los corazones fueron cargados con DG durante 30 min seguidos de 13 min de perfusión con medio sin DG previos a la I-RP. La DG es captada por las células y convertida en DG-6P, no siendo metabolizada. Al finalizar el experimento los corazones se homogeneizaron en medio TRIS-ClH-sacarosa-EGTA-BSA, pH 7.4. El EGTA impide la liberación mitocondrial de DG en el proceso de aislamiento mitocondrial por centrifugación. Se midió la radiactividad total del homogeneizado y de las mitocondrias aisladas. La DG sólo queda atrapada en las células que no han sufrido necrosis y sólo penetra a las mitocondrias que han sufrido cambios en su permeabilidad. En otro grupo de corazones sometidos a I-RP se midió el contenido tisular de lactato al finalizar la I. La captación mitocondrial de DG fue menor en corazones tratados con DMA con respecto a los controles (37.57±11.19 vs 96.37±14.01 dpm mitocondrial x 10(5)/unidad de citrato sintetasa x dpm totales/gh, p<0.05). La radiactividad total fue mayor en los corazones tratados con DMA (76.88±1.75 vs 51.34±4.47 dpm x 10(3)/gh, p<0.05). El contenido tisular de lactato fue menor en los corazones tratados con DMA (119.82±9.7 vs 163 ±14 µmol/g, p<0.05). Los resultados indican que la protección ejercida por el DMA se acompaña de disminución de la producción isquémica de lactato, preservación de la permeabilidad mitocondrial y disminución de necrosis celular.

463. (12267) CATECOLAMINAS Y MIOCARDIO ATONTADO. SAID, MARÍA MATILDE; VITTONI, LETICIA; MATTIAZZI, ALICIA

Centro de Investigaciones Cardiovasculares - Facultad de Ciencias Médicas - UNLP

La disfunción contráctil reversible del miocardio que sigue a un período breve de isquemia, se conoce como "miocardio atontado" (MA). La sobrecarga intracelular de Ca(2+) y la formación de especies reactivas del O[2] (ROS), son los principales mecanismos involucrados en la patogénesis del MA. Las catecolaminas por estimulación de sus receptores y/o por su autooxidación podrían contribuir en ambos procesos. Sin embargo, aún es tema de discusión si las catecolaminas liberadas en la isquemia tienen efectos deletéreos o beneficiosos sobre la recuperación contráctil del MA. Para dilucidar esta controversia, estudiamos en corazones aislados y perfundidos de rata, sometidos a 20/30min de isquemia/reperfusión (I/R), los efectos sobre la recuperación contráctil y nivel de ROS en corazones deplecionados de catecola-

minas endógenas (reserpina 5mg/kg 24hs antes del sacrificio), y con bloqueo selectivo y combinado de receptores adrenérgicos: alfa[1] (prazosin 1µM), β[1] (atenolol 5µM) y β[2] (ICI 118,551 5µM). Estos bloqueantes fueron perfundidos durante 10min previos a la isquemia. La contractilidad se midió por la máxima velocidad de desarrollo de la presión (+dP/dt, % de los valores preisquémicos). Los ROS se cuantificaron por peroxidación lipídica (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS nmol/mg de tejido). Al final de la I/R, +dP/dt fue significativamente mayor que el control (43±5% n=15) en los corazones tratados con reserpina (94±5% n=14), con atenolol más ICI (97±8% n=7) y con prazosin más ICI (71±12% n=12); y significativamente menor en los tratados con prazosin más atenolol (26±3% n=8). I/R aumentó significativamente TBARS de 1.89±0.13 a 2.74±0.13, valor que disminuyó con reserpina (2.28±0.16) y aumentó con prazosin más atenolol. Los resultados indican un efecto dual de las cate-colaminas: por estimulación β[2] deprimen la recuperación contráctil del MA, efecto amortiguado por la activación de las vías alfa[1] y β[1]. La depresión contráctil inducida por β[2] está asociada a un aumento de la producción de ROS.

464. (12270) PAPEL DEL CANAL MITOCONDRIAL DE POTASIO SENSIBLE AL ATP (K-ATP) EN LA PROTECCIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA GLOBAL (I)-REPERFUSIÓN (RP). MARINA PRENDES, MARÍA GABRIELA(1); FERNÁNDEZ, ALEJANDRA (2); PERAZZO, JUAN (2); SAVINO, ENRIQUE (1); VARELA, ALICIA (1)

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET. Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Se evaluó el papel de los K-ATP en la protección del PC sobre la contractilidad, la viabilidad celular (VC), la preservación isquémica del glucógeno y la preservación de la permeabilidad mitocondrial. Se trabajó con corazón perfundido Langendorff sometido a I (25 min)-RP (30 min). El PC consistió en 3 min I-5 min RP previos a la I sostenida. Se agregó 5-hidroxicanoato 100µM (HD) 5 min antes del PC para bloquear los K-ATP. La contractilidad se evaluó con el producto Presión sistólica x Frecuencia (Px F) y la contractura con la presión diastólica final (PDF). La permeabilidad mitocondrial se evaluó con la técnica de atrapa-miento de (3)H-desoxiglucosa (DG). Los corazones fueron cargados con DG (30 min), seguidos de 13 min con medio sin DG, previos a la I-RP. La DG entra al miocito, es convertida en DG-6P y no es metabolizada. Sólo penetra a la mitocondria cuando se altera la permeabilidad de la membrana interna y sólo abandona la célula cuando ocurre necrosis. La VC se midió con el método del para-feniltetrazolio. El HD revirtió los efectos del PC sobre la contractilidad (Px F, RP-15 min: Control (C): 49±7, PC: 81±12, PC-HD 37±11%, PDF, RP-5 min: C: 39±10, PC: 4±2, PC-HD: 46±13%) y sobre la preservación isquémica del glucógeno (a los 25 min de I: C:78±21, PC:184±31, PC-HD:91±19 µg/100mg peso seco). No revirtió los efectos del PC sobre la preservación de la permeabilidad mitocondrial (captación de DG: C:96±14, PC: 16±12, PC-HD:10±8 10(5) x dpm mitocondrial/unidad de citrato sintetasa/dpm totales/gh). Tampoco revirtió la reducción de la necrosis celular (10(3)x dpm totales/gh: C:51±4, PC:93±6, PC-HD:74±2), resultados similares a los obtenidos con la técnica del para-feniltetrazolio (C: 21±6, PC: 60±8, PC-HD: 58±10 %VC). Se concluye que los K-ATP no intervienen en todos los mecanismos responsables de la protección ejercida por el PC.

465. (12282) BLOQUEO ALFA-2 ADRENÉRGICO EN HIPOTÁLAMO ANTERIOR DE RATAS CON SOBRECARGA DIETARIA DE FRUCTOSA. MAYER, MARCOS; HOCHT, CHRISTIAN; OPEZZO, JAVIER; TAIRA, CARLOS; PEREDO, HORACIO; FERNÁNDEZ, BELISARIO; PUYÓ, ANA

Cát. de Fisiopatología y Anat. Macro y Microscópica. FFYB - UBA

Una dieta rica en fructosa (fru) produce en la rata insulino-resistencia e hipertensión arterial. En trabajos previos encontramos

alteraciones en el metabolismo hipotalámico de la noradrenalina (NA) en este modelo. A nivel del hipotálamo anterior (HA), la NA ejerce un efecto simpatoinhibitorio al actuar sobre receptores alfa2. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación de los receptores alfa2 adrenérgicos de HA en el control de la presión arterial (PA) y la neurotransmisión aminérgica en ratas hipertensas por sobrecarga de fru. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho. Se dividieron en dos grupos: F: fru 10% P/V y dieta estándar durante 6 semanas; C: dieta y bebida estándar. Se registró la PA indirecta: (mmHg, F: 132 ± 4 vs C 114 ± 2, p<0,01, n=8 y 8); Se canuló una arteria carótida para la medición de la PA media (PAM) y se colocó una sonda de microdialisis concéntrica en el HA para la perfusión intrahipotalámica de yohimbina, bloqueante alfa2 (YOH) (10 y 100 µg/ml), y la recolección simultánea del metabolito de la dopamina, DOPAC, en dializados. La perfusión de YOH en HA indujo un incremento en la PAM en C (YOH 10 µg/ml: DPAM:9±1 mmHg; YOH 100 µg/ml: DPAM: 11± 2mmHg; p<0.05 vs. F) pero no modificó los valores basales de PAM en las ratas tratadas con fru (YOH 10 µg/ml: DPAM: -2± 2mmHg YOH 100 µg/ml DPAM: 1± 2mmHg, NS). En C, no se observaron diferencias en el efecto presor de la YOH en las distintas dosis estudiadas. El bloqueo alfa2 adrenérgico hipotalámico indujo un incremento en los niveles de DOPAC en los dializados hipotalámicos de ratas C a ambas dosis, pero no modificó significativamente los niveles en F (YOH 10 µg/ml: C: DOPAC: 137±7%; p<0.05 vs. Basal; F: DOPAC: 120±10% NS; YOH 100 µg/ml: C: DOPAC: 134±10% p<0.05 vs. Basal; F: DOPAC: 116±5% NS). La perfusión de YOH no modificó los niveles de DOPAC en dializados ni la PAM en F. Estos resultados podrían deberse a la existencia de un menor tono alfa2 hipotalámico en este grupo.

466. (12370) RELACION ENTRE LA DISMINUCION DEL DNA MITOCONDRIAL Y EL PESO AL NACER: PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MITOCONDRIAL A. GEMMA, CAROLINA; SOOKOIAN, SILVIA; ALVARIÑAS, JORGE; GARCIA, SILVIA; QUINTANA, LUIS; KANEVSKY, DIEGO; GONZALEZ, CLAUDIO; PIROLA, CARLOS JOSE

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, UBA. Policlinico Bancario.

Tanto el bajo peso al nacer como el alto peso constituyen dos extremos de crecimiento fetal anormal. La participación de las mitocondrias en la regulación del crecimiento intrauterino es un aspecto poco explorado a pesar que el contenido del DNA mitocondrial (mtDNA) es vital para el mantenimiento de las funciones mitocondriales y las demandas de energía corporales. Postulamos que la relación DNAm/DNA nuclear (Rel) podría estar vinculada con el peso al nacer, para lo que nos propusimos: 1-evaluar los cambios cuantitativos en la Rel mediante PCR en tiempo real (ambos DNAs se purificaron de una muestra de cordón umbilical) y su relación con el peso al nacer en una población de 72 recién nacidos, 45 con normopeso (RNPN) y 27 con peso anormal para la edad gestacional según percentilo (16 bajo peso (RNBP), 11 alto peso (RNAP) y 2-Relacionar los hallazgos de la Rel con un SNP (G/C rs 11006128) en uno de los genes que participan en la biogénesis mitocondrial: el factor de transcripción mitocondrial A (Tfam). Resultados: La Rel (media ±ES) tanto en los de RNBP (18±6.5) como los RNAP (9±8) fue significativamente menor (ANOVA aplicada al log. de la Rel, p<0.03) que en los RNPN (28±4). Como grupo los homocigotas para la variante G del Tfam poseen niveles menores de la Rel (21±3, n=60) vs los heterocigotas GC (49±15, n=13, p<0.0001, Mann-Whitney-U-test). Conclusiones: Es sabido que factores que actúan tempranamente en el desarrollo del recién nacido, durante el periodo fetal y en la infancia, participan en la etiopatogenia del síndrome metabólico. De hecho, las tasas de diabetes en las personas que presentaron bajo y alto peso al nacer son casi el doble de la encontrada entre aquellos con peso normal. Nuestra observación sugiere la participación de la biogénesis mitocondrial en el desarrollo de las alteraciones del crecimiento fetal como

factor predictivo del desarrollo de enfermedades en la edad adulta.

467. (12516) INFLAMACIÓN ARTERIAL EN HIPERTENSIÓN ASOCIADA A INSULINO-RESISTENCIA. RENNA, N; LAMA, C; OJEDA, S; CRUZADO, M; RISLER N; MIATELLO, R

Depto. Patología F.C.Médicas U.N.Cuyo. IMBECU-CONICET. Mendoza

El objetivo fue examinar la expresión de factores de transcripción nuclear redox sensibles en arterias renales en modelos de hipertensión genética asociada a síndrome metabólico. El diseño incluyó 4 grupos de ratas: se administró fructosa (10%) en el agua de bebida a ratas WKY (FFR) y a ratas SHR (FFSHR), y se compararon con controles que recibieron sólo agua. Se registró la presión sistólica (PAS) y al finalizar el período experimental de 10 semanas se determinaron lipoperoxidación en plasma (TBARS), resistencia a la insulina (HOMA), trigliceridemia (TG), y colesterol-HDL sérico. Se diseccionó el riñón izquierdo y cortó en criostato para la determinación por inmunohistoquímica de VCAM-1, NF-kB (p65) y AP-1 (c-fos) evaluados por densitometría (unidades arbitrarias). Los datos (media±sem) se procesaron por ANOVA y post test SNK. Los símbolos indican * p<0.05 v WKY; ° p<0.05 v SHR; # p<0.05 v FFR.

Variables	WKY (n=8)	SHR (n=8)	FFR (n=8)	FFSHR (n=8)
HOMA (µU/mL, mg/dL)	4.32 ± 0.08	7.20 ± 0.09 *	11.93 ± 0.07 °°	14.09 ± 0.45 °°#
TBARS (µmol/L)	0.99 ± 0.02	1.67 ± 0.05 *	2.17 ± 0.04 °°	2.70 ± 0.04 °°#
PAS (mmHg)	125.0 ± 2.7	164.3 ± 3.0 *	132.1 ± 0.9 °°	171.4 ± 1.7 °°#
TG (mg/dL)	67.3 ± 2.6	64.2 ± 3.8	163.4 ± 5.1 °°	168.8 ± 5.4 °°
Col-HDL (mg/dL)	23.5 ± 0.7	19.3 ± 0.9 *	12.2 ± 0.8 °°	13.6 ± 1.3 °°
VCAM-1 (ua)	27.3 ± 2.7	46.4 ± 3.6 *	77.8 ± 4.5 °°	85.26 ± 5.0 °°
NF-kB (ua)	46.6 ± 2.8	61.0 ± 5.1 *	66.7 ± 4.8 *	82.3 ± 2.0 °°#
c-fos (ua)	18.9 ± 2.7	31.3 ± 1.2 *	38.3 ± 1.3 °°	49.2 ± 2.3 °°#

Los datos confirman el desarrollo del modelo experimental patológico y sugieren que el estrés oxidativo y la consecuente activación de genes que participan en el proceso inflamatorio intervienen activamente en el daño de órgano blanco a nivel vascular en esta patología.

468. (12522) DEHIDROLEUCODINA INHIBE EN G2, LA PROLIFERACIÓN DE MIOCITOS INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II. CRUZADO, MONTSERRAT; LÓPEZ, LUIS ALBERTO

Area de Química Biológica. Departamento de Morfofisiología. Facultad de Ciencias Médicas. U.N.Cuyo. Laboratorio de Citoesqueleto y Ciclo Celular, IHEM-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

Angiotensina II (Ang II) es un potente estimulador de la proliferación celular y juega un papel importante en la hipertensión arterial. En esta última situación estimula la proliferación de los miocitos de la pared de los vasos sanguíneos. Dehidroleucodina (DhL), es una lactona sesquiterpénica que inhibe la proliferación de miocitos estimulados con 10 % de suero fetal bovino (SFB). En este trabajo se analizó el efecto de DhL en la proliferación de miocitos de ratas hipertensas estimulados con Ang II. Cultivos de miocitos de aortas de ratas espontáneamente hipertensas mantenidos en quiescencia con 0,1 % SFB fueron tratados sin y con 10⁻⁷ M Ang II en ausencia y presencia de 0,2 µM de DhL. Se determinó la incorporación de timidina-H3 (T- H3) a las 24 h de cultivo y el número de células a las 48 h. Se comprobó que las células cultivadas en 0,1 % SFB incorporaron 1 ± 0,1 x 10⁶ cpm / mg prot, mientras que las tratadas con Ang II y Ang II + DhL incorporaron 2,7 ± 0,2 x 10⁶ cpm / mg prot y 2,8 ± 0,3 x 10⁶ cpm / mg prot respectivamente. A las 48 h de cultivo en 0,1 % SFB se encontraron 1,4 ± 0,2 x 10⁵ células / well, y en las tratadas con Ang II y Ang II + DhL, 1,8 ± 0,1 x 10⁵ células / well y 1,4 ± 0,1 x 10⁵ células / well respectivamente. Los resultados indican que los miocitos en presencia de Ang II + DhL son estimulados a prolifera-

rar, completan la fase S, pero luego se detienen en G2. Es interesante destacar que en la cascada de señales que estimulan la proliferación de miocitos por Ang II, participa el factor nuclear NF - kappa B que al ingresar al núcleo induce la expresión de varios protooncogenes. Por otro lado se ha postulado que las lactonas sesquiterpénicas inhiben la activación de NF- kappa B. Los resultados presentados no confirman la hipótesis de que Ang-II y DhL estén actuando sobre el mismo efector.

469. (12627) PERFILES DE SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS Y SU RELACIÓN CON LOS CAMBIOS MORFOMÉTRICOS DE LOS CARDIOMIOCITOS EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL. CAVALLERO, SUSANA (1); PEREZ, S. (2); GONZALEZ, G. (2); CANESSA, O.(1); MORALES, C. (2); GELPI, R.J. (2); HERTIG, C.M.(3); FERNANDEZ, B.E.(1)

(1) Cát. de Fisiopatología, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA. (2) Inst. Fisiopatología Cardiovascular, Depto. Patología, Fac. Medicina, UBA. (3) INGEPI-CONICET.

Se continuó caracterizando parámetros hormonales y morfológicos de la hipertrofia de miocardio en modelos de hipertensión renovascular (RV) y DOCA-sal (DS) asociados sucesivamente en secuencias diferentes. Se estudiaron ratas SD con RV y DS de 2 y 4 semanas y combinados RV/DS y DS/RV y sus sham (Sh). La presión sistólica (PS) y el índice peso corazón/corporal aumentaron en todos los grupos. Habíamos observado que el ANF y el pro-ANF plasmático aumentaron a las 2 y 4 semanas, con mayor incremento en DS/RV. El diámetro de los miocitos (DM, análisis de imágenes) aumentó en el ventrículo izquierdo (VI) a las 2 y 4 semanas (µm±ES, n=4-5, Sh2: 13,6±0,3; Sh4: 14,8±0,4; RV2: 16,4±0,3*°; DS2: 16,8±0,6*°; RV4: 18,5±0,3#; DS4: 17,5±0,2#; RV/DS: 16,5±0,7#&; DS/RV:18,2±0,4#; *p<0,01 vs Sh2, #p<0,001 vs Sh4, &p<0,05 vs RV4). La longitud de los miocitos aislados (LM) del VI se incrementó sólo en el grupo DS4 (µm±ES, n=4-5, Sh: 116,4±2,2; RV2: 123,5±5,4; DS2: 123,6±3,4; RV4: 134,9±4,3; DS4: 157,3±9,8*°; RV/DS: 136,2±3,5; DS/RV:135,6±3,1; *p<0,01 vs Sh4). El cociente LM/DM fue mayor en RV/DS que en DS/RV (RV/DS: 8,5±0,3; DS/RV: 7,5±0,4). La expresión de ARNm de ANF en VI aumentó a las 4 semanas en los grupos DS4 y combinados RV/DS y DS/RV mientras que la expresión no se modificó en aurículas izquierda ni derecha. Estos resultados sugieren que el patrón de remodelado cardíaco en los modelos combinados RV/DS y DS/RV es diferente según la secuencia de inducción de las sobrecargas, siendo la sobrecarga instaurada más recientemente la que determina la evolución del proceso hipertrófico concéntrico/excéntrico. Los perfiles morfométricos se relacionan más con la evolución de la producción de péptidos natriuréticos y la función paracrina del corazón que con la secreción de ANF y la función endocrina del mismo.

HEMATOLOGIA

470. (11860) LA GLICINA AUMENTA LA ENTRADA DE CALCIO EN PLAQUETAS HUMANAS. GENDE, OSCAR ALFREDO

Centro Investigaciones Cardiovasculares

En trabajos anteriores demostramos una reducción en el cambio de concentración de calcio intracelular, [Ca²⁺]_i, en respuesta a trombina en plaquetas sanguíneas suspendidas en soluciones hiperosmóticas de NaCl, sacarosa o manitol. En contraposición a otras soluciones hiperosmóticas, las soluciones con glicina preservan íntegramente la función del sistema hemostático. El objetivo de este trabajo fue investigar si la presencia de glicina alteraba significativamente [Ca²⁺]_i en respuesta a trombina. Plaquetas aisladas y cargadas con el indicador fluorescente FURA 2 se suspendieron en soluciones salinas a pH 7.4 en las que se reemplazó NaCl por glicina sódica titulada, NaGly, o se agregó glicina base, Gly. El símbolo {} encierra comparaciones donde la prueba

de "t" apareada mostró $P < 0.05$. En soluciones con $[Ca^{2+}]_o = 1$ mM, trombina 0.1 UI produjo un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ que fue mayor cuando se reemplazó el NaCl por NaGly $\{371 \pm 25$ nM vs 409 ± 19 nM}. En soluciones con $[Ca^{2+}]_o = 0$ mM, trombina 0.1 UI produjo una movilización de $[Ca^{2+}]_i$ similar, pero el cambio posterior a $[Ca^{2+}]_o = 1$ mM produjo una entrada del ion que fue menor en el control que en NaGly $\{238 \pm 27$ nM vs 334 ± 22 nM}. El agregado de 50 mM Gly también aumentó la entrada de calcio provocada por trombina $\{255 \pm 29$ nM vs 287 ± 28 nM} aun en presencia de apyrasa $\{108 \pm 8$ nM vs 130 ± 11 nM}. El efecto de Gly sobre la entrada de ion bivalente fue confirmada por el aumento en la pendiente de apagamiento de fluorescencia provocada por entrada de Mn^{2+} en presencia de apyrasa $\{79 \pm 23$ vs 140 ± 27 unidades arbitrarias}. Se concluye que en las plaquetas sanguíneas la glicina es capaz de aumentar la entrada de calcio provocada por agonistas. Diversos órganos, entre ellos el hígado, el intestino, el riñón, el corazón y el músculo esquelético, son protegidos por glicina de la injuria provocadas por sepsis, shock hemorrágico o isquemia-reperfusion. La inclusión de glicina en soluciones de resuscitación daría una protección adicional frente a una respuesta inflamatoria sistémica sin deteriorar al sistema homeostático.

471. (12171) APOPTOSIS DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES EN MEDIO ÁCIDO. REGULACIÓN POR PLAQUETAS Y DROGAS ANTIINFLAMATORIAS. MALAVER, ELISA; NEGROTTO, SOLEDAD; PACIENZA, NATALIA; D'ATRI, PAOLA; POZNER, ROBERTO; GOMEZ, RICARDO (2); SCHATTNER, MIRTA

Academia Nacional de Medicina. (2) Universidad Nacional de La Plata

Previamente se ha demostrado que las plaquetas (PL) ejercen un efecto antiapoptótico sobre los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Considerando que en condiciones proinflamatorias existe un microambiente ácido, estudiamos el efecto de las PL sobre la apoptosis de PMN en medio ácido y la acción de drogas antiinflamatorias. Los PMN obtenidos de donadores sanos fueron aislados por sedimentación con Dextrán y resuspendidos en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino 2%. La apoptosis fue evaluada 18 hs después por microscopía de fluorescencia. La acidificación del medio extracelular (pH 6.5) produjo una inhibición significativa de la apoptosis de los PMN con respecto al control (48 ± 6 vs $68 \pm 4\%$ de apoptosis, $p < 0.05$ $n=10$). La presencia de PL mostró un efecto antiapoptótico similar (49 ± 7 , $p < 0.05$ $n=10$) que fue potenciado en condiciones ácidas (40 ± 3 , $p < 0.05$, $n=10$). La inhibición mediada por PL o el medio ácido no se observó luego de 36 hs ($n=3$). El pretratamiento con antiinflamatorios como aspirina (2 mM) y salicilato de sodio (2 mM) suprimió el retraso en la muerte de los PMN mediada por la acidificación del medio (64 ± 5 ; 64 ± 3 $n=5$) o por la presencia de PL (59 ± 9 ; 63 ± 9). La acción de los salicilatos no sería debido a la inhibición de la ciclooxigenasa ya que el tratamiento con un inhibidor estructuralmente no relacionado como la indometacina (1-50 μ M) no produjo ningún efecto ($n=3$). Estos resultados demuestran que en condiciones proinflamatorias las PL y el medio ácido sinergizan para prolongar la vida de los PMN y además revelan un nuevo mecanismo por el cual los salicilatos ejercen su acción antiinflamatoria.

472. (12374) LOS MONOCITOS SON LA PRINCIPAL FUENTE DE RECEPTOR SOLUBLE DE IL-6 ENTRE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL. GOETTE, NORA; MARTA, ROSANA; CHAZARRETA, DANIEL; GLEMBOTSKY, ANA; MOLINAS, FELISA

Hematología Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

La trombocitemia esencial es una enfermedad que se caracteriza por hiperplasia de la serie megacariocítica y trombocitosis.

Previamente demostramos que estos pacientes presentan un aumento del receptor soluble de IL-6 (IL-6sR) en plasma y en sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). En el presente trabajo estudiamos qué tipo celular dentro de las CMSP es el responsable del aumento. Dado que uno de los mecanismos que da origen al IL-6sR es el clivaje proteolítico del receptor de membrana (CD126), se estudió la expresión del mismo antes y después del cultivo en los monocitos. Se estudiaron nueve pacientes y nueve controles normales. A partir de las CMSP se aislaron los monocitos por separación inmunomagnética (fracción CD14 positiva) y los linfocitos (fracción negativa). Se evaluó la expresión del CD126 antes y después del cultivo así como la viabilidad y la pureza por citometría de flujo. Se determinó el IL-6sR liberado en el sobrenadante del cultivo de 24 hs en ambas fracciones por técnica de ELISA. En algunos pacientes también se cultivaron las CMSP, registrándose el porcentaje de CD14 en cada caso. El IL-6sR liberado por los monocitos de los pacientes fue mayor que los controles, 730.3 ± 288.4 pg/ml y 447.3 ± 253.0 pg/ml, respectivamente, (media y DS), $p=0.04$. La liberación de IL-6sR de la fracción negativa fue despreciable respecto a la CD14 positiva (pacientes, 17.6 ± 11.5 pg/ml y normales, 14.8 ± 12.9 pg/ml). Cuando se evaluó el IL-6sR liberado en CMSP, se observó que el resultado era mayor que el esperado para el porcentaje de monocitos ($n=5$). La expresión del CD126 fue similar en los pacientes y en los controles. En conclusión, los monocitos son los mayores contribuyentes en el aumento de los niveles de IL-6sR en cultivo de CMSP de pacientes con TE, por lo que serían una de las fuentes del incremento de IL-6sR en el plasma. La interacción de monocitos y linfocitos favorecería la producción de IL-6sR.

473. (12477) SINDROME DE VON WILLEBRAND ADQUIRIDO EN TROMBOCITEMIA ESENCIAL. GLEMBOTSKY, ANA; SALIM, JUAN; CORREA, GABRIEL; GOETTE, NORA; LAGUNA, MARÍA; MONTERO, VERÓNICA; MARTA, ROSANA; MOLINAS, FELISA

Hematología Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

El síndrome de von Willebrand adquirido (SvWA) es un desorden que presenta hallazgos de laboratorio similares al síndrome congénito. Por otra parte, las complicaciones hemorrágicas en la trombocitemia esencial (TE) están asociadas a recuentos plaquetarios mayores a $1000 \times 10^9/L$. El objetivo del trabajo fue evaluar la presencia de SvWA en una población de pacientes con TE y correlacionarla con los datos clínicos. Se estudiaron 26 pacientes, antes del tratamiento con anagrelide; y 17 de ellos en remisión hematológica. Ningún paciente tenía historia personal o familiar de anomalía del factor von Willebrand (FvW). Se evaluó el nivel del FvW antigénico (FvW:Ag) (VN: 50-150%) y cofactor de Ristocetina (Co:Ris) (VN: 60-160%); por técnicas convencionales. Antes de iniciar el tratamiento 12/26 pacientes no tuvieron evidencias de SvWA: FvW:Ag: $93.2 \pm 44.2\%$; Co:Ris: $70.1 \pm 14.6\%$ (media \pm DS); 12/26 pacientes presentaron patrón tipo IIa de SvWA, FvW:Ag normal $69.6 \pm 19.2\%$ y disminución del Co:Ris $31 \pm 16.3\%$; relación Co:Ris/FvW:Ag: 0.44 ± 0.15 . Dos de 26 pacientes presentaron patrón tipo I de SvWA (FvW:Ag: 48 y 46% y Co:Ris: 38 y 53% respectivamente). El recuento de plaquetas fue significativamente más elevado en el grupo de pacientes tipo IIa que en los que no presentaban anomalía del FvW ($p=0.043$). De los 17 pacientes evaluados durante la remisión hematológica, 6 pertenecían al grupo sin anomalía de FvW, 10 al tipo IIa y 1 al tipo I. De los 10 pacientes con patrón tipo IIa, 8 normalizaron los parámetros alterados: Co:Ris: $73.9 \pm 43.5\%$; relación Co:Ris/FvW:Ag: 0.92 ± 0.21 . El paciente con patrón tipo I que se evaluó durante el tratamiento, normalizó los parámetros medidos, FvW:Ag 62% y Co:Ris 93%. En conclusión, 14/26 pacientes con TE presentaron SvWA y 9/11 normalizaron los parámetros durante la remisión hematológica. No se halló relación entre la presencia de SvWA y los eventos hemorrágicos en este grupo de pacientes.

474. (12499) RECEPTOR SOLUBLE DE IL-6 Y SU EFECTO PROTECTOR SOBRE LA MUERTE DE LAS STEM CELLS HEMATOPOYÉTICAS. CHAZARRETA, CARLOS DANIEL; MARTA, ROSANA FERNANDA; GOETTE, NORA PAULA; MOLINAS, FELISA CONCEPCIÓN

Laboratorio Hematología Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. UBA

La interleuquina 6, una citoquina con acción estimulante de la megacariocitopoyesis, ejerce su efecto por unión a su receptor específico, IL-6Ra, anclado en la membrana de células blanco y/o a la fracción soluble del mismo (IL-6sR). Tanto el complejo formado por la IL-6 con el receptor anclado (IL-6/IL-6Ra) como con el receptor soluble (IL-6/IL-6sR), interactúan con una glicoproteína de 130 Kd que se encuentra en la membrana de la mayoría de las células, y transduce la señal al interior celular. Se postuló que el efecto estimulante de ésta citoquina en la megacariocitopoyesis se debe, principalmente, a la acción del complejo IL-6/IL-6sR. En el presente trabajo nos propusimos evaluar el rol de dicho complejo en la protección de la muerte en células madre hematopoyéticas (CD34+). Para ello se trabajó con células CD34+ obtenidas de sangre de cordón umbilical por marcación inmunomagnética y posterior selección positiva (Miltenyi). En ellas se evaluó la presencia del IL-6Ra por citometría de flujo usando anti CD126-PE. Las células se cultivaron en medio IMDM deprivado de glutamina, durante 12 hs a 37° en 5% CO₂, con o sin el suplemento de trombopoyetina (TPO) 100 ng/ml (como control de protección de muerte), IL6 100 ng/ml, o IL6 100 ng/ml + IL6sR 200 ng/ml. Al finalizar los cultivos se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células muertas usando yoduro de propidio y el porcentaje de apoptosis por unión de Anexina V a la membrana. Las CD34+ fueron negativas o débilmente positivas para IL-6Ra (0-2.5%). El porcentaje de células muertas en presencia del complejo IL-6/IL-6sR (41.25±26.23) fue significativamente menor que con IL-6 sola (50.46±24.64) p<0.05, comportándose de manera similar a las células tratadas con TPO (43.08±20.74) p=0.83. La unión de Anexina V fue semejante en todos los grupos. En conclusión, la presencia de IL-6sR posibilita la acción de IL-6 sobre las CD34+, en las que la expresión de IL-6Ra es baja o está ausente, retardando la muerte celular.

475. (12690) EVOLUCION DE LAS MANIFESTACIONES CLINICAS (MC) Y PRUEBAS DE FUNCION PLAQUETARIA (FP) EN PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL (TE) TRATADOS CON ANAGRELIDE (A). VASSALLU, PATRICIA SANDRA; NORA, GOETTE; GLEMBOTSKY, ANA; HELLER, PAULA; KORNBLIHTT, LAURA; LEV, PAOLA; DANIEL, CHAZARRETA; SALIM, JUAN; LAGUNA, MARIA S; MARTA, ROSANA; MOLINAS, FELISA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Facultad de Medicina. UBA

Los pacientes con TE pueden tener anomalías de la función plaquetaria (FP), las más frecuentes son disminución de la agregación inducida por ADP y epinefrina, y la presencia de agregación espontánea (AE). El A es un inhibidor de la fosfodiesterasa y puede inhibir la FP. Objetivo: evaluar la evolución de las MC y la FP en pacientes con TE antes y durante la remisión hematológica (RH). Población: 42 pacientes (33/9, F/M) con TE, estudiados antes del tratamiento con A y en RH. Las MC fueron clasificadas en: trombosis (T), hemorragias (H), alteración de la microcirculación (AM), y mixtas (M) que incluyen H más AM o H más T. Las pruebas de FP se realizaron con epinefrina, ADP, ristocetina, ácido araquidónico, y factor von Willebrand bovino. Resultados: MC pre A: asintomáticos (As)16, T6, H5, AM10, M5; MC en RH: As18, T2, H4, AM17, M1; FP pre A: AE17/42, alteración de respuesta a epinefrina(AE) 26/41, respuesta anormal al ADP(RAADP)17/41; FP en RH: AE 1/41, RAE 12/42,RAADP 9/41. Durante RH la AE desapareció en todos los pacientes excepto uno. La RAE desapareció en 16 pacientes, no corrigió en 10 y apareció en 2 previamente normales. La RAADP desapareció en 4 casos y apareció

en 5 casos previamente normales. No se encontró correlación entre la presencia de AE y las MC, p=NS, ni entre la alteración de las respuestas tanto a la epinefrina y el ADP en relación a las H. No hubieron alteraciones significativas en las respuestas con los otros agonistas antes y durante el tratamiento con A. En este grupo de pacientes con TE la FP no fue afectada por la actividad inhibitoria de la fosfodiesterasa del A. Las manifestaciones hemorrágicas no empeoraron durante el tratamiento. Como previamente mostramos la AE desapareció en todos los pacientes excepto 1. Aún no tenemos explicación para el incremento de las AM durante el tratamiento.

476. (12703) QUIMOQUINAS HEMATOPOYÉTICAS: DESREGULACIÓN EN EL EJE SDF-1/CXCR4 EN PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL. SALIM, JUAN P; MARTA, ROSANA F; MOLINAS, FELISA C

Hematología Investigación-Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari

Se demostró que algunas quimoquinas como la interleuquina 8 (IL-8) y el GRO-a, cumplen una función inhibitoria de la proliferación del linaje megacariocítico. En cambio el stromal derived factor 1 (SDF-1) regula el proceso de migración transendotelial del megacariocito maduro favoreciendo la producción de plaquetas. La trombocitemia esencial (TE) es un desorden mieloproliferativo crónico caracterizado por aumento de megacariocitos y plaquetas cuyo mecanismo patogénico aún no se conoce. En el presente estudio se evaluó en pacientes con TE, el nivel plasmático de IL-8, GRO-a y SDF-1 y sus receptores en la membrana plaquetaria. Se estudiaron 27 pacientes (edad media 45, 21 mujeres) diagnosticados según el Policitemia Vera Study Group y un grupo control apareado por edad y sexo. Los niveles plasmáticos de IL-8, GRO-a y SDF-1 se determinaron por ELISA (R&D Systems). La expresión de receptores para IL-8 (CXCR1 y CXCR2), GRO-a (CXCR2) y SDF-1 (CXCR4) se analizaron por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales con sus controles isotípicos (B-D Pharmingen). Los resultados se expresaron como la relación entre la intensidad de fluorescencia específica y el control isotípico (RIF), en mediana y rango. Los niveles plasmáticos de las quimoquinas en los pacientes no difirieron de los del grupo control, IL-8, 2.5 pg/ml (0.8-28.2) y 2.8 pg/ml (1.1-16.5), GRO-a, 30.0 pg/ml (7.4-463.1) y 23.9 pg/ml (9.6-148.0), SDF-1, 1895.0 pg/ml (1246.0-2719.0) y 1915.0 pg/ml (822.0-2484.0), respectivamente. La expresión del receptor CXCR4 se encontró disminuida en las plaquetas de los pacientes, RIF: 16.94 (1.3-31.3) vs grupo control, 27.4 (2.4-58.4) p=0.0059, n=10 (rangos señalados de Mann-Whitney). En cambio la expresión de los receptores CXCR1 y CXCR2 fue normal. En conclusión, si bien el nivel de quimoquinas plasmáticas es normal, la disminución de los receptores CXCR4 para SDF-1 en plaquetas sugiere una desregulación del eje SDF-1/CXCR4 en pacientes con TE.

477. (12732) CARACTERIZACIÓN Y SUCEPTIBILIDAD APOPTOTICA DE UNA LÍNEA TUMORAL LINFOIDE.

CAVALIERE, VICTORIA; GLICKMAN, ARIEL; SOLARI, LILIANA (1); GAMMELLA, DANIEL (1); LARRIPA, IRENE (2); GREZANIK, SOFÍA; HAJOS, SILVIA; ÁLVAREZ, ÉLIDA

Inmunología-IDEHU, Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA. (1) Hospital Dr. Alejandro Posadas (2) Academia Nacional de Medicina

La apoptosis es un proceso fisiológico crítico para el crecimiento celular. Está regulada por un delicado equilibrio entre factores pro y antiapoptóticos. Defectos en su control llevan frecuentemente a una ventaja selectiva en la sobrevida celular favoreciendo el desarrollo de patologías neoplásicas. NFkB puede promover la proliferación celular por lo que el uso de inhibidores selectivos lleva a un aumento de la apoptosis. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la línea celular PL104, obtenida de una muestra de médula ósea de una paciente con diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA) y evaluar su susceptibilidad frente a los

quimioterápicos Doxorubicina (DOX), Vincristina (VCR) y los inhibidores de NFκB CAPE y MG-132. El fenotipo evaluado por citometría de flujo resultó positivo para CD19, CD20, CD22, CD38, CD45, CD79a, HLA-DR y cadena lambda. El cariotipo fue 46 XX, Phi- por FISH y BCR/ABL- por PCR. No se hallaron mutaciones en los oncogenes N-ras y FLT3. La apoptosis evaluada por tinción con bromuro de etidio-naranja de acridina para CAPE, MG-132, DOX y VCR a las 24h de tratamiento fue de $77.1 \pm 5.7\%$, $92.8 \pm 2.9\%$, $28.9 \pm 1.9\%$ y $47.0 \pm 2.7\%$ ($p < 0.001$) respectivamente versus $6.6 \pm 0.2\%$ para las células sin tratar, datos confirmados por Annexin-V. Se verificó el efecto de estos compuestos sobre la proliferación celular mediante la incorporación de ^3H timidina resultando a las 24h en un $0.7 \pm 0.2\%$, $0.7 \pm 0.3\%$, $5.2 \pm 0.7\%$ y $42.8 \pm 3.6\%$ ($p < 0.001$) de sobrevida para CAPE, MG-132, DOX y VCR. La expresión de proteínas involucradas en la muerte-sobrevida celular por Western blot mostró una disminución en la expresión de Survivina y un aumento en la expresión de Bax tanto para CAPE como MG-132. Concluimos que la línea PL104 derivada de una LMA corresponde a linfocitos B plasmocitoides sensibles a la apoptosis inducida por los compuestos estudiados a través de la modulación de IAPs (Survivina) y proteínas de la familia Bcl-2.

478. (12763) REGULACION DE LA SOBREVIDA DE CELULAS MADRES HEMATOPOYETICAS MEDIADA POR AMPc. PACIENZA, NATALIA; NEGROTTI, SOLEDAD; D'ATRI, PAOLA; MALAVER, ELISA; POZNER, ROBERTO; TORRES, OSCAR; LAZZARI, MARIA; GÓMEZ, RICARDO (2); SCHATNER, MIRTA

Academia Nacional de Medicina. (2) Universidad Nacional de La Plata

Previamente demostramos que el AMPc inhibe la apoptosis de células madres hematopoyéticas (CD34+ derivadas de cordón umbilical humano) inducida por privación de suero (SS) inhibiendo la activación de caspasa-3 y la downregulation de Bcl-xL. En este trabajo profundizamos las vías de señalización involucradas. La apoptosis se evaluó luego de 48 horas por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. La SS durante 15 hs provocó un aumento en el porcentaje de células con disrupción de la membrana mitocondrial (C: 6 ± 2 , SS: 34 ± 3 , BIMPS: $3 \pm 1\%$, $p < 0.05$, $n=3$) que fue completamente inhibido por el análogo de AMPc, BIMPS ($5 \mu\text{M}$). La inhibición de la PKA con Rp-cAMP ($50 \mu\text{M}$) suprimió la acción antiapoptótica del AMPc (C: 11 ± 1 , SS: 44 ± 2 , BIMPS+SS: 28 ± 1 , Rp-cAMP+BIMPS+SS: $41 \pm 2\%$ de células apoptóticas, $p < 0.05$, $n=4$). El pretratamiento con inhibidores específicos de la PI3K como LY294002 ($10 \mu\text{M}$) y Wortmanina ($0.1 \mu\text{g/ml}$) mostraron resultados similares (47 ± 3 , $42 \pm 1\%$, $p < 0.05$, $n=4$). Por otro lado, la vía de las MAPK no participaría ya que el inhibidor PD098059 ($1-100 \mu\text{M}$) no tuvo efecto. Considerando que TPO y G-CSF promueven la sobrevida celular, evaluamos el papel del AMPc como mediador de este proceso. Mientras que el BIMPS potenció la citoprotección mediada por TPO (20 ng/ml) y G-CSF (20 ng/ml) (C: 11 ± 1 , SS: 47 ± 4 , TPO+SS: 20 ± 2 , G-CSF+SS: 22 ± 2 , BIMPS+SS: 28 ± 3 , TPO+BIMPS+SS: $11 \pm 1\%$, G-CSF+BIMPS+SS: $10 \pm 1\%$, $p < 0.05$, $n=6$), la inhibición de la adenilato ciclasa con SQ 22536 disminuyó significativamente la acción antiapoptótica de ambos (TPO: 44 ± 4 , G-CSF: $42 \pm 5\%$, $p < 0.05$, $n=6$). Sin embargo, la TPO o el G-CSF no aumentaron los niveles de AMPc intracelulares ($n=3$). La activación de la PKA y PI3K así como la inhibición de la pérdida de potencial de membrana de la mitocondria forman parte de la vía antiapoptótica del AMPc y señalan que la citoprotección mediada por TPO y G-CSF requiere de niveles basales de este nucleótido.

REPRODUCCION B

479. (12297) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CASPASA-3 POR TRATAMIENTO CON ANÁLOGOS DE GNRH.

PARBORELL, FERNANDA; ABRAMOVICH, DALHIA; TESONE, MARTA

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), Buenos Aires, Argentina.

En estudios previos, demostramos en folículos preovulatorios (FPO) un efecto apoptótico folicular de agonistas de GnRH mediado por un desbalance en proteínas anti-apoptóticas: pro-apoptóticas (Bcl-xL/Bcl-xS), y un aumento en la traslocación de Bax a mitocondria. Para dilucidar si estos cambios tienen un efecto sobre la cascada de caspasas, se decidió evaluar los niveles y la localización de la principal efectora: caspasa-3. Ratas prepúberes superovuladas con eCG (grupo control) se inyectaron durante 48 hs, cada 12 hs con GnRH-a (agonista, Acetato de Leuprolide, $1 \mu\text{g/rat/day}$, grupo LA) y/o GnRH-ant (antagonista, Antide, $10 \mu\text{g/rat/day}$; grupo LA+Ant o grupo Ant). FPO sanos se aislaron por microdissección. Las proteínas de FPO se aislaron para western blot para medir los niveles de caspasa-3. Además, los ovarios fueron utilizados para inmunohistoquímica (IHC) de caspasa-3. El grupo LA mostró un aumento significativo (unidades arbitrarias) en los niveles de la forma activa de caspasa-3 (17 kDa) comparado al grupo control (C: 9.200 ± 300 , LA: 11.636 ± 321 , $p < 0.05$). La co-inyección del Antide interfirió con el efecto de LA (LA: 11.636 ± 321 , LA+Ant: 9.467 ± 267 , $p < 0.05$) y Antide solo disminuyó significativamente el clivaje de caspasa-3 (C: 9.200 ± 300 , Ant: 7.450 ± 250 , $p < 0.05$). (33 kDa). Los análisis de IHC mostraron que en el grupo C y LA, las células tecales (CT) de folículos preantrales exhiben una moderada señal para caspasa-3, mientras que CT de folículos antrales mostraron mayor inmunoreactividad, siendo más intensa en el grupo LA. Por otro lado, células de granulosa de estos folículos muestran ausencia o leve inmunoreactividad para caspasa-3 en todos los grupos. LA estimula la expresión de caspasa-3 en FPO mientras que el Antide la disminuye. Este aumento es revertido por el antagonista A, sugiriendo un efecto del agonista a través del receptor ovárico de GnRH. Además, los resultados de IHC sugieren que estos cambios ocurren principalmente en CT.

480. (12306) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UN INHIBIDOR DE VEGF (R1/FC CHIMERA) SOBRE LA FOLICULOGÉNESIS Y APOPTOSIS OVÁRICA. ABRAMOVICH, DALHIA; PARBORELL, FERNANDA; TESONE, MARTA

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), Buenos Aires, Argentina.

En el adulto, la angiogénesis en condiciones fisiológicas es infrecuente a excepción del tracto reproductor femenino. VEGF es uno de los principales reguladores involucrados en la angiogénesis ovárica, expresándose junto con su receptor (Flk1) en células de granulosa y tecales. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el rol del VEGF sobre la foliculogénesis, la apoptosis ovárica y la expresión de proteínas pro o antiapoptóticas. Ratas prepúberes tratadas con eCG fueron inyectadas con un inhibidor de VEGF (Trap: quimera Flt-1/Fc recombinante, $0,1$ o $0,5 \mu\text{g}$) en un ovario y el contralateral con vehículo (C). A distintos tiempos los ovarios fueron extraídos para cortes histológicos. Se realizó un recuento de folículos a 12, 24 y 48 hs. post inyección y sólo a las 48 horas, en el grupo tratado con Trap ($0,5 \mu\text{g}$), hubo un aumento significativo en el número de folículos atrésicos (C: $10,46 \pm 0,54$; Trap: $16,38 \pm 1,27$, $p < 0,05$) y una disminución significativa en el número de folículos periovulatorios (C: $14,08 \pm 1,49$; Trap: $8,54 \pm 1,72$, $p < 0,05$). Con la dosis de $0,1 \mu\text{g/ovario}$, no se observaron cambios en ningún estadio. Mediante TUNEL, se observó que el Trap ($0,5 \mu\text{g/ovario}$) produjo un aumento significativo en el número de células apoptóticas luego de 48 hs. de inyección (C: $3,17 \pm 0,82$; Trap: $6,81 \pm 1,02$ células apoptóticas/campo, $p < 0,05$). Folículos preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$) aislados por microdissección se utilizaron para Western blots. Estos mostraron que la inyección de Trap ($0,5 \mu\text{g}$, 48 hs.) no modificó la expresión de las proteínas Fas ni Fas-L mientras que disminuyó la relación BCL-XL/BCL-XS y Bcl-2/Bax. El bloqueo de VEGF produciría un

aumento en la apoptosis ovárica llevando un mayor número de folículos hacia la atresia. El mecanismo podría ser a través de una mayor vascularización o mediante un efecto directo mediado por su receptor en células de granulosa.

481. (12556) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-2, -3, -8 Y -9 EN EL CUERPO LÚTEO (CL) DE PREÑEZ. PELUFFO, MARINA; STOUFFER, RICHARD; TESONE, MARTA

IBYME-CONICET. Oregon National Primate Research Center-Oregon Health & Science University (ONPRC-OHSU) 505 NW 185th Avenue, Beaverton, OR, 97006, EE.UU.

En roedores el factor luteolítico fisiológico del cuerpo lúteo (CL) es la prostaglandina F₂- (PGF-2a). Dado que la apoptosis se relaciona con la regresión del CL se propuso estudiar la expresión y actividad de 4 caspasas (-2, -3, -8 y -9) involucradas en este proceso y el papel de PGF-2-a. A distintos tiempos de preñez (día 7, 17, 19 y 21) y post-parto (día 1 y 4) se determinó la actividad y expresión de dichas caspasas en CL. También se estudió luego de la inyección de 400 µg PGF-2a/ rata en el día 14 de preñez analizándose los CL a distintos tiempos (0, 8, 16, 24 y 36 hs). Los CL fueron aislados bajo lupa y se midió la actividad de las 4 caspasas en un extracto proteico. Por otra parte, ovarios de animales de cada grupo fueron utilizados para inmunohistoquímica (IHC). En la preñez hubo un patrón similar en la actividad de las 4 caspasas, observándose un aumento de 1,2-21,6 veces mayor en el día 19 de preñez con respecto al resto (p<0.05). Por otro lado, a las 36 hs post-inyección de PGF-2a se observó un aumento significativo de 1,8-2,3 veces en la actividad de la caspasa-2, -3 y -8 (p<0.05) con respecto a los otros tiempos estudiados. Mientras que para la caspasa-9 se observó un aumento significativo de 2 veces a las 36 hs con respecto a 8, 16 y 24 hs (p<0.05). Los experimentos de IHC muestran que la marca de las caspasas -2 y -3 se observa en las células luteales grandes y pequeñas así como también en las células endoteliales. En preñez la mayor expresión de la caspasa-3 se observó en los días 7, 17 y 19. En el grupo tratado con PGF-2a se observó a las 0, 24 y 36 hs post-inyección. La caspasa-2, en cambio mostró una alta expresión durante los días 7 y 17, con una disminución en el día 19 y día 1 post-parto seguida de un aumento en el día 4. Luego de la inyección de PGF-2a la expresión de esta caspasa se mantuvo constante con una leve disminución a las 36 hs. Conclusión: La luteolisis del CL de ratas preñadas está asociada a un aumento en la actividad de las caspasas -2, -3, -8, y -9 y es regulada por PGF-2a.

482. (12578) REGULACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANABINOIDE DURANTE LA PREÑEZ TEMPRANA. RIBEIRO, MARÍA LAURA; BILLI, SILVIA; SORDELLI, MICAELA; FRANCHI, ANA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET - UBA)

La anandamida (AEA) es sintetizada por el útero murino durante la preñez temprana. La exposición a altas concentraciones de AEA es tóxica para la implantación. Previamente observamos que en la rata, la síntesis de AEA es máxima durante el estro. En primer lugar se analizó el efecto del estradiol (E) y la progesterona (P) sobre la síntesis de AEA. Para ello hembras Wistar fueron ovariectomizadas y tratadas con vehículo, E (4 µg/kg), P (16 mg/kg) o E+P. En segundo lugar se caracterizó la síntesis de AEA durante la preñez temprana. Se sacrificaron hembras Wistar en días 1 a 6 de gestación. Por último, se analizó el efecto del E y la P sobre la síntesis de AEA en la preñez temprana. Para ello, se utilizó el modelo de implantación tardía: hembras Wistar preñadas en día 4 de gestación fueron ovariectomizadas, tratadas con vehículo, P (2 mg/kg) o E (0.1 mg/kg) y sacrificadas en el día 8 de gestación. En todos los casos se extrajo el tejido uterino. La síntesis de AEA se cuantificó mediante

la radioconversión de [14C]-ácido araquidónico en [14C]-AEA. En el caso de las hembras ovariectomizadas, tanto el E como la P fueron capaces de estimular la síntesis de AEA (0.46±0.03 y 0.51±0.03 nmoles AEA/mg prot/1h). Sin embargo, la co-administración de E+P inhibió el efecto estimulador de cada una de las hormonas (p<0.001). En el caso de las hembras preñadas la síntesis de AEA se mantuvo constante hasta el día 5 de gestación (1.40±0.13) disminuyendo hacia el día 6 (p<0.01). Además, en el sitio implantatorio la síntesis de AEA fue menor que en el sitio interimplantatorio (p<0.05). En el modelo de implantación tardía, mientras que la P estimuló significativamente la producción de AEA (0.35±0.03 vs 0.22±0.01 nmoles AEA/mg prot/1h), el E no fue capaz de modificarla. Estos resultados indican que en el útero de rata la síntesis de AEA está modulada selectivamente por el E y la P regulando así los niveles de este endocanabinoide en momentos claves de la preñez temprana como la implantación.

483. (12677) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A ESTRÓGENOS AMBIENTALES AFECTA LA PROLIFERACIÓN HORMONODEPENDIENTE DEL ESTROMA UTERINO EN LA RATA ADULTA. VARAYOUD, JORDELINA; RAMOS, JORGE G; BOSQUIAZZO, VERÓNICA L; MUÑOZ-DE-TORO, MÓNICA; LUQUE, ENRIQUE H

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac de Bioquímica y Cs Biológicas, UNL.

La proliferación hormonodependiente de las células del estroma subepitelial del útero es un proceso clave para la implantación del embrión. Uno de los mediadores moleculares propuestos es el factor de transcripción Hoxa-10, miembro de la subclase AbdB de los genes Hox. Nos propusimos evaluar si la exposición neonatal a dos xenoestrógenos, bisfenol A (BPA) y dietilstilbestrol (DES), afecta los mecanismos antes mencionados. Ratas hembras Wistar recibieron vía sc BPA (20 mg/kg), DES (0.2 µg/kg) o vehículo (grupo control) desde el día posterior al nacimiento hasta el día 7. A los 80 días de edad, los animales fueron ovariectomizados y 10 días después inyectados con progesterona y 17β-estradiol, en dosis que simulan el período pre-implantatorio. Cuatro horas antes del sacrificio se les inyectó (ip) bromodeoxiuridina (BrdU) para evaluar proliferación celular. Por inmunohistoquímica se cuantificó la incorporación de BrdU y la expresión de receptor de estrógeno alfa y de progesterona. Para estudiar la expresión de Hoxa-10 se extrajo ARN total y se realizó transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real. Los animales expuestos a BPA y DES presentaron una menor proliferación celular en el estroma uterino en relación a los controles (BPA: 8.1±3.9, DES: 12.4±8.7 vs Control: 46.2±13.9; p<0.01). Tanto en las hembras expuestas a DES como a BPA se detectó una expresión de Hoxa-10 que fue 25 veces menor que la expresión en el grupo control (p<0.001). No se observaron diferencias en la expresión de receptores hormonales entre los distintos grupos experimentales. Estos resultados demuestran que la exposición neonatal a xenoestrógenos disminuye la respuesta proliferativa hormonodependiente de las células del estroma subepitelial del endometrio y que este efecto sería mediado a través del silenciamiento del gen Hoxa-10. Estas alteraciones podrían conducir a fallas en la implantación del embrión causando infertilidad.

484. (12697) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A XENOESTRÓGENOS ALTERA LA ANGIOGÉNESIS EN EL ÚTERO DE LA RATA ADULTA. BOSQUIAZZO, VERÓNICA; VARAYOUD, J; RAMOS, JG; MUÑOZ-DE-TORO, M; LUQUE, EH

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac de Bioquímica y Cs Biológicas, UNL.

Durante el período pre-implantatorio ocurre un incremento localizado de la permeabilidad vascular y de la proliferación endotelial endometrial, controlados por esteroides ováricos y posiblemente mediados por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Nuestro objetivo fue estudiar si la exposición

neonatal a bisfenol A (BPA) y dietilstilbestrol (DES) modifica parámetros relacionados con la angiogénesis uterina, utilizando un modelo que imita los cambios hormonales que ocurren en el periodo previo a la implantación. Ratas hembras (Wistar) se inyectaron sc con BPA (20mg/kg), DES (0.2µg/kg) o vehículo (control) desde el día posterior al nacimiento hasta el día 7. A los 80 días de edad, los animales fueron ovariectomizados y 10 días después inyectados con progesterona y 17β-estradiol, en dosis que simulan el período pre-implantatorio. Los animales se sacrificaron 20hs después de la última inyección. Todas las ratas recibieron bromodeoxiuridina (BrdU, 60mg/kg) 4hs antes del sacrificio. Se diseccionaron ambos cuernos uterinos, uno fue incluido en parafina y al otro se le extrajo ARN total. Por doble inmunohistoquímica para BrdU/nestina se cuantificó el índice de proliferación endotelial (IPE), tomando la inmunodetección de nestina como marcador de células endoteliales. La expresión del ARNm del VEGF se evaluó por transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real. Las hembras que habían sido expuestas a DES o BPA presentaron una significativa reducción en el IPE en relación a las controles (DES:15±2; BPA:20±1 vs Control:26±1). La expresión del ARNm del VEGF fue inhibida tanto por el tratamiento con DES como con BPA (p<0.01). Los resultados demuestran que la exposición neonatal a DES y BPA disminuye la respuesta proliferativa hormonodependiente de las células endoteliales uterinas y bloquea la expresión del gen VEGF. Una disminución en la angiogénesis uterina en respuesta a la exposición a xenoestrógenos, podría alterar el mecanismo de implantación y ser responsable de una muerte embrionaria temprana.

485. (12706) LA EXPOSICIÓN A BISFENOL A (BPA) DURANTE EL PERÍODO POSTNATAL TEMPRANO ALTERA LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA (REa) Y BETA (REb) EN EL HIPOTÁLAMO DE LA RATA HEMBRA. MONJE, LUCAS; VARAYOUD, J; MUÑOZ-DE-TORO, M; LUQUE, EH; RAMOS, JG

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac Bioquímica y Cs Biológicas, UNL.

La expresión diferencial de los receptores REa y REb en áreas hipotalámicas es un evento clave en la diferenciación sexual del cerebro durante su desarrollo postnatal temprano. Los estrógenos producen alteraciones irreversibles en este proceso, por lo que la exposición a perturbadores endocrinos durante este período sería crítica. Nos propusimos investigar si la exposición postnatal temprana a BPA modifica la expresión de los genes REa y REb en el hipotálamo de la rata hembra prepupal. Crías hembras (cepa Wistar) se inyectaron vía sc con BPA (20mg/kg), dietilstilbestrol (DES, 20µg/kg) o vehículo (control) desde el día posterior al nacimiento hasta el día 7 y se sacrificaron el día 8. Por inmunohistoquímica se cuantificaron ambos RE en los núcleos anteroventral periventricular (AvPv) y preóptico medial (MPO). Para conocer la regulación del BPA sobre los promotores transcripcionales de los RE se evaluaron por RT-PCR los niveles relativos de expresión de las regiones 5' no codificantes O, OT, ON y OS del REa y las regiones OH y ON del REb en el área preóptica (POA) y el hipotálamo medio-basal (HMB). Los animales expuestos a BPA y DES presentaron una menor expresión de las proteínas REa y REb en los núcleos AvPv y MPO con respecto a los controles (p<0.01). De las regiones promotoras estudiadas se detectaron como activas a REa-O, REa-OT y REb-ON. El BPA disminuyó la transcripción del REa en POA mediante la regulación del promotor REa-O mientras que en HMB lo hizo utilizando los promotores REa-OT y REa-O (p<0.05). EL BPA disminuyó la expresión del ARNm del REb sólo en el HMB, utilizando el promotor REb-ON (p<0.01). El DES disminuyó la expresión de todas las regiones promotoras activas en ambas zonas estudiadas (p<0.05). Estos resultados demuestran que la exposición postnatal temprana a BPA altera la transcripción y traducción hipotalámica de REa y REb, pudiendo afectar la maduración del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal.

486. (12730) EL PARTO DEL COBAYO TRANSCURRE CON UNA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL ARNm DE RECEPTOR DE ESTROGENOS ALFA (REa) Y BETA (REb) EN DISTINTAS REGIONES DEL ÚTERO. RODRÍGUEZ, HORACIO; DURANDO, MILENA; RAMOS, GUILLERMO; ORTEGA, HUGO; MUÑOZ DE TORO, MÓNICA; LUQUE, ENRIQUE H

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH). Fac. Bioqca y Cs Biológicas, UNL

En la mujer y el cobayo el inicio del parto estaría mediado por cambios en la susceptibilidad de útero y cérvix a la acción de los Eg circulantes. Uno de los mecanismos que podrían modificar la acción biológica de los Eg a nivel tisular sería un cambio cuantitativo/cualitativo en la expresión de los RE. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión del ARNm de REa y REb en diferentes regiones del útero del cobayo alrededor del parto y su relación con niveles circulantes de 17β-estradiol (E2). Se tomaron muestras de suero, cuerno uterino y cérvix de cobayos de día 42 (D42) y D63 de gestación y posparto inmediato (PPI). Se midió E2 mediante ensayo inmunoenzimático quimioluminiscente secuencial en fase sólida. La expresión de ARNm de REa y REb fue evaluada por transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva, usándose competidores del tipo heterólogo. Se estableció el rango de diluciones del fragmento de ADN competidor para cada RE y se realizó PCR para el ARN ribosomal de la subunidad 18S como normalizador interno. Los resultados fueron expresados como atomoles de ARNm de REa o REb/µg de ARN total. Los niveles de E2 no se modificaron alrededor del parto (D63: 42,9±1,5 pg/ml; PPI: 41,7±3,8 pg/ml). En el cuerno uterino, la expresión del REa fue máxima durante el parto (PPI: 1,9±0,3), siendo el doble de los valores del D63 (0,7±0,3); mientras que el REb aumentó en D63 (2,4.10-3±1,9.10-3) permaneciendo elevado durante el parto (PPI: 4,5.10-3±2,6.10-3). En cérvix, el REa se expresó sin variaciones en los días evaluados (D42:0,13±0,08; D63:0,09±0,08; PPI:0,04±0,01) mientras que no hubo expresión de REb. Nuestros resultados demuestran que, mientras los niveles circulantes de E2 se mantienen constantes al acercarnos al parto, en diferentes regiones del tracto genital hay cambios locales en la expresión de REa y REb que explicarían las funciones particulares que caracterizan cada región.

PREMIO LUCIO CHERNY

487. (12248) MECANISMO DE ACCIÓN DE UN PÉPTIDO QUIMÉRICO DEL INTERFERÓN-ALFA2β. BLANK, VIVIANA CLAUDIA; PEÑA, CLARA; ROGUIN, LEONOR PATRICIA

IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Argentina.

Previamente demostramos el efecto antiproliferativo de un péptido quimérico del interferón-alfa2β (IFN-α2β) que simula el dominio de la citoquina que se une a sus receptores. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la cascada de señales intracelulares activadas por este derivado sintético y la posible relación entre la inhibición del crecimiento celular y la inducción de apoptosis. Puesto que en la vía clásica de transducción de señales activadas por el IFN-α2β participan tirosina quinasas Janus y factores de transcripción STAT, evaluamos la estimulación de la proteína quinasa Jak1 y de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 por ensayos de inmunoprecipitación y Western blot. Luego de incubar células WISH durante 6 minutos en presencia de IFN-α2β o del péptido, se observó un aumento significativo de la fosforilación de Jak 1 (4% control, 45% IFN-α2β, 9% péptido), mientras que después de 20 minutos de incubación se obtuvo un incremento en la proporción de STAT3 fosforilada (0% control, 121% IFN-α2β, 30% péptido). La proteína STAT1 se fosforiló cuando las células se estimularon 20 minutos con IFN-α2β, pero no con el péptido, sugiriendo la existencia de un me-

canismo de activación diferencial. Por ensayos de citometría de flujo demostramos que, después de 72 horas de incubación en presencia de IFN- α 2 β o del péptido, se obtuvo un incremento del porcentaje de células hipodiploides (13% control, 53% IFN- α 2 β , 45% péptido). Además, cuando se evaluaron a las 48 horas los niveles de expresión de fosfatidilserina en la membrana plasmática, observamos un aumento en el porcentaje de células en apoptosis temprana (20% control, 29% IFN- α 2 β , 34% péptido). Los resultados obtenidos indicaron que el péptido quimérico se comporta como un agonista parcial del IFN- α 2b, activando al menos una de las vías de señalización inducidas por la citoquina. Asimismo, el efecto antimitogénico desencadenado por este derivado se encuentra estrechamente relacionado con la inducción de apoptosis.

488. (12281) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TUMORES COLORECTALES HUMANOS POR MEDIO DE MICROARRAYS DE CDNA. LEVY, ESTRELLA (1,2); BIANCHINI, MICHELE (1); MACAGNO, CARLOS (2); PINSKI, VICTOR (2,4); MORDOH, JOSE (3)

(1) CIO-FUCA, Buenos Aires, Argentina; (2) MBMM (UBA), Buenos Aires, Argentina (3) Laboratorio de Cancerología, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina; (4) Hospital M.B. de Martínez, Buenos Aires, Argentina

Las vías moleculares causales que subyacen a la patogénesis del cáncer colorectal (CCR) necesitan ser comprendidas en profundidad. El objetivo de nuestro estudio fue entender mejor los mecanismos genéticos de la oncogénesis del cáncer colorectal humano e identificar nuevos marcadores tumorales potencialmente útiles en la práctica clínica. Por primera vez en nuestro país, usamos microarrays de cDNA, conteniendo 19.200 secuencias, para comparar los perfiles de expresión génica de biopsias colorectales de 25 pacientes con CCR vs. un pool de 13 mucosas normales, del tejido adyacente no canceroso. Los hallazgos fueron validados por PCR en tiempo real; además, para confirmar los datos de expresión diferencial a nivel proteico, realizamos ensayos de western-blotting e inmunohistoquímica. Identificamos 584 genes conocidos, diferencialmente expresados comparando los tejidos cancerosos con el pool de mucosa colónica normal. Muchos de esos transcritos que fueron más abundantes en los tumores que en la mucosa normal parecen reflejar eventos importantes de la carcinogénesis del CCR. Un número significativo de esos genes actúan como inhibidores de la apoptosis (ej. BFAI, BIRC1 y BIRC6). También observamos la simultánea sobreexpresión de HLA-E y la menor expresión de β 2-microglobulina; estos genes constituirían una potencial estrategia de escape tumoral a la vigilancia inmunológica en tejidos de cáncer de colon. Nuestro estudio ha permitido caracterizar nuevos genes como candidatos en la patogénesis del CCR humano. De nuestros resultados se podría hipotetizar que las células de CCR escaparían a la vigilancia del sistema inmunológico a través de una alteración génica específica; además la sobreexpresión de varios genes de supervivencia parecerían conferir un fenotipo más antiapoptótico. Estos genes estarían involucrados en vías que no habían sido previamente implicadas en la patogénesis del CCR y podrían representar nuevos blancos en la terapia.

489. (12319) IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES Y DE SEÑALES INTRACELULARES ACTIVADAS POR EL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS EN CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS. MARINO, JULIETA; STERIN-PRYNC, AIDA; ROGUIN, LEONOR

IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Argentina. Bio Sidus. Buenos Aires. Argentina

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citoquina que, luego de unirse a receptores de células del linaje mielóide, promueve la proliferación y diferenciación de precursores a neutrófilos y activa las funciones de los neutrófilos maduros. Aunque se ha descrito la presencia del receptor para G-CSF en células no hematopoyéticas, la activación de señales

intracelulares y su respuesta biológica no han sido todavía determinadas. En un estudio previo demostramos que la misma región de la molécula de G-CSF está involucrada en la unión a receptores presentes en placenta o en células mieloides (NFS-60). En el presente trabajo, con el fin de identificar los posibles mecanismos de transducción de señales del G-CSF en el tejido placentario, utilizamos una línea de células trofoblásticas derivadas de un coriocarcinoma humano (JEG-3). En primer lugar, detectamos receptores para G-CSF en estas células y estimamos los parámetros de la interacción, siendo la constante de afinidad y la capacidad de unión 3×10^9 M(-1) y 1290 sitios/célula, respectivamente. Estos valores no difirieron significativamente de los obtenidos en células NFS-60. Para determinar si la unión de la citoquina en células trofoblásticas induce la activación de proteínas intracelulares, realizamos ensayos de estimulación con G-CSF y posterior inmunoprecipitación. Los resultados obtenidos demostraron que el G-CSF indujo la fosforilación de las quinasas Jak1, Jak2 y del factor de transcripción STAT3, pero no de las proteínas STAT1 y STAT5, tanto en células NFS-60 como JEG-3. Cuando se estudió la participación de la vía de las protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK) se observó la fosforilación de la MAPK p38 sólo en las células mieloides. En resumen, este trabajo permitió identificar receptores para G-CSF en células trofoblásticas y constituye la primera evidencia de activación de mecanismos de transducción en respuesta a la citoquina en estas células.

490. (12378) ALTERACIÓN DE SISTEMAS ANTINOCICEPTIVOS EN CEFALÉAS CRÓNICAS DIARIAS. BUONANOTTE (1), FEDERICO; SCHURRER (2), C.; CARPINELLA (2), M.; SURUR (3), A.; MARANGONI (3), A.; PALACIO (3), S.; FORTEZA (1), M.; FERNÁNDEZ (1), A.R.; ENDERS (1), J.

(1)FCM. UNC, (2)FAMAYF. UNC, (3)Servicio de Radiología, Sanatorio Allende

La migraña y la cefalea crónica diaria son desórdenes de presentación frecuente en la práctica neurológica. No es claro aún cuál es su mecanismo de producción, pero es evidente un factor genético predisponente. Son múltiples las áreas cerebrales involucradas en la generación de cefaleas primarias entre las que se encuentra la sustancia gris periaqueductal que participa como neuromodulador. Para evaluar posibles cambios bioquímicos en pacientes con cefaleas crónicas diarias se estudiaron los espectros de la sustancia gris periaqueductal en pacientes con migrañas episódicas y con cefaleas crónicas diarias. Se comparó con el espectro promedio de sujetos sanos a través del análisis espectroscópico diferencial. El resultado mostró que los sujetos con migrañas y cefaleas crónicas diarias presentan una reducción mayor al 70% del metabolito N-Acetil-Aspartato Glutamato (NAAG) en la región periaqueductal. El NAAG es un péptido relacionado con actividad antinociceptiva. Los resultados de la presente investigación sugiere una alteración de la neuromodulación de sistemas antinociceptivos en los sujetos con cefaleas crónicas diarias que se expresa con una reducción en la concentración del péptido N-Metil-Acetil-Aspartato Glutamato en la región de la sustancia gris periaqueductal medida a través de espectroscopia por resonancia magnética.

491. (12623) EL TRATAMIENTO REPETIDO CON PARACETAMOL (P) EN LA RATA DISMINUYE LA TOXICIDAD DE LA DROGA AL INDUCIR LA PROTEÍNA HEPÁTICA TRANSPORTADORA DE ANIONES ORGÁNICOS MRP3. GHANEM, CAROLINA I. (1); RUIZ, MARÍA L (2); VILLANUEVA, SILVINA S. M. (2); LUQUITA, MARCELO G. (2); CATANIA, VIVIANA A. (2); BENGOCHEA, LAURA A. (1); MOTTINO, ALDO D. (2)

Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. CONICET - Universidad Nacional de Rosario.

Dosis tóxicas de P pueden causar insuficiencia hepática. El tratamiento crónico en humanos produce tolerancia a la droga,

aunque el mecanismo es incierto. Mrp2 apical y Mrp3 basolateral hepáticas transportan su principal metabolito, el glucurónido de P (glu-P), favoreciendo su excreción biliar y renal respectivamente. Se estudió el efecto del tratamiento repetido con P sobre la expresión y función de las Mrps hepáticas. Métodos: Grupo P: ratas Wistar machos recibieron dosis crecientes de P por 3 días consecutivos (0,2, 0,3 y 0,6 g/kg, i.p.). Grupo C: Recibieron vehículo. A 24 hs de la última inyección se administró una dosis tóxica de P (1 g/Kg, i.p.) y se determinó la excreción biliar y urinaria de P y glu-P in vivo (60-120 min) y su contenido hepático, por HPLC. La expresión de Mrp2 y Mrp3 se evaluó por inmunoblot e inmunofluorescencia. Se determinaron los marcadores séricos de necrosis hepática y la sobrevida al P. Los resultados se expresan como media \pm DE (N=3-5). Resultados: La excreción biliar acumulativa de glu-P (% de dosis) disminuyó en P (8,6 \pm 0,9) vs C (11,6 \pm 1,9), mientras que la excreción urinaria aumentó en P (13,1 \pm 3,9) vs C (6,6 \pm 1,9) (p<0,05). La excreción biliar y urinaria de P no se modificó. El contenido hepático de glu-P disminuyó un 37% en P vs C (p<0,05). El nivel de Mrp2 en membrana plasmática aumentó un 70% y el de Mrp3 un 400% en P vs C (p<0,05). A 24 hs de la inyección de P (1g/Kg), las transaminasas fueron más elevadas en C que en P (+73% en promedio), en concordancia con la menor sobrevida del grupo C (57%) vs P (92%) (p<0,05). Conclusiones: El aumento preferencial de Mrp3 vs Mrp2 favoreció la eliminación urinaria de glu-P por sobre la excreción biliar. La menor exposición del hígado al P, por menor recirculación enterohepática de la droga, puede explicar la disminución de su toxicidad en el tratamiento crónico.

492. (12631) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE UN PLÁSMIDO CODIFICANTE PARA VEGF165 EN CONEJOS CON ISQUEMIA VASCULAR PERIFÉRICA. OLEA, DANIELA; VERA JANAVEL, GUSTAVO (1,4); CUNIBERTI, LUIS; YANNARELLI, GUSTAVO; CORS, JORGE (2); LEV, GUSTAVO (2); VALDIVIESO, LEÓN (2); MÉNDIZ, OSCAR (2); BERCOVICH, ANDRÉS (4); CABEZA MECKERT, PATRICIA (2,3); LAGUENS, RUBÉN (1,2); CROTTIGINI, ALBERTO

(1) Universidad Favaloro, (2) Fundación Favaloro, (3) CIC y (4) Bio Sidus

La angiogénesis terapéutica por transfección de plásmido codificante para factor de crecimiento de endotelio vascular (pVEGF) en modelos animales y pacientes con enfermedad vascular periférica ha arrojado resultados controversiales. Nuestro objetivo fue determinar si esto podría deberse a expresión transitoria del gen y si para lograr efecto terapéutico es necesaria la administración repetida de pVEGF. La expresión se evaluó por RT-PCR en 14 conejos con extirpación de la arteria femoral superficial izquierda y ligadura de la profunda, inyectados con 3,8 mg de pVEGF165 o placebo en el músculo isquémico. La expresión fue máxima a los 7 días de la inyección y decayó rápidamente hasta ser casi nula a los 35 días. Otros 30 conejos con igual cirugía fueron divididos en 3 grupos (n=10 c/u) e inyectados a los 7 y 21 días de la operación con placebo (plásmido vacío) ambas veces (G1), pVEGF165 – placebo (G2) y pVEGF165 – pVEGF165 (G3). A los 50 días, el G3 mostró mayor densidad capilar y arteriolar por morfometría (p<0,01 ANOVA) y menor porcentaje de daño muscular (histología) que el G1 (p<0,04, Chi²). El flujo arterial (eco doppler) y la densidad de arterias de conductancia (angiografía) aumentó tanto en G2 como en G3 (p<0,01 vs. G1). En conejos con isquemia periférica sólo la administración repetida de pVEGF165 protege del daño muscular isquémico, efecto mediado principalmente por la proliferación de capilares y arteriolas. Dada la fugacidad de la expresión del pVEGF, es probable que la segunda administración, además de sumar un nuevo estímulo angiogénico, haya impedido la regresión de los neovasos inducidos por la primera. Estos resultados aconsejarían proponer la doble transfección como estrategia posológica para aumentar la eficiencia terapéutica en pacientes con enfermedad vascular periférica.

493. (12739) DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CANAL EPITELIAL DE SODIO (ENAC) EN SINCICIOTROFOBLASTO DE PLACENTA HUMANA NORMAL Y PREECLÁMPTICA. DEL MÓNACO, SILVANA; ASSEF, YANINA (1); DAMIANO, ALICIA (2); ZOTTA, ELSA (2); IBARRA, CRISTINA (2); KOTSIAS, BASILIO A. (1)

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari. Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Argentina.

El sinciciotrofoblasto (SCT) de placenta humana regula la transferencia de solutos y agua entre la sangre fetal y materna. En el presente trabajo observamos que el canal de sodio ENaC (asociado a cuadros hipertensivos como el Síndrome de Liddle e hipotensivos como el Pseudohipopaldosteronismo) está presente en la membrana apical del SCT y que la subunidad alpha del canal tiene una expresión reducida en placentas con hipertensión gestacional (preeclampsia). Realizamos estudios a nivel de expresión de ARN (RT-PCR) y a nivel proteico (western blot e inmunohistoquímica). En la línea celular BeWo (modelo de SCT humano) el canal se encuentra presente y la expresión del mismo es regulada por las hormonas aldosterona, vasopresina, estradiol y progesterona. Analizamos la actividad del ENaC por electrofisiología y observamos corrientes activadas por 8Br-AMPC (100 μ M) sensibles a amiloride (10 μ M) cuando las células BeWo se cultivaron 12 horas con aldosterona (100 nM). Esta corriente presentó una magnitud 20 veces mayor que las corrientes basales (p < 0,05), un potencial de reversión cercano a 3 mV y una conductancia de 127 \pm 26 pS/pF entre los pulsos de -60 y -140 mV aplicados. Las características de esta corriente son similares a las producidas por ENaC en otros tejidos que presentan expresión variable de sus subunidades y sugieren la presencia de un canal funcional. A pesar de que el papel del ENaC en SCT es poco comprendido, su menor expresión en placentas preeclámpticas puede generar consecuencias para el transporte placentario de iones y agua durante el desarrollo del feto. Nuestros datos son un aporte para futuros estudios de los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la preeclampsia.

494. (12768) EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO MODULA EL TRÁFICO DE MAPKS Y LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS TUMORALES. GALLI, SOLEDAD; PODEROSO, CECILIA; JAITOVICH, ARIEL; CARRERAS, MARÍA CECILIA; PODEROSO, JUAN JOSÉ

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires. Laboratorio de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Las MAPKs integran señales extracelulares en caminos de transducción que regulan el ciclo celular. La concentración de H₂O₂ en el estado estacionario ([H₂O₂]_{ss}) depende de su producción en la mitocondria y la degradación por enzimas citosólicas; previamente demostramos que tejidos proliferantes y tumores exhiben baja [H₂O₂]_{ss}; tejidos quiescentes muestran [H₂O₂]_{ss} cien veces mayor. Estudiamos la modulación que ejerce H₂O₂ sobre el tráfico de MAPK y la progresión del ciclo celular en una línea tumoral, LP07. 1 μ M H₂O₂ promueve proliferación, y > 10 μ M H₂O₂ arresto del ciclo celular o apoptosis, con activación diferencial de MAPKs; a 1 μ M H₂O₂, la activación y translocación de ERK1/2 al núcleo fueron persistentes, mientras que 50 μ M H₂O₂ sólo indujo activación transitoria, con alta y baja expresión de ciclina D1, respectivamente. La inhibición de MEK1/2 limitó la expresión de ciclina D1 a 1 μ M H₂O₂. 50 μ M H₂O₂ indujo la activación y translocación persistente de JNK1/2 y p38 al núcleo, con arresto del ciclo celular, sin señales de apoptosis. La inhibición de JNK y p38 revirtieron la disminución en la expresión de ciclina D1 a 50 μ M H₂O₂. Los efectos redox se asociaron a la translocación de MAPKs a la mitocondria: a 50 μ M H₂O₂ ERK1/2, MEK y p38, quedaron retenidos en la mitocondria. Observamos asociaciones ERK- MEK, p38- MKK3 y JNK- MKK4, que se vieron favorecidas

por la oxidación de las quinasas. Asimismo, la oxidación suave favoreció la fosforilación *in vitro* de ERK y la oxidación fuerte la de JNK y p38. H₂O₂ activa diferencialmente a las MAPKs, y esta activación, y el tráfico a la mitocondria regularían la progresión del ciclo celular. La proliferación tumoral persistente podría depender de la activación y tráfico diferencial de MAPKs en conexión con la baja [H₂O₂]_{ss} en células transformadas.

495. (12808) ELEVACION DE LA PRESION ARTERIAL (PA) EN UN RATON TRANSGENICO CON SOBREENPRESION DE TIROLIBERINA DIENCEFALICA (TRHD. LANDA, MARIA SILVINA; GARCIA, SILVIA I; SCHUMAN, MARIANO; BURGUEÑO, ADRIANA L; CARABELLI, JULIETA; GEMMA, CAROLINA; ALVAREZ, AZUCENA L; PIROLA, CARLOS J

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Fac de Medicina, UBA

La TRH diencefálica regula la PA. Demostramos que la rata hipertensa muestra una hiperactividad de la TRHd reversible por un antisense contra TRH(AS). La sobreexpresión temporal de TRH con un plásmido produce elevación de la PA reversible con el AS e independiente de la angiotensina II central y del estado tiroideo. Así, postulamos que la sobreexpresión permanente de TRHd en un ratón transgénico (Rtg) aumentaría la PA en forma estable. Desarrollamos Rtg mediante la inyección de una construcción génica con el cDNA del preTRH bajo el promotor del CMV con la señal de poliadenilación de la bGH. Obtuvimos 11 fundadores con una significativa elevación ($p < 0.02$, ANOVA con medidas repetidas) de la PAS sistólica (PAS, pletismografía) vs C57 (media \pm ES; C57:98 \pm 2.1 vs Rtg:109 \pm 2.1). Los 5 con una elevación mayor de la PAS se cruzaron con la cepa C57 dando la F1. Mostramos datos de la F1 de 3 cepas (tabla). Los ratones F1 no mostraron diferencias de T3 y T4 en suero. Como esperabamos, mediante un ensayo de RPA encontramos un aumento de la abundancia del mRNA del preTRH y al mismo tiempo, una elevación significativa ($p < 0.01$, ANOVA) de la PAS en los Rtg, heredado en la F2.

CEPA	N	mRNA TRHd /GADPH	PAS mmHg
C57	8	0,37 \pm 0,1	87 \pm 3
6948	9	0,87 \pm 0,4 *	108 \pm 2*
6954	19	1.0 \pm 0,4*	112 \pm 2*
7061	8	1.5 \pm 0,5*	110 \pm 2*

Con esta estrategia obtuvimos ratones que sobreexpresan TRH en diencefalo y corazón (no mostrado). Así demostramos por primera vez que la sobreexpresión permanente de TRHd en un modelo de Rtg provoca una elevación significativa y heredable de la PAS.

PREMIO PATRICIO M. COSSIO

496. (11906) ESTUDIO DEL GANGLIO CENTINELA: DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DEL MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO ESTADIO I Y II. DENNINGHOFF, VALERIA; FALCO, JORGE; CURUTCHET, H. PABLO; ELSNER, BORIS

Servicio de Patología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC). División de Cirugía Oncológica del Hospital de Clínicas "José de San Martín".

La sobrevida a cinco años de los casos con melanoma maligno (MM) primario localizado (estadio I y II) es de aproximadamente un 80%, comparada con un 35% de sobrevida cuando los ganglios linfáticos están comprometidos (estadio III). El objetivo del estudio es establecer el valor pronóstico de la detección de las micrometástasis en ganglios centinela (GC). Se seleccionaron 45 individuos, de un total de 598 individuos con MM tratados en los últimos 10 años, con diagnóstico de la lesión prima-

ria de melanoma maligno estadio I o II y con seguimiento mayor a 2 años (con porción de GC fijada y criopreservado). Se realizó la identificación preoperatoria e intra-operatoria del GC y su extirpación. Para determinar la existencia de micrometástasis se estudió mediante cortes seriados para hematoxilina-eosina (HE) e inmu-nohistoquímica (IHQ), y mediante técnicas de biología molecular (BM). La población se dividió en tres grupos: HE-/IHQ+/BM+: 2/3 (67%) fallecieron, HE-/IHQ-/BM+: 4/7 (57%) fallecieron y HE-/IHQ-/BM-: el 100% (35/35) de los individuos viven sin linfadenectomía, con una mediana de seguimiento de 60 meses. La utilización de HE e IHQ aumenta la sensibilidad del estudio. El agregado de BM optimiza la estadificación y el tratamiento. Los individuos que mostraron negatividad con los tres métodos tuvieron un índice de recurrencia nulo, por lo tanto esta triple negatividad podría ser considerada como un factor pronóstico positivo para la sobrevida global. Dado el tiempo de seguimiento y la cantidad de individuos, los datos de este estudio sugieren la modificación de la estadificación y el tratamiento de los individuos BM+. Esta nueva estadificación oncológica a nivel molecular permitiría seleccionar a los individuos que presenten metástasis submicroscópicas para un tratamiento completo (vaciamiento ganglionar y una eventual terapéutica adyuvante), pero evitar linfadenectomías en individuos que no tienen metástasis ganglionares, evitando sobretratamiento.

PREMIO ESTEBAN MONTUORI

497. (12299) DISECCIÓN DE LOS MECANISMOS SUBCELULARES RESPONSABLES DEL FENÓMENO DE LA ESCALERA NEGATIVA, USANDO UN MODELO CELULAR DE INSUFICIENCIA. VILA PETROFF, MARTIN; PALOMEQUE, JULIETA; SAPIA, LUCIANA; GENDE, OSCAR A.; MUNDIÑA-WEILENMANN, CECILIA; MATTIAZZI, ALICIA

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Medicina, UNLP. La Plata. Argentina.

El aumento de la contractilidad en respuesta al incremento de la frecuencia cardíaca (escalera positiva) se encuentra invertida (escalera negativa (EN)) en el corazón insuficiente (CI) e impide que estos corazones satisfagan los mínimos requerimientos metabólicos. La EN ha sido asociada con alteraciones del manejo del Ca(2+)[i]. La disminución en la expresión de la SERCA2a, el aumento en la expresión del intercambiador Na(+)/Ca(2+)(NCX) o el un aumento del Na(+)[i], han sido independientemente propuestos como potenciales mediadores de la EN del CI. Sin embargo, estos trabajos no permiten concluir si cada uno de estos mecanismos es suficiente para provocar la EN del CI o si por el contrario, es necesaria su acción conjunta, para determinar la misma. Para discernir entre estas posibilidades, mimetizamos, en miocitos aislados de corazones de gatos no insuficientes, las tres alteraciones básicas del CI y examinamos su efecto, de manera individual o aditiva, sobre la relación entre contractilidad y frecuencia. La escalera positiva observada en miocitos sanos, no fue modificada significativamente ni por: la inhibición de SERCA2a, [1 μ M thapsigargin (TG), 10 μ M ácido ciclopiazónico (CPA) o TG + CPA], el incremento de la proteína del NCX (transferencia génica por adenovirus, Ad.NCX), o el aumento de Na(+)[i], [10 μ M ouabaina (Oua)], a niveles similares a los observados en la IC. En cambio, la combinación de TG + Oua, Oua + Ad.NCX o TG + Ad.NCX, convirtieron a la escalera positiva en negativa. Más aun, cuando se combinaron las tres intervenciones, la escalera se hizo negativa a frecuencias de estimulación más bajas. Concluimos que el manejo de Ca(2+)[i] debe estar alterado en varios niveles para poder explicar la EN del CI y que estas alteraciones, actuando sinérgicamente, tienen efecto aditivo contribuyendo al progresivo deterioro del fenómeno de la escalera observado en la insuficiencia cardíaca.

498. (12372) LA VARIANTE DEL PROMOTOR DEL GEN DEL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (SLC6A4) ES UN FACTOR INDEPENDIENTE DE RIESGO PARA LA OBESIDAD EN ADOLESCENTES CON SINDROME METABOLICO. GEMMA, CAROLINA; SOOKOIAN, SILVIA; GARCIA, SILVIA; FERNANDEZ GIANOTTI, TOMAS; DIEUZEIDE, GUILLERMO; TRIFONE, LILIANA; KANEVSKY, DIEGO; GONZALEZ, CLAUDIO; PIROLA, CARLOS J

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, UBA. CAIDEM, Chacabuco, Pcia de Buenos Aires, Sección Nutrición y Diabetes. Hospital General de Niños "Dr Ricardo Gutiérrez".

En el promotor del gen del 5-HTT se describió un polimorfismo funcional de inserción (L)/delección (S) el cual se asoció con ansiedad y depresión, trastornos 4 veces mas frecuentes en obesos. Objetivos: evaluar la asociación entre esta variante y los hallazgos clínicos de 116 adolescentes normotensos y 67 hipertensos de una muestra de 934 alumnos de población general (G 1) y 119 niños del servicio de Nutrición del Hospital J.M. Gutiérrez (G 2). Resultados: en el G 1, no se observaron diferencias entre la mayoría de las características estudiadas entre los portadores del alelo S y los no portadores. Se observó una diferencia ($p < 0.03$) en el BMI Z score de los portadores del alelo S y los portadores de dicho alelo tuvieron mayor BMI ajustado por sexo y edad en comparación con los no portadores en aquellos cuyo Z score de la PAS fue mayor del percentilo 90. El alelo S se asoció con sobrepeso ($p < 0.02$), ya que fue mas frecuente en el grupo con sobrepeso (LL: 14.0% y LS+SS: 86.0%) en comparación con el grupo de adolescentes delgados (LL: 30.3% and LS+SS: 69.7%). En el G2, comparados con los homocigotas LL, los portadores del alelo S mostraron mayor BMI Z score (1.47 ± 1.09 vs. 0.51 ± 1.4 , $p < 0.002$). El alelo S se asoció con sobrepeso ($p < 0.01$) (LL: 8.2% and LS+SS: 91.2%) vs (LL: 26.3% and LS+SS: 73.7%) entre sobrepeso y delgados respectivamente. En esta investigación describimos por primera vez que la variante del promotor del 5-HTT es un factor genético independiente de riesgo para el desarrollo de obesidad o sobrepeso en adolescentes con síndrome metabólico, ya que en el analisis de regresión logística el alelo S se asoció con sobrepeso tanto en el grupo de población sana como en el grupo de niños hospitalarios, (OR: 1.85, 95% CI: 1.13-3.05, $p < 0.02$) y (OR: 3.98, 95% CI: 1.31-12.18, $p < 0.02$) respectivamente.

499. (12642) EFECTO HIPERTRÓFICO DE ENDOTELINA-1 EN MIOCITOS CARDÍACOS DE RATAS RECIÉN NACIDAS: PAPEL DE LOS INTERCAMBIADORES Na^+/H^+ Y Na^+/Ca^{2+} . DULCE, RAÚL ARIEL; ÁLVAREZ, MARÍA CECILIA; ENNIS, IRENE LUCÍA; HURTADO, CECILIA; GARCIA-RENA, CAROLINA DENÍS; CALDIZ, CLAUDIA; PORTIANSKY, ENRIQUE L.; CAMILIÓN DE HURTADO, MARÍA CRISTINA

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

La endotelina-1 (ET1), además del efecto vasoconstrictor por el que fue inicialmente conocida, estimula el crecimiento celular y la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , isoforma 1 (NHE1). En los últimos años se ha hecho evidente la vinculación del NHE1 con el desarrollo de hipertrofia cardíaca. El objetivo de este estudio fue explorar, en cultivos de miocitos cardíacos obtenidos de ratas recién nacidas, la hipótesis en la que el aumento de la concentración de Na^+ intracelular ($[Na^+]_i$) provocado por la activación del NHE1 por ET1 favorecería el funcionamiento del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en modo inverso (NCX[rev]) lo cual, aumentando el calcio intracelular (Ca^{2+})_i, desencadenaría el proceso hipertrofico. Se evaluó la hipertrofia cardiomiocítica mediante tres parámetros: área celular de los miocitos en cultivo, síntesis proteica estimada por la incorporación de (3)H-fenilalanina y expresión del péptido natriurético ANF por RT-PCR en tiempo

real. También se midieron Na^+ y Ca^{2+} intracelulares por epifluorescencia con los indicadores SBFI y Fura-2, respectivamente. El tratamiento con ET1 (5 nM, 24 hs) produjo aumento del tamaño celular, de la incorporación de (3)H-fenilalanina, de la expresión del ARN mensajero del factor natriurético auricular (ANF) y la $[Na^+]_i$ (13 ± 2 , 120 ± 12 , 90 ± 25 y 153 ± 90 % sobre el valor control respectivamente, $P < 0.05$). Todos estos efectos de ET1 fueron cancelados por la inhibición del NHE1 con HOE 642 1 μ M. La inhibición del NCXrev con KB-R7943 5 μ M redujo significativamente el tamaño celular y la incorporación de (3)H-fenilalanina, y normalizó la expresión de ANF en los cultivos tratados con ET1. Estos resultados constituyen una evidencia de que el NCX[rev] está involucrado en el desarrollo de hipertrofia cardíaca inducida por ET1 y dan una explicación para la acción antihipertrofica de los inhibidores del NHE1.

500. (12670) ROL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA INTERACCIÓN ENTRE ANGIOTENSINA II Y ENDOTELINA-1 EN MIOCITOS CARDÍACOS. VILLABRILLE, MC; ENNIS, IL; GARCIA-RENA, C; CORREA, MV; CAMILIÓN DE HURTADO, MC; CINGOLANI, HE; AIELLO, EA

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Fac. Cs. Médicas, UNLP

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por angiotensina II (Ang II) y/o endotelina-1 (ET-1) ha sido involucrada en señales patológicas y/o fisiológicas. El presente estudio fue diseñado para estudiar el papel de los ROS en la interacción Ang II/ET-1 y sus implicancias en la contractilidad cardíaca. Se utilizaron cardiomiocitos de gatos adultos aislados mediante digestión enzimática para medir: 1) el acortamiento de los sarcómeros, como índice de contractilidad; 2) la producción de ROS por epifluorescencia; y 3) el ARNm de la preproET-1 por RT-PCR. Estos parámetros fueron analizados en condiciones control y después de exponer los miocitos a Ang II 1 nM durante 15 minutos. La Ang II produce un efecto inotrópico positivo (EIP) de $29.2 \pm 3.7\%$ ($p < 0.05$). El EIP es cancelado por el inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (NHE), HOE642 (10 μ M; $7.9 \pm 10\%$) y por el bloqueante del modo inverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), KB-R7943 (1 μ M; $-13.5 \pm 6.9\%$). La Ang II incrementa los ROS (70 ± 12 unidades de fluorescencia, UF, $p < 0.05$). El EIP y la formación de ROS inducidos por Ang II fueron bloqueados por el antagonista de los receptores (Rc) AT1, losartan (1 μ M; $-6 \pm 3\%$; 27.6 ± 5.6 FU), por el secuestrador de ROS, MPG (1 mM, $-8.4 \pm 3.8\%$; 7.9 ± 6.9 UF), por el bloqueante no específico de los Rc de ET-1, TAK044 (1 μ M, $-4.5 \pm 4.9\%$; 8.13 ± 13.4 UF) y por el bloqueante selectivo del Rc ETA, BQ-123 (10 μ M, $2 \pm 5.3\%$; 4 ± 5 UF). La abundancia de ARNm de preproET-1 se incrementó desde 100 ± 4 % en control hasta $241 \pm 39\%$ luego de Ang II ($p < 0.05$). Este incremento fue anulado por losartan ($74 \pm 20\%$). Los resultados de este estudio nos permiten concluir que el EIP de la Ang II es debido a la acción de la ET-1 endógena liberada y/o formada por la Ang II. La ET-1 actuando sobre los receptores ETA produce: la formación de ROS, la estimulación del NHE y la activación del modo inverso del NCX, conduciendo al influjo de Ca^{2+} y al consecuente EIP.

501. (12700) LA REGRESIÓN DE LA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUCIDA POR INHIBICIÓN DEL NHE1 SE ACOMPAÑA DE DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CALCINEURINA α B. GARCIA-RENA, CAROLINA; ENNIS, IRENE; ESCUDERO, EDUARDO; PÉREZ, NÉSTOR; CINGOLANI, HORACIO

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas UNLP

Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con hipertrofia cardíaca (HC) se trataron 1 mes con dos inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ -1 (NHE1): cariporide (C) y BII6723 (B). La inhibición del NHE1 produjo regresión de la HC evidenciada por disminución del cociente peso del ventrículo izquierdo/peso cor-

poral y de la expresión de ANF y BNP. Como la calcineurina (Cn) juega un papel importante en el desarrollo de varios modelos de HC, se evaluó la expresión de la isoforma A β , indicadora de la actividad de la fosfatasa, en el miocardio hipertrófico de SHR y luego de la inhibición del NHE1. Ambos fármacos normalizaron la expresión de CnA β , aumentada en el miocardio de SHR. La regresión de la HC sin alterar las dimensiones del ventrículo izquierdo ni la presión arterial produjo un aumento del estrés sistólico pico en las SHR tratadas (162 ± 29 vs. 204 ± 34 y 164 ± 26 vs. 234 ± 29 dinas/cm², antes y luego del tratamiento con C y B respectivamente; $P < 0.05$). A pesar de ello, no se detectó un deterioro en el acortamiento miocárdico. Por el contrario, se evidenció una mejoría en la contractilidad cardíaca, sugiriendo que la

regresión de la HC inducida por inhibición del NHE1 se acompaña de un efecto inotrópico positivo. Para descartar que el mismo fuera propio de los fármacos, se trataron ratas normotensas con los mismos. No se observaron cambios significativos en la tensión de la pared ventricular ni en la contractilidad evaluados por ecocardiografía. La inhibición del NHE1 no normalizó el aumento de la rigidez miocárdica detectado en SHR. En conclusión, la regresión de la HC inducida por los inhibidores del NHE1 se acompaña de disminución de la expresión de CnA β y mantenimiento o incluso mejoría de la contractilidad cardíaca a pesar del incremento de la tensión de la pared ventricular; sugiriendo una relación causa-efecto entre la disminución de la actividad de la Cn y la preservación de la contractilidad miocárdica.