

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

ENDOCRINOLOGÍA I

1. (81) **ALTERACIONES DEL EJE GONADOTRÓFICO EN RATONES GABAB1KO.** CATALANO PAOLO NICOLÁS (1, 2), ZUNINO SEBASTIAN (1), BONAVENTURA MARIA MARTA (1), BETTLER BERNHARD (3), LIBERTUN CARLOS (1, 2), LUX-LANTOS VICTORIA (1)

IBYME-CONICET (1); Facultad de Medicina, UBA; (2) Universidad de Basilea, Suiza (3)

Previamente demostramos que ratones hembras carentes de la subunidad GABAB1 del receptor GABAB (KO) tienen alteradas la respuesta de LH postcastración, la ciclicidad y la fertilidad. Los machos no presentan alteraciones manifiestas en este eje. Aquí determinamos el contenido de GnRH en hipotálamo (GnRH-HT) de hembras y machos salvajes (WT) y KO durante la ontogenia (días 4, 12, 20 y adultas) por RIA. En cultivos adenohipofisarios de hembras y machos adultos WT y KO, evaluamos los niveles basales de LH, FSH, PRL y GH y la respuesta de las gonadotropinas al GnRH. Encontramos diferencias significativas entre genotipos, sexos y edades en GnRH-HT (ANOVA triple: interacción triple: $p=0.01$). A los 4 días GnRH de machos WT es mayor que de hembras WT y similar al de hembras KO [GnRH-HT (pg/mg tejido): 4 días: Macho WT: 12.0 ± 1.2 vs. Macho KO: 6.5 ± 0.9 vs. Hembra WT: 6.6 ± 0.9 vs. Hembra KO: 13.5 ± 1.7 , ANOVA: interacción: $p<0.001$]. Estas diferencias entre genotipos y sexos se pierden al los 12 días. A los 20 días se observan nuevos cambios, siendo ahora los niveles de machos mayores que los de hembras ($p<0.04$), y entre genotipos, siendo los niveles de WT mayores que los de KO ($p<0.01$), modificaciones que persisten en la adultez. En cultivos hipofisarios de hembras, PRL y GH basales son similares entre genotipos. En cambio, LH y FSH fueron mayores en células de hembras KO que en WT [LH (ng/50.000 células): WT: 4.5 ± 0.3 vs. KO: 6.1 ± 0.5 , $n=5$, $p<0.05$]. Además, la respuesta al GnRH es menor en células KO [LH (% de estimulación por GnRH): WT: 240.3 ± 40.7 vs. KO: 144.9 ± 12.6 , $n=5$, $p<0.04$]. Las células de machos no mostraron diferencias ni en los valores basales de gonadotropinas ni en la respuesta al GnRH. Concluimos que existe una alteración ontogénica en el contenido hipotalámico de GnRH en los animales KO, más marcado en hembras que en machos. Además la secreción LH y FSH está alterada en células de hembras KO, mientras que en los machos no difiere de los WT. (CONICET, UBA y ANPCYT).

2. (302) **EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (ER) α Y β Y DE LOS MÚLTIPLES TRANSCRIPTOS DE AROMATASA EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA ADRENAL HUMANA DESDE LA INFANCIA TEMPANA HASTA LA PUBERTAD TARDÍA.** BAQUEDANO MARIA SONIA, SARACO NORA, PEPE CAROLINA, BERENSZTEIN ESPERANZA, GOÑI JAVIER, RIVAROLA MARCO A, BELGOROSKY ALICIA

Laboratorio de Investigación. Hospital Garrahan

El proceso de zonación adrenal no está definido. La médula adrenal (MA) alcanza el aspecto adulto a los 18m y está relacionada funcionalmente con la corteza. Hay evidencias de que los

estrógenos (Es) inducen proliferación celular (PC) y producción de DHEAS en H295R y en cultivo de células adrenales (CCA) fetales. Para evaluar el rol de los Es en la adrenergia se estudió la expresión de ER α , ER β y ARO en 41 tejidos adrenales humanos (TAH) en función de la edad. Los TAH se dividieron en 3 grupos (Gr) etarios: Gr1 < 3m, $n=12$, involución de la zona fetal (ZFe); Gr2, 3m a 6a, $n=17$, preadrenarca y Gr3, > 6 a 21a, $n=12$, adrenergia. El ARNm de ER β por RT-PCR semicuantitativa fue más alto en Gr3 (1.54 ± 0.34 UA) que en Gr2 (0.79 ± 0.28), $p<0.05$. En Gr1 fue variable. Por inmunohistoquímica, ER β se observó en la zona reticularis (ZR) del Gr3 y en la ZFe del Gr1. ER α no se detectó en ningún Gr. El ARNm de ARO en Gr3 (1.79 ± 0.73) fue más alto que en Gr1 (0.99 ± 0.29) y Gr2 (1.17 ± 0.61), $p<0.05$. ARO se expresó en la MA en los 3 Gr y en la Z subcapsular del Gr3. Por doble inmunofluorescencia, se observó que ARO y cromogranina A sólo colocalizan en la MA de sujetos < 2a. En estas muestras, los niveles de los transcritos de ARO con exón 1.b fueron 3.5 mayores que en Gr3, mientras que los transcritos con exón 1.a, 1.c y 1.d aumentaron en Gr3, 3.3, 1.9 y 1.7 veces, respectivamente, sugiriendo un cambio en el uso de los promotores con la edad. Además, E2 ($0.1 \mu\text{M}$) estimuló la síntesis de DHEA en CCA del Gr3. Se sugiere que los Es, producidos localmente en MA, tendrían un rol en la diferenciación funcional de la ZR mediados por ER β . La alta expresión de ARO en la Z subcapsular del Gr3, colocalizando con el alto índice de PC previamente reportado, sugiere un efecto de los Es, independiente del ER, en la proliferación y migración de células adrenales progenitoras. Las implicancias de los cambios observados en la expresión de ARO en las células cromafines deberá determinarse.

3. (395) **TERAPIA GÉNICIA PARA LA HORMONA TÍMICA TIMULINA EN RATONES NUDE.** REGGIANI PAULA C., SOSA YOLANDA E., RODRIGUEZ SILVIA S., GOYA RODOLFO G.

INIBIOLP-Histología B, Facultad de Medicina, UNLP, La Plata

La timulina (FTS) es una hormona tímica involucrada en la diferenciación intra y extratímica de las células T, sabiéndose además que ejerce una acción facilitadora sobre la secreción hormonal de la pituitaria anterior. El ratón nude exhibe, a partir de la pubertad, severas deficiencias inmunológicas y desbalances neuroendócrinos que parecen estar vinculados a su carencia de hormonas tímicas circulantes. Los animales homocigotas (nu/nu), particularmente las hembras, muestran severas deficiencias en su función reproductiva cuando se comparan con sus contrapartes heterocigotas (nu/+). Recientemente construimos un vector adenoviral recombinante portador de un gen sintético para el análogo biológicamente activo de timulina denominado metFTS. Dicho vector (RAd-metFTS) es altamente efectivo in vivo para transducir células musculares, las cuales pasan a secretar por largo tiempo (varios meses) altos niveles de metFTS a la circulación. En el presente estudio se inyectaron neonatalmente ratones nu/nu y nu/+ por vía i.m. con 5×10^8 pfu/ratón de RAd-metFTS o RAd- β gal (vector control) en $10 \mu\text{l}$ de vehículo. En los ratones nude, los niveles de timulina sérica a los 13 y 52 días post inyección fueron (media \pm EMS fg/ml) 64 ± 5 vs 12 ± 4 (día 13) y 285 ± 27 vs 37 ± 5 (día 52) para nudes inyectados con RAd-FTS vs RAd- β gal, respectivamente ($p<0,001$ en ambos casos). A los 52 días

de edad las hembras nudes inyectadas neonatalmente con RAd-FTS mostraron niveles séricos de hormona luteinizante (LH) significativamente ($p < 0,001$) más elevados que los nudes tratados con el vector control (LH sérica (media \pm EMS ng/ml): 7,5 \pm 0,9 vs 0,9 \pm 0,5, respectivamente). Estos resultados sugieren que la terapia génica con timulina constituye una estrategia efectiva para restaurar la actividad sérica de esta hormona tímica en modelos de animales timodeficientes, previniendo además la aparición de los bajos niveles séricos de LH, típicos de la hembra nude adulta.

4. (506) CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES EN LA BOCIÓGENESIS TEMPRANA. LISA THOMASZ, MARIA ALEJANDRA DAGROSA, LEON KRAWIEC, DANIEL BRANDIZI, ROMULO LUIS CABRINI, MARÍA INÉS ASCAR, GUILLERMO JUAN JUVENAL, MARIO ALBERTO PISAREV

Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica

La bociogénesis es una consecuencia del desbalance entre factores estimulatorios e inhibitorios. Entre los primeros pueden mencionarse a la TSH, IGF-1, EGF, en tanto que el exceso de yodo y su mediador, la iodolactona (IL) se encuentra entre los factores inhibitorios. En estudios previos demostramos que la IL es capaz de prevenir la generación de bocio inducido por metilmercaptoimidazol (MMI) como de producir la involución del bocio previamente generado. El objetivo del siguiente trabajo fue estudiar el efecto del iodo/IL sobre la muerte celular programada, la proliferación celular y el estado oxidativo celular. Ratas Wistar fueron inyectadas con MMI 10 mg/d durante 1, 7 y 14 días (grupo bocio). La involución del bocio fué inducida por la administración IL (10 mg/día) durante los mismos tiempos (MMI+IL-d). Grupos controles: solución salina, IK 10 mg/día, IL 10 mg/día, IK + MMI. El MMI provocó un aumento significativo del peso tiroideo (M vs C) 140% a los 3 días, 180% a los 7 días y 250% a los 14 días. La IL inhibió el efecto del MMI a partir de los 7 días de tratamiento (M vs M+IL) 23% a los 7 días, 30% a los 14 días. Luego analizamos la muerte celular programada, observamos un aumento en la actividad de caspasa-3(UE/mg prot) en los animales a los cuales se les administró el bociógeno C:1 \pm 0.3 vs M:5 \pm 2*(7 días), C:1.5 \pm 0.8 vs M:8.2 \pm 3* (14 días). Al evaluar el estado oxidativo obtuvimos nuevamente un aumento en los niveles de peróxidos totales en los grupos MMI(nmol peróx/mg prot) C: 0.4 \pm 0.1 vs M: 0.82 \pm 0.3*(7 días), C:0.2 \pm 0.05 vs M:0.5 \pm 0.04* (14 días). Luego analizamos el contenido de DNA celular y la morfometría nuclear por la técnica de Feulgen. A partir de los 3 días de tratamiento el bociógeno produce un aumento de la asimetría de los histogramas de ploidia C:0.33 vs M:1.7*, la IL revierte el efecto.* $p < 0.001$. Conclusiones: La IL previene la generación del bocio inhibiendo la proliferación celular.

5. (632) INSULINORRESISTENCIA INSULAR EN HAMSTERS ALIMENTADOS CON DIETA RICA EN SACAROSA. BORELLI MARIA INES, FRANCINI FLAVIO, GAGLIARDINO JUAN JOSÉ

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)

Objetivo: evaluar el efecto modular autocrino de la insulina sobre el metabolismo de glucosa y la secreción de insulina inducida por glucosa en islotes de hamsters normales y con insulinorresistencia (IR) inducida por la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS). Metodología: medimos la producción de 14CO_2 y $3\text{H}_2\text{O}$ a partir de D-[U- 14C]-glucosa y D-[5- 3H]-glucosa, respectivamente, en islotes aislados (digestión del páncreas con colagenasa) incubados con glucosa 3.3 y 16.7 mM sin o con el agregado de insulina (5 o 15 mU/ml), anticuerpo anti-insulina (dilución final 1:500), nifedipina (25 μM), o wortmanina (150 nM). La insulina liberada al medio se determinó por RIA en islotes incubados con glucosa 3.3 o 16.7 mM sin o con el agregado de wortmanina (75, 150, y 300 nM). Resultados: la insulina aumentó la producción de 14CO_2 y $3\text{H}_2\text{O}$ en islotes control, pero este efecto se redujo significativamente o no se manifestó en islotes de ani-

males con DRS. Mientras que el agregado de anticuerpo anti-insulina, nifedipina o wortmanina al medio con glucosa 16.7 mM disminuyó significativamente la producción de 14CO_2 y $3\text{H}_2\text{O}$ en islotes control, este efecto no se observó en islotes de hamsters con DRS. En estos últimos, el agregado de wortmanina no disminuyó significativamente la liberación de insulina en respuesta a glucosa 16.7 mM, pero si lo hizo en los islotes de hamsters control. Conclusiones: nuestros resultados muestran que el efecto estimulador autocrino de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa observado en islotes normales, está atenuado o ausente en islotes de animales con IR inducida por administración de DRS. Esto sugiere que, al menos en nuestro modelo, la IR también afecta a los islotes pancreáticos.

6. (172) FEOCROMOCITOMA EN LA INFANCIA/ADOLESCENCIA COMO MANIFESTACIÓN INICIAL DE ENFERMEDAD DE VHL. SANSÓ GABRIELA (1), LEVIN GLORIA (1), DAHIA PATRICIA (2), BARONTINI MARTA (1)

CEDIE (1); Dept. Medicine and Cellular and Structural Biology. University of Texas Health Science Center (2).

El Feocromocitoma (Feo) o paraganglioma (Pgl) familiar representa el 20-25% de todos los Feos, formando parte de: enfermedad de Von Hippel Lindau (VHL), Neoplasia Endócrina Múltiple tipo 2, Neurofibromatosis tipo 1, Paraganglioma tipo 1 o 4 (PGL) o como única manifestación de enfermedad. El presente trabajo describe 7 familias donde el Feo o el Pgl fueron la manifestación inicial de enfermedad de VHL en 11/12 casos índice (edad 4-19a, sólo 1 tenía 30 a); sólo 1/11 desarrolló posteriormente un hemangioblastoma cerebral. El tiempo de seguimiento fue de 3-40a, y el tumor fue bilateral en 8 de ellos, los otros 4 presentaron Feo adrenal unilateral y en 1 de ellos se presentó además un Feo extraadrenal. El diagnóstico se realizó por aumento de las catecolaminas, a predominio de NA, y sus metabolitos, confirmando por cirugía. El estudio molecular del gen de VHL fue realizado por la técnica de SSCP y posterior secuenciación automática. En 68 familiares estudiados, se detectaron 25 portadores; 14 sin evidencia de enfermedad. El Feo fue el único hallazgo en 8 portadores, los otros 3 presentaron 2 o mas lesiones; tumor cerebral, quiste renal, hemangioblastoma vertebral o retinal o quiste pancreático. Todas las familias estudiadas presentaron una mutación heterocigota en el gen de VHL tipo mis-sense (R167W, P192L, R161R, R200P, P138R) 4 de las cuales fueron mutaciones nuevas en aminoácidos conservados. Estos resultados enfatizan la importancia de realizar el diagnóstico molecular en pacientes con Feo, particularmente en la infancia, para detectar la presencia de VHL, posibilitando la identificación de los miembros con alto riesgo de desarrollar enfermedad en etapas muy tempranas de sus vidas. Esto permitirá un adecuado seguimiento de la enfermedad, el diagnóstico precoz de las distintas manifestaciones que se presenten a lo largo de la vida y consecuentemente la implementación de un tratamiento más efectivo y un consejo genético acorde.

7. (132) ROL DE PKC Y MAPK EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE PROGESTERONA (PG) EN TEJIDO VASCULAR. CUTINI PABLO HERNAN (1,2), SELLÉS JUANA (1), MASSHEIMER VIRGINIA (1,2)

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

La función vascular es regulada por numerosos factores y hormonas. Hemos demostrado que, en tejido aórtico de rata, la Pg estimula la actividad de NOS y activa las vías mensajeras MAPK y PKC en forma no genómica. En este trabajo nos propusimos investigar el rol de PKC y MAPK en el mecanismo de acción de Pg en tejido vascular. Empleando anillos de aorta de rata, evaluamos la participación de MAPK en la regulación rápida de NOS mediada por Pg. Se observó que el estímulo sobre la síntesis de NO inducido durante 5 minutos de tratamiento con 10nM Pg, se suprime en presencia del inhibidor de la vía MAPK

PD98059 5 μM (0.471 ± 0.10 vs 0.843 ± 0.13 , 0.486 ± 0.07 vs 0.503 ± 0.03 nmol NO/mg prot; control vs Pg +/- PD98059). Se corroboró que la estimulación de NOS por Pg es dependiente de fosforilación; al inhibir la desfosforilación con CalyculinA 0.1nM (inhibidor de fosfatasa PP1/PP2) se potencia la acción hormonal (53% vs 193% sobre el control, Pg vs Pg+CalyculinA, $p < 0.01$). Como efectos genómicos estudiamos la acción de Pg sobre la regulación de la proliferación de células endoteliales obtenidas por cultivo primario de explante de aorta de rata. Para caracterizar el sistema estudiamos la cinética de incorporación de ^3H -timidina (4-48 hs). La máxima proliferación se observó entre las 24 y 36 hs de cultivo. Observamos que 24 hs de tratamiento con Pg incrementaron significativamente la síntesis de DNA (103% sobre el control, $p < 0.05$) no habiendo diferencias a 4 y 36 hs de tratamiento. En presencia del inhibidor de PKC Chelerythrine (Che) 1 μM , el estímulo en la incorporación de ^3H -timidina inducido por 24 hs de tratamiento con Pg se suprime (246 ± 14 vs $180 \pm 4 \times 10^3$ cpm/mg prot, Pg vs Pg+Che; $p < 0.005$). Los resultados presentados nos permiten concluir que la vía mensajera de PKC mediaría las acciones genómicas de la hormona sobre la síntesis de DNA, mientras que la señalización por MAPK se vincula con los efectos rápidos de Pg sobre la actividad de NOS.

8. (233) EXPRESION DE LOS RECEPTORES DE OREXINAS OX1 Y OX2 HIPOTALAMO HIPOFISO OVARICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL. PAPEL DE GNRH Y GONADOTROFINAS. SILVEYRA PATRICIA, LUX-LANTOS VICTORIA, LIBERTUN CARLOS

IBYME; Universidad de Buenos Aires

Recientemente informamos un incremento en la expresión de los receptores OX1 y OX2 en hipotálamo e hipófisis, pero no en corteza, solo en la noche del proestro de la rata. Estos cambios podrían asociarse a los patrones hormonales del proestro y no al ciclo luz-oscuridad (Medicina 65, Sup. II, Pag. 46). Aquí extendemos los estudios analizando la expresión de OX1 y OX2 en ovarios de ratas de 60 días a las 11, 15, 17, 19 y 23 h en todos los días del ciclo, mediante Real Time RT-PCR. Además analizamos la expresión de OX1 y OX2 en ovario, hipófisis e hipotálamo a las 19h del proestro, y del precursor de orexinas preproorexina (PPO) en hipotálamo, de ratas tratadas con Cetrorelix (CRX: antagonista de receptores de GnRH), Nembutal (NEM: anestésico general que bloquea la liberación hipotalámica de GnRH) o salina (SAL), como control, a las 14h del proestro. Se midió la ingesta en g., y las hormonas séricas por RIA observándose los picos preovulatorios de gonadotropinas y esteroides propios de la cepa y la mayor ingesta durante la noche, siendo esta menor en el estro. En ovario se observó un aumento de la expresión de OX1 a las 17, 19 y 23 h.; y de OX2 a las 17 y 19 h del proestro. [$\Delta\Delta\text{Ct}$ OX1 11h: 1.00 ± 0.06 (n=4) vs. 19h: 2.52 ± 0.55 (n=4), $p < 0.05$; $\Delta\Delta\text{Ct}$ OX2 11h: 1.00 ± 0.36 (n=4) vs. 19h: 4.12 ± 0.49 (n=5), $p < 0.05$]; no se observaron aumentos en los restantes días del ciclo. El tratamiento con CRX (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y NEM (30 mg/kg) disminuyó significativamente la expresión de OX1 y OX2 en ovario e hipófisis (tejidos periféricos) respecto de SAL, pero no en hipotálamo, sugiriendo mecanismos de regulación diferentes. La expresión de PPO en hipotálamo de animales tratados con CRX y NEM no se modificó. Concluimos que los incrementos en la expresión de OX1 y OX2 en hipófisis y ovario serían dependientes de GnRH y/o gonadotropinas, mientras que dicha expresión, y la de PPO en hipotálamo, serían independientes de las mismas (CONICET-UBA-ANPCYT).

GENÉTICA I

9. (237) DIME CON QUÉ GENES ANDAS Y TE DIRÉ A QUÉ HORA. POLIMORFISMOS EN GENES RELOJ INVOLUCRADOS EN VARIACIONES FENOTÍPICAS DE PREFERENCIA DIURNA. CASIRAGHI LEANDRO PABLO (1), FACCONNE DIEGO FRANCISCO (2), MAFFIA PAULO CÉSAR (2), GOLOMBEK DIEGO ANDRÉS (1)

Laboratorio de Cronobiología, Universidad Nacional de Quilmes (1); Laboratorio de Estudios Genéticos Aplicados, Universidad Nacional de Quilmes (2)

Introducción: El reloj molecular circadiano comprende un mecanismo de retroalimentación transcripcional en el que participan genes como clock, cry y la familia per. Se ha propuesto que variaciones en estos genes podrían provocar diferencias fenotípicas circadianas. Por otro lado, existe una caracterización de cronotipos humanos basada en la preferencia temporal y capacidad fisiológica a lo largo del día, relacionada al período endógeno. El objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre cronotipos y ocurrencia de un polimorfismo VNTR (4 o 5 repeticiones de 54bp) en per3 y un SNP C/T en el 3'UTR de clock, en una población local. Métodos: Se determinó la preferencia diurna de 40 sujetos a través del Cuestionario de Horne-Ostberg (HO) y se seleccionaron 3 grupos (9 vespertinos, 9 matutinos, 10 intermedios). Luego fueron genotipados a partir de muestras de sangre en ambos polimorfismos utilizando PCR y RFLP. Resultados: Las frecuencias alélicas del VNTR en per3 presentan correlación significativa respecto a los cronotipos (χ^2 para tendencias, $P=0,040$). En el grupo vespertino se observó una baja frecuencia del alelo 5 de per3 (test exacto de Fisher a dos colas vs. intermedios, $P=0,043$), así como del alelo C de clock ($P=0,035$). Por bioinformática se calcularon las estructuras secundarias más estables de una región de 400 bases del mRNA de clock conteniendo el SNP, observándose diferencias estructurales importantes. Conclusiones: El polimorfismo VNTR en per3 es un marcador potencial de preferencia diurna, y provee mayores datos sobre la función del gen en el reloj, ya que el mismo se sitúa en la proteína PER3 en una zona cercana al sitio de unión de kinasa CK1e, participante del mecanismo molecular circadiano, y agrega 5 aminoácidos fosforilables por ésta. La predicción bioinformática realizada podría indicar un efecto sobre la estabilidad o posterior traducción del mRNA de clock, que sea la causa de las diferencias fenotípicas observadas.

10. (236) ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR ATROSCLERÓTICA Y POLIMORFISMO -1131 T/C EN EL GEN DE LA APOPROTEÍNA A5 EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN BONAERENSE. BAÑARES VIRGINIA, BARENGO NOEL, CERRETINI ROXANA, SCHREIER LAURA, TAVELLA JULIO

CNGM, ANLIS "Carlos G. Malbrán"; UNLP-CIC; Dep. Pub. Health and Gen. Practice, Univ. Kuopio, Finlandia; Lab. Lípidos y Lipoproteínas, FFYB UBA; INIBIOLP, CONICET.

Recientemente se identificó la apoproteína AV. Ratones transgénicos que sobreexpresan apo AV presentaron menores concentraciones de triglicéridos (TG), mientras que los ratones knockout para este gen mostraron incrementos de TG plasmáticos. El gen APOA5 sería candidato para buscar polimorfismos que actúen como factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ECA). En algunas poblaciones el alelo C del polimorfismo -1131 T/C se asoció con mayores niveles de TG y con riesgo aumentado de enfermedad coronaria. No existen estudios en nuestra población. Objetivo: evaluar la relación entre este polimorfismo, los niveles de TG y la ECA en una muestra de pacientes con aterosclerosis angiográficamente demostrada, en nuestra población. Se estudiaron preliminarmente 221 muestras, del banco de ADN para el estudio de factores de riesgo genético de ECA en Buenos Aires, 152 casos con estenosis mayor o igual al 30% y 69 controles con angiografía normal. Todos los estudios angiográficos fueron realizados con el mismo equipo e informados por los mismos dos profesionales. Se realizó una regresión logística y no se observaron diferencias significativas ($\text{OR} = 0.770$; 95% CI: 0.381-1.556) en la presencia/ausencia del alelo C (CT+CC vs. TT) entre casos y controles, ajustando por edad y sexo. El valor medio de TG fue significativamente mayor en los portadores del alelo C respecto de los no portadores (220 ± 143 y 155 ± 95 mg/dl respectivamente) ($p=0.007$) considerando los menores de 61 años y que no tomen hipolipemiantes. Si bien preliminares, se destacan estos resultados evaluados a través de una regresión logística sobre una población con diagnóstico de ECA,

y que han mostrado concordancia con reportes de otras poblaciones, con respecto al incremento de TG en los portadores del alelo C del polimorfismo -1131 T/C APOA5, en comparación con los no portadores.

11. (271) HEMOFILIA A (HA) Y B (HB) EN ARGENTINA: ALGORITMO INTEGRADO PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES DEL FACTOR VIII (F8) Y IX (F9) HUMANOS. ROSSETTI LILIANA, RADIC PAMELA, CANDELA MIGUEL, PÉREZ BIANCO RAÚL, DE TEZANOS PINTO MIGUEL, LARRIPA IRENE, DE BRASI CARLOS

Academia Nacional de Medicina

Las HA y HB son coagulopatías ligadas al sexo, causadas por mutaciones en el F8 y F9. Entre ellas, las grandes inversiones del intrón 22 (Inv22) y del intrón 1 (Inv1) están involucradas en la mitad de las HA severas. Tanto en HA como en HB, el resto de las mutaciones causales en todo el rango de severidad, incluyen grandes y pequeñas deleciones e inserciones, defectos missense, nonsense, y del splicing. El objetivo del trabajo es presentar un protocolo óptimo de análisis molecular de mutaciones causales de hemofilia, adaptado a nuestro país. En HA severa primero se investiga la Inv22 por PCR-inversa, método desarrollado por nosotros en reemplazo del Southern blot y los basados en PCR-larga distancia (LD-PCR); en los casos Inv22 negativos, la Inv1, por doble-PCR. En los restantes casos (HA y HB, severa, moderada y leve), se aborda el estudio de grandes rearrreglos (deleciones o inserciones) en probandos (hemicigotas) por análisis de PCR exón-específica y luego LD-PCR para obtener una señal positiva detectable en heterocigotas. El screening de mutaciones pequeñas se realiza por análisis de heteroduplex mediante CSGE de alta resolución y secuenciación de DNA. Asimismo, se aplican los criterios de asignación de causalidad al cambio observado. En cada familia, la simplificación del diagnóstico de la mutación pequeña se aborda por CSGE de menor resolución, o por cambios específicos del patrón de restricción. Este protocolo permitió caracterizar más de 200 individuos de 64 familias con HA y 9 con HB. En HA se encontraron 30 (43%) casos con la Inv22 y 1 con la Inv1; 10 (14%) con grandes deleciones; 13 (19%) pequeñas Ins/Del; 5 (7%) de defectos missense, 4 (5%) nonsense y 1 del splicing. En HB, se observó 1 pequeña deleción, 5 defectos missense, 3 nonsense y un polimorfismo neutral (Malmö). Este algoritmo permite identificar el defecto causal en virtualmente todas las familias afectadas, y proveer información segura para el asesoramiento genético y para el diseño terapéutico.

12. (370) ALELOS TRANSCRIPCIONALMENTE DEFICIENTES DEL GEN DE LA PRODINORFINA MODIFICAN EL RIESGO A DESARROLLAR EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL. KAUFFMAN MARCELO, CONSALVO DAMIAN, AGUIRRE FLORENCIA, KOCHEN SILVIA

Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía; Residencia de Neurología, Hospital Ramos Mejía

Introducción y Objetivos: Factores genéticos serían importantes en el desarrollo de la Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT). La Prodinorfina (PDYN) participaría en el hipocampo en mecanismos regulatorios de la sincronía neuronal. El promotor del gen PDYN exhibe un polimorfismo funcional de repetición, donde alelos con más repeticiones (H) presentan mayor eficiencia transcripcional que los de menos repeticiones (L). Materiales y Métodos: Desarrollamos un estudio de asociación en una población de pacientes con ELT mesial con Esclerosis del Hipocampo (EMTEH) y revisión sistemática de la literatura para investigar el rol de este polimorfismo en la patología. Se incluyeron 102 pacientes con EMTEH y 86 controles sanos no relacionados. Se investigó presencia de historia familiar de eventos comiciales (predisposición familiar). Se genotipificó el polimorfismo en el promotor de PDYN mediante PCR. Se compararon frecuencias alélicas y genotípicas mediante prueba de χ^2 . Se estimó Odds Ratio (OR) mediante regresión logística. Para el meta-análisis, se identifica-

ron estudios de asociación caso-control entre PDYN y ELT mediante búsqueda en PUBMED. Se extrajeron frecuencias alélicas y genotípicas. Se estimó OR global mediante modelo de efectos fijos con herencias dominante y co-dominante. Resultados: En nuestra población, la frecuencia genotípica y alélica no fue diferente entre casos y controles ($p=0,61$) ni en el análisis limitado a ELT con predisposición familiar. ($p=0,71$) En el meta-análisis, analizamos 591 pacientes con ELT y 1117 controles sanos. Encontramos asociación del alelo L ($p=0,003$; OR=1,40; IC 95=1,12-1,74), con un riesgo modestamente aumentado a desarrollar ELT en el grupo de pacientes con predisposición familiar. Conclusiones: Variantes alélicas funcionales en el promotor de PDYN modificarían el riesgo a desarrollar ELT en sujetos familiarmente predispuestos.

13. (488) RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO CLÍNICO-BIOQUÍMICO PARA IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES GENÉTICAS PEROXISOMALES (EGP). BENDER SILVINA EDITH, GUELBERT NORBERTO, MALAMUD HEBE, BEZARD MIRIAM, BECERRA ADRIANA, DODELSON DE KREMER RAQUEL

Centro de Estudio de las Metabopatías Congénitas, CEMECO, Hospital de Niños de Córdoba; Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Las EGP son Errores Innatos del Metabolismo de severo y heterogéneo compromiso neurológico y variable expresión multisistémica. Dos grupos se reconocen: defectos en la biogénesis peroxisomal (DBP) y deficiencias enzimáticas aisladas (DEA). Los DBP incluyen: Síndrome de Zellweger (SZ), Adrenoleucodistrofia Neonatal, Síndrome de Refsum Infantil y la Condrosplasia Rizomélica Punctata (CDRP). A las DEA pertenecen la Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X), Enfermedad de Refsum (ER), Hiperoxaluria y Acidemia Pipecólica. A 600 pacientes compatibles con EGP (neuroimágenes, laboratorio general y endocrinológico, entre otros), se aplicó el Protocolo conformado por determinaciones bioquímicas específicas y secuenciales en el siguiente orden: a) cuantificación de ácidos grasos de cadena muy larga y cadena ramificada en plasma por cromatografía gaseosa (CG), b) ácidos orgánicos urinarios por CG, c) plasmalógenos eritrocitarios y ácido pipecólico plasmático. Objetivo: comunicar los resultados preliminares del protocolo propuesto. Con la aplicación del Protocolo propuesto la identificación de EGP fue de un 4,2% (25/600) distribuidos en: ALD-X (n=17) 68%; CDRP (n=2) 8%; ER (n=1) 4%; SZ (n=1) 4% y defectos de la β -oxidación peroxisomal (n=4) 16%. En adición, 16 portadoras de ALD-X de 9 familias fueron identificadas. Cabe destacar la prevalencia dominante de ALD-X y la concomitante identificación de mujeres heterocigotas. Se estima que el impacto de estos resultados estaría en: posibilitar un diagnóstico precoz y adecuado manejo de pacientes con ALD-X, permitir el asesoramiento genético a las familias involucradas y proseguir con niveles de mayor complejidad metodológica para la exacta definición del genérico grupo de deficiencias de la β -oxidación peroxisomal.

14. (341) METILACIÓN ABERRANTE DE GENES SUPRESORES DE TUMOR EN MIELOMA MÚLTIPLE Y GAMOPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO. STANGANELLI (1) CARMEN, CHENA (1) CHRISTIAN, BARREYRO (1) PAULA, ZIMERMAN (2) JULIANA, FANTL (2) DOROTEJA, CORRADO (1) CLAUDIA, SLAVUTSKY (1) IRMA

Academia Nacional de Medicina (1); Hospital Italiano (2)

Los cambios epigenéticos son modificaciones del genoma que no alteran la secuencia del ADN. Entre ellos la metilación de las islas CpG ubicadas a nivel de los promotores génicos, normalmente no metilados, ha sido asociada con inactivación de la transcripción, pudiendo determinar el silenciamiento de genes supresores de tumor (GST). En este trabajo evaluamos el patrón de metilación de los GST: p15INK4b, p16INK4a, p14ARF, SOCS-1, RASSF1A

y TP73 en 39 pacientes con mieloma múltiple (MM) (16 varones; edad media 67,5 años) y 8 pacientes con Gamopatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS) (3 varones; edad media 68,6 años). El ADN de médula ósea (MO) de pacientes y controles fue purificado usando el método de fenol/cloroformo. El patrón de metilación se evaluó con la técnica de MSP (Methylation-Specific PCR) basada en la capacidad del bisulfito de convertir las citosinas en uracilo, pero sin modificar las 5'-metilcitosinas. Ninguna de las secuencias blanco estaban metiladas en muestras normales. En MM, el 87% de los pacientes tenía al menos un gen metilado, observándose dos o más en el 59% de los casos. La frecuencia de metilación de los genes SOCS-1, TP73, p15INK4b, p14ARF, p16INK4a y RASSF1A fue de 66%, 50%, 36%, 28%, 10% y 3%, respectivamente. Se observó un mayor porcentaje de casos con más del 60% de infiltración de la MO en los pacientes con SOCS-1 metilado (30%) que en los no metilados (14%), encontrándose valores similares en ambos grupos al evaluar el gen TP73 (22% y 29%, respectivamente). En MGUS, el 50% de los casos presentó algún gen metilado, mostrando diferencias significativas respecto del porcentaje de metilación observado en MM ($p < 0,03$). Las frecuencias observadas fueron de 13% para p15INK4b y SOCS-1 y de 25% para p14ARF y TP73. Estos datos muestran un patrón diferente de metilación en MM y MGUS, con valores similares sólo para p14ARF, sugiriendo que la metilación de este gen podría ser un evento temprano en la patogénesis del MM.

15. (461) DUPLICACIÓN 24-PB EN EL GEN DE LA QUITOTRIOSIDASA: ESTIMACIÓN DE LA FRECUENCIA EN UNA POBLACIÓN CONTROL DE CÓRDOBA (ARGENTINA) Y EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE GAUCHER TIPO 1. GINER- AYALA ALICIA, ANGARONI CELIA, PASCHINI-CAPRA ANA, DELGADO ANDREA, AZAR NYDIA, DODELSON DE KREMER RAQUEL

Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas, CEMECO; Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC; Hospital de Niños, Córdoba

El incremento de actividad de la quitotriosidasa (QT) plasmática en la Enfermedad de Gaucher (EG) es el biomarcador diagnóstico y de monitoreo de la terapia de reemplazo enzimático (TRE). Su aplicación fue incorporada en la pesquisa de lisosomopatías. Un único polimorfismo, la duplicación 24-pb (dup 24-pb) en el gen CHIT1, causa deficiencia total de actividad enzimática (AE) en homocigosis e intermedia en heterocigosis. La frecuencia alélica en diferentes poblaciones es variable, 0% en africanas y un 26% en caucásicas. Objetivos: a) Conocer la frecuencia de la dup 24-pb en una muestra control sana (Grupo 1) y en pacientes con EG Tipo 1 autóctonos (Grupo 2). b) Evaluar los efectos del polimorfismo en la AE en ambos grupos. Material y Métodos: La dup 24-pb se estudió por PCR. La AE se analizó en el Grupo 1, $n=100$ (0,5-57a) y en el Grupo 2, $n=9$ (0,5-43a) antes de la TRE. Resultados: La frecuencia alélica de la dup 24-pb fue 25% (grupo 1) y 33% (grupo 2). Análisis de los genotipos QT, homocigota normal (n/n), heterocigota (n/d) y homocigota dup 24-pb (d/d) y su correlación con la AE media \pm DS (nmol/h/ml). Controles: n/n 52% ($n=52$), AE: 26 ± 12 ; n/d 45% ($n=45$), AE: 14 ± 9 y d/d 3% ($n=3$), AE: $0,14\pm 0,3$. Pacientes EG Tipo 1: n/n 44,5% ($n=4$), AE: 19729 ± 16238 ; n/d 44,5% ($n=4$), AE: 5545 ± 5253 y d/d 11% ($n=1$), AE: 0. La AE media fue significativamente menor en los heterocigotas n/d que en homocigotas n/n (Grupo 1, $p < 0.0001$ y Grupo 2, $p < 0.0001$). En pacientes con genotipo QT normal, el incremento de la AE se correlacionó con la expresión de la enfermedad. En los heterocigotas, la AE decreció el 65%. La deficiencia de QT representó una limitación absoluta del uso del biomarcador. Conclusiones: la frecuencia alélica del polimorfismo fue similar a la de poblaciones caucásicas. La heterocigocidad para la dup 24-pb reduce la AE de la QT, de allí es fundamental considerar la particular condición genotípica en la interpretación de la actividad QT en pacientes con EG.

INMUNOLOGÍA I

16. (77) CITOQUINAS PRODUCIDAS POR OSTEÓBLASTOS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR BRUCELLA SPP. DELPINO M. VICTORIA, FOSSATI ALBERTO, BALDI PABLO

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral

La brucelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella*. Si bien las complicaciones osteoarticulares son las más frecuentes en la brucelosis activa, no han sido descriptos aún los mecanismos patogénicos implicados. Por lo tanto, nuestro objetivo es estudiar la respuesta inmune inducida durante la infección osteoarticular por *Brucella* spp. Para ello, se infectaron las líneas de osteoblastos humanos MG63 y SaOS-2 con *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*. En los sobrenadantes se midió la expresión de la citoquina proinflamatoria TNF-alfa y de las quemoquinas IL-8 y MCP-1. Los resultados mostraron a una multiplicidad de infección de 1000 bacterias por célula las tres especies de *Brucella* son capaces de infectar ambas líneas de osteoblastos, aunque con distinta capacidad de persistencia intracelular. *B. abortus* y *B. suis* fueron capaces de replicarse por más de 72 horas post infección, mientras que *B. canis* fue eliminada a las 24 horas post infección. Para la línea MG63, los valores a las 24 horas de IL-8 fueron *B. abortus* $119,80\pm 0,136$, *B. suis* $133,98\pm 0,010$ y *B. canis* $150,99\pm 0,71$ pg/ml; mientras que los de MCP-1 fueron $208,73\pm 4,05$, $80,15\pm 1,52$ y $250,47\pm 3,87$ pg/ml, respectivamente. Resultados análogos se obtuvieron con la línea SaOS-2. En cambio, el tratamiento de los osteoblastos con *Brucella* spp muerta por calor sólo indujo la producción de la quemoquina MCP-1, y sólo para la línea MG-63. La producción (en pg/ml) de MCP-1 aumentó con la relación bacteria/célula: $10(5)=2,27\pm 0,028$; $10(4)=2,09\pm 0,043$; $10(3)=1,85\pm 0,012$; $10(2)=1,518\pm 0,041$. Estos resultados muestran, que *Brucella* spp es capaz de infectar osteoblastos, lo cual quizás explique en parte la persistencia de las manifestaciones osteoarticulares. Al mismo tiempo la producción de citoquinas y quemoquinas muestra que los osteoblastos pueden ser activados por la infección y reclutar hacia el sitio de infección células que podrían mediar el fenómeno inflamatorio y de destrucción tisular.

17. (84) MODELO MURINO DE SINDROME URÉMICO HEMOLÍTICO POR INGESTION DE BACTERIAS ESCHERICHIA COLI O157:H7 PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC). FERNÁNDEZ BRANDO ROMINA, BENTANCOR LETICIA, RAMOS MARÍA VICTORIA, FERNÁNDEZ GABRIELA, GONZÁLEZ MARIELA, MEISS ROBERTO, RIVAS MARTA, PALERMO MARINA

Academia Nacional de Medicina; Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Carlos G. Malbrán

Debido a que el modelo murino de SUH por inyección endovenosa de Stx2 no permite analizar las primeras etapas de la infección, nuestro objetivo fue establecer uno por inoculación intragástrica (ig) de bacterias STEC. Siendo los ratones adultos resistentes, se inocularon ig dos cepas de ratones (BALB/c y C57BL/6) a la edad del destete (16-19 días) con distintas concentraciones de *E. coli* O157:H7 Stx+, aisladas de pacientes con SUH (125/99;119/01;108/01;431/01). Como control se usó la cepa *E. coli* O157:H16 Stx- aislada de un caso de diarrea (893/05). Se evaluó mortalidad; uremia; aislamiento de colonias y PCR para stx2 en materia fecal e intestino; histopatología. La dosis infectiva óptima para BALB/c fue entre $1-5\times 10^7$ UFC y para C57BL/6 $1-5\times 10^6$ UFC. Inoculando la cepa control 893/05 la mortalidad fue del 17% con uremias de $58,3\pm 17,3$ mg% ($n=18$). Entre las cepas Stx+, la 125/99 provocó el mayor índice de mortalidad y daño renal. La mortalidad para BALB/c fue 46% (1×10^7 UFC, $n=35$) y 53% (5×10^7 UFC, $n=30$) con uremias a las 72hs posteriores a la inoculación de 168 ± 47 mg% y 137 ± 26 mg% respectivamente. Para los C57BL/6 la mortalidad fue 33% (1×10^6 UFC, $n=9$) y 92% (5×10^7 UFC, $n=13$) con uremias de 195 ± 106 mg% y 92 ± 20 mg%,

respectivamente. Todos los valores de urea fueron significativamente mayores que la de los animales inoculados con la cepa control ($p < 0.01$). El daño renal fue confirmado histológicamente. El aislamiento bacteriano y la detección de stx2 por PCR para 5×10^7 UFC en BALB/c a las 48hs dio positivo en materia fecal (7/9 ratones), intestino delgado (7/9) e intestino grueso (4/9). Se obtuvieron resultados similares para 1×10^7 UFC, aunque el número de UFC recuperadas fue menor. Se observó que a las 72hs todos los animales que murieron presentaron aislamiento bacteriano y PCR+ en materia fecal. Concluimos que los ratones a la edad del destete presentan daño renal por Stx luego de la ingestión de STEC, constituyendo un modelo apto para el estudio de la primera fase del desarrollo del SUH.

18. (178) DIFERENCIAS CUALI-CUANTITATIVAS EN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR DE PACIENTES INFECTADOS CON EL SUBTIPO B DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA O FORMAS RECOMBINANTES BF CIRCULANTES EN ARGENTINA. TURK GABRIELA, GHERARDI MARIA MAGDALENA, LAUFER NATALIA, CAHN PEDRO, COX JOSEPHINE, SALOMON HORACIO

Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Hospital Fernández, Buenos Aires, Argentina; Henry M Jackson Foundation/Us Military HIV Research Program, Rockville, Md, Estados Unidos

La gran diversidad del HIV es uno de los principales obstáculos para el desarrollo de una vacuna efectiva. Por esto, es imperioso conocer los epitopes determinantes de la inmunidad cruzada intersubtipos. En Argentina, la epidemia esta caracterizada por la co-circulación de variantes del subtipo B y formas recombinantes BF. Objetivo: Caracterizar la respuesta celular T frente a la proteína viral Nef en pacientes infectados con el subtipo B o formas recombinantes BF del HIV-1. Métodos: Se reclutaron 14 pacientes HIV-1+ con infección documentada no mayor a 6 meses. Se evaluó la carga viral plasmática, recuento de CD4+ y haplotipo HLA. La respuesta celular se evaluó mediante la cuantificación de células secretoras de IFN-gamma en forma específica por la técnica de ELISPOT. Se utilizó la correlación de Spearman y los tests de Wilcoxon o Mann-Whitney para el análisis estadístico. Resultados: Los pacientes se agruparon según su subtipo viral en el gen nef. Los resultados generales se resumen en la tabla. Los pacientes BF mostraron una respuesta de mayor magnitud aunque dirigida a un número menor de epitopes, concentrados en el core de la proteína viral, mientras que la respuesta de los pacientes B fue más amplia, dirigida a múltiples dominios proteicos. Conclusiones: Se observó un alto nivel de reactividad celular cruzada en pacientes HIV-1 infectados con diferentes subtipos. Sin embargo, la evaluación de la respuesta utilizando péptidos individuales permitió observar que existen diferencias intersubtipos en el número de epitopes reconocidos, en la magnitud de la respuesta y en los dominios estructurales de la proteína Nef usados como blanco de la respuesta.

	Número de péptidos (rango) reconocidos	Mediana de la	Magnitud formadoras de respuesta	(Unidades spots (SFU)/106PBMC); Mediana (rango)
Pacientes	Péptidos Péptidos Autólogos (PA)	Péptidos Heterólogos (PH)	PA	PH
B (N=8)	2.75 (1-6)	2 (0-4)	179 (50-771)	112.5 (50-960)
BF (N=6)	1.83 (1-4)	1.5 (1-4)	776 (80-4530)	1326 (40-4250)

19. (339) BRUCELLA ABORTUS INHIBE LA EXPRESIÓN INDUCIDA POR IFN-GAMA DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE II (MHC-II) Y LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA EN MONOCITOS/MACRÓFAGOS HUMANOS. BARRIONUEVO PAULA,

CASSATARO JULIANA, DEPINO MARÍA VICTORIA, ZWERDLING ASTRID, PASQUEVICH KARINA ALEJANDRA, GARCÍA SAMARTINO CLARA, GIAMBARTOLOMEI GUILLERMO HERNÁN

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)

Brucella abortus induce una poderosa respuesta Th1, sin embargo es capaz de modular esta respuesta y establecer una infección crónica. Recientemente demostramos que *B. abortus* muerta por calor (HKBA) inhibe la expresión inducida por IFN- γ de MHC-II en células THP-1. Además, determinamos que el componente responsable del efecto mediado por *B. abortus* son las lipoproteínas, usando la lipoproteína L-Omp19 como modelo. En este trabajo, investigamos el efecto de la infección con *B. abortus* sobre la expresión inducida por IFN- γ de MHC-II. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* por 2 hs en presencia de IFN- γ y luego mantenidas por 48 hs con esta citoquina. La expresión de MHC-II fue evaluada por citometría de flujo. La infección con *B. abortus* disminuyó significativamente la expresión inducida por IFN- γ de MHC-II. Luego, nos propusimos caracterizar los receptores tipo Toll (TLR) involucrados en el efecto mediado por *B. abortus*. La inhibición de la expresión de MHC-II mediada por HKBA y L-Omp19 fue revertida significativamente por anticuerpos (Ac) anti-TLR2, pero no anti-TLR4. Utilizando un hibridoma de células T antígeno específico, demostramos que la inhibición de MHC-II mediada por HKBA y L-Omp19 correlacionó directamente con una disminución del procesamiento y la presentación antigénica. Por último, estudiamos el mecanismo involucrado en el efecto mediado por *B. abortus*. La preincubación de células THP-1 con Ac anti-IL-6, pero no anti-IL-10, revirtió parcialmente la inhibición de MHC-II y el procesamiento antigénico mediados por HKBA y L-Omp19. Además, IL-6 agregada exógenamente disminuyó la expresión de MHC-II inducida por IFN- γ . Nuestros resultados demuestran que la IL-6 secretada durante la infección por *B. abortus* es una molécula clave en la inhibición del procesamiento y la presentación antigénica de los monocitos/macrófagos humanos. Esto permitiría evadir el reconocimiento inmune y establecer una infección crónica.

20. (350) CINÉTICA Y MECANISMO DE MUERTE MEDIADA POR LÍQUIDO PLEURAL TUBERCULOSO: RÁPIDA INDUCCIÓN DE LA VÍA MITOCONDRIAL DE APOPTOSIS EN CÉLULAS NATURAL KILLER (NK). SCHIERLOH PABLO, YOKOBORI NOEMI, ALEMÁN MERCEDES, MUSELLA ROSA, CASTAGNINO JORGE, BALDINI MATÍAS, GEFFNER LAURA, ABBATE EDUARDO, DE LA BARRERA SILVIA, SASIAIN MARÍA DEL CÁRMEN

IIHema, Academia Nacional de Medicina; Servicio de Tisiopneumología, Hospital Muñiz

En trabajos anteriores observamos que factores solubles presentes en el derrame pleural tuberculoso (TB-LP) inducen apoptosis de células NK. A fin de caracterizar la cinética de este proceso medimos, por citometría de flujo, la expresión superficial de fosfatidil serina (PS), de CD16 y el contenido nuclear en células NK (CD3-CD56+) a lo largo de 72hs de cultivo de linfocitos periféricos en TB-LP o en medio (n=9). Los resultados muestran una secuencia de eventos iniciada por la reducción significativa del %NK CD16+ dentro de las primeras 6hs de cultivo (Medio=86 \pm 2%, TB-LP=40 \pm 12%, $p < 0.05$) seguida de un aumento del %NK Annexina V+(AV) a las 24hs (Medio=6 \pm 3%, TB-LP=67 \pm 10%, $p < 0.005$) y finalmente un aumento del %NK sub-G1 a partir de las 48hs (Medio=6 \pm 2%, TB-LP=45 \pm 8%, $p < 0.01$). Para identificar el mecanismo de muerte, analizamos la activación de caspasa 3 (Csp 3) y realizamos cultivos en presencia de inhibidores farmacológicos de Csp 8 y Csp 9. A las 18hs de cultivo encontramos un aumento en el %NK Csp 3-activa+ (Medio=1,4 \pm 2,1%, TB-LP=21 \pm 5%, $p < 0.01$). Por otra parte, solo el tratamiento con el inhibidor (inh) de Csp 9 redujo el %NK AV+ (TB-LP=76 \pm 6%, inh-Csp9 +TB-LP=47 \pm 10% ($p < 0.05$), inh-Csp8 +TB-LP= 72 \pm 4% ($p > 0.1$)). Finalmente, evaluamos la actividad mitocondrial en linfocitos depletados de células CD3+/CD20+ cul-

tivados en TB-LP, por medio del ensayo de reducción de MTT. A 3hs de cultivo, donde la viabilidad celular no se ve afectada, encontramos una significativa disminución del MTT-reducido (Medio=90±5%, TB-LP= 48±8%, p< 0.02) indicando que la pérdida de la función mitocondrial es un evento inicial previo a la muerte. Los resultados demuestran que componentes solubles presentes en el TB-LP inducen la vía mitocondrial de apoptosis, en un proceso que involucra la activación de caspasas efectoras seguida de disminución de receptores de superficie, culminando con la muerte de las células NK.

21. (375) PRODUCCION DE IGA POR YERSINIA ENTEROCOLITICA O:8 DEFICIENTE EN YOP H. BLANCO HELGA MYRNA, DI GENARO MARIA SILVIA

Univesidad Nacional de San Luis

La proteína externa de Yersinia (Yop) H es un factor de virulencia plasmídico con actividad fosfatidiltirosina fosfatasa que inhibe mecanismos de defensa del huésped. El rol de Yop H en la respuesta inmune en mucosas no ha sido previamente estudiado. En trabajos previos se ha demostrado que la cepa mutante sych-, deficiente en la secreción de YopH, podría ser usada como vacunas carrier. Los objetivos del presente trabajo fueron investigar la inducción de IgA específica luego de la infección oral con Y. enterocolitica O:8 sych-, comparar dicha respuesta con la inducida por la cepa wild-type (WAP) y analizar su grado de atenuación en condiciones de deficiencia de TNFRp55, IL-12p40 o IL-4. Se verificó por SDS-PAGE la ausencia de la secreción de Yop H en la cepa mutante. Ratones C57BL/6 normales, TNFRp55-/-, IL-12p40-/- e IL-4-/- fueron infectados por vía intragástrica con Y. enterocolitica O:8 wild-type (WAP) o sych- (5x10⁸ UFC). Se analizó el índice de supervivencia y la cinética de la respuesta de IgA extraída de materia fecal cada 7 días después de la infección (días 7 al 56). La integridad de la IgA extraída fue analizada por inmunoblotting. Ratones TNFRp55-/-, IL-12p40-/- e IL-4-/- fueron altamente susceptibles a la infección con Y. enterocolitica WAP (supervivencia del 0-25%). La cepa mutante sych- demostró estar atenuada en estos ratones inmunodeficientes (supervivencia 100%). El pico de respuesta de IgA específica fue detectado el día 28, siendo significativamente mayor en ratones C57BL/6 infectados con sych- comparado con WAP (p< 0,001). Se concluye que la mutante sych- está altamente atenuada en su virulencia e induce respuesta de IgA en intestino. TNFRp55, IL-12p40 e IL-4 no participan en la respuesta inmune frente a esta mutante. YopH podría inhibir la secreción o transporte de IgA en mucosas.

22. (388) EL PERFIL CLÍNICO DEL PACIENTE TUBERCULOSO. I. SU RELACION CON LA RESPUESTA INMUNE CELULAR IN VITRO. MAHUAD CAROLINA, BOZZA VERÓNICA, D'ATTILIO LUCIANO, DÍDOLI GRISELDA, PEZZOTTO STELLA MARIS, GIRI ADRIANA, BAY MARÍA LUISA, BOTTASSO OSCAR

Instituto de Inmunología, Facultad. de Cs. Médicas UNR; Área de Virología, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas UNR

Si bien es lógico pensar que el perfil clínico del paciente tuberculoso puede relacionarse con los cambios de la respuesta inmune, las características de esta interrelación son poco conocidas. En razón de ello, se analizó la potencial influencia de alteraciones coexistentes con la tuberculosis (disnea, adelgazamiento, etilismo y enfermedad obstructiva crónica (EPOC) sobre la respuesta de células periféricas mononucleares estimuladas con M. tuberculosis sonicado (ST) y Concanavalina A (ConA) en términos de linfoproliferación (cultivo de 5 días) y niveles de citocinas en sobrenadantes (IFN-gamma, IL-10 y TGF-beta, 36 y 96 hs post-estímulo con ST). Se estudiaron 16 controles sanos y 31 pacientes activos sin tratar, similares en sexo y edad. Los pacientes presentaron una proliferación descendida ante ConA (22893.5 ± 4189.8, media ± es, cpm) y ST (7329.1 ± 1541); menores niveles de IFN-gamma (447.4 ± 178.5, pg/ml, 96 hs) y mayores valores de IL-10 (155.1 ± 21.5, 36 hs) y TGF-beta (612.7 ± 75.5, 36 hs),

respecto de los controles (ConA 60008.8 ± 11571, p< 0.001; ST 14799.2 ± 3882.8, p< 0.05; IFN-gamma 1669 ± 1057, ns; IL-10 71.3 ± 14.1, p< 0.015; TGF-beta 342.2 ± 108.1, p< 0.05). El análisis multivariado se efectuó en base al modelo lineal generalizado. La edad no alteró los hallazgos presentados. Las diferencias en la linfoproliferación ante la ConA persistieron independientemente del ajuste aplicado. El análisis ajustado para EPOC no modificó las diferencias en proliferación al ST y los niveles de TGF-beta e IL-10; como tampoco lo hizo etilismo y disnea sobre ambas citocinas. Sin embargo, las comparaciones perdieron significado estadístico tras el ajuste por pérdida de masa corporal -adelgazamiento-; el cual aparece como un factor a ponderar en la red de interacciones fisiopatológicas.

23. (447) GLUCURONOXILOMANANO DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS INDUCE APOPTOSIS DE MACRÓFAGOS MEDIADA POR ÓXIDO NÍTRICO. CHIAPELLO LAURA SILVINA, BARONETTI JOSÉ LUIS, MASIH DIANA T

CIBICI-CONICET; Fac. Ciencias Químicas. UNC

Glucuronoxilomanano (GXM) es el componente mayoritario de la cápsula del hongo levaduriforme Cryptococcus neoformans. Durante las infecciones este polisacárido es secretado por el hongo durante su replicación y es retenido en macrófagos tisulares. En un modelo de criptococosis diseminada en ratas, observamos macrófagos tisulares apoptóticos con GXM intracelular. El objetivo de este trabajo fue investigar si GXM induce apoptosis de macrófagos (MÆ) de rata in vitro y los mecanismos asociados a este fenómeno. El GXM se obtuvo por precipitación con etanol y CTAB a partir de un cultivo de levaduras. Ratas Wistar se inyectaron con tioglicolato al 4% y los macrófagos se purificaron de lavados peritoneales, utilizando un gradiente de percoll y adherencia. Las células obtenidas expresaban aproximadamente 95% de CD11 b/c, 85% de MCH II, 60% de ED2 y eran negativas para marcadores linfocitarios. Los MÆ se cultivaron (1 x 10⁶) durante 24 o 48 h con 50 o 200 mg de GXM. Luego de 48 h de cultivo se observó que 200 mg de GXM inducen un 30% de incremento en la hipodiploidía de MÆ (p < 0,00005 respecto a los controles; tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo). La apoptosis se confirmó con anexina V, reacción de TUNEL y retención mitocondrial de TMRE. Con el agregado de diferentes inhibidores a los cultivos se observó que aminoguanidina (AG, inhibidor de la iNOS) revertía totalmente la muerte celular inducida por GXM, demostrando la participación de óxido nítrico (NO) en este fenómeno. GXM inducía NO en macrófagos, de manera dosis dependiente (determinado por reacción de Griess) y 200 mg de este polímero causaban una fuerte expresión de iNOS (por Western blot) a las 24 h de cultivo (p < 0,000001, respecto a los controles). La inducción de NO por GXM fue dependiente de la fagocitosis y activación de proteínas quinasas C. Este es el primer reporte que muestra la capacidad de GXM para inducir óxido nítrico y su participación en la muerte celular de macrófagos.

ONCOLOGÍA I

24. (144) NUEVOS COMPUESTOS NUCLEOSÍDICOS ANTIRAC CON PROPIEDADES ANTIMIGRATORIAS Y ANTIMETASTÁSICAS EN UN MODELO DE CÁNCER MAMARIO. LORENZANO MENNA PABLO (1), ZINNI ALEJANDRA (2), IGLESIAS LUIS (2), IRIBARREN ADOLFO (2), ALONSO DANIEL F (1), GOMEZ DANIEL E (1)

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes (1); Laboratorio de Biotransformaciones, Universidad Nacional de Quilmes (2)

La familia de las Rho GTPasas tiene como miembros más estudiados a Rho, Rac y Cdc42. Se conoce que Rac1 interviene en la transformación maligna y en procesos de migración tumoral. Hemos demostrado que la disminución de los niveles de Rac activo (Rac-GTP), mediante la sobreexpresión de B2-querimerina,

reduce drásticamente la capacidad metastásica de un carcinoma mamario experimental. El objetivo de este trabajo fue examinar las propiedades antitumorales de nuevos compuestos nucleosídicos análogos de GTP, con potencial afinidad para interferir la unión de Rac a GTP. Se diseñaron y sintetizaron 8 compuestos derivados de guanosina o inosina (denominados N-1 a N-8). La acción inhibitoria de los compuestos se investigó sobre cultivos de células F3II de carcinoma mamario en crecimiento exponencial usando un método colorimétrico. El efecto antimigratorio se examinó con el ensayo de herida de monocapas tumorales confluentes y la activación de Rac se valoró mediante pull-down de Rac-GTP seguido de Western blot. La actividad antimetastásica experimental se estudió inoculando por vía endovenosa 200.000 células F3II en ratones singénicos Balb/c. Se encontraron valores de IC50 de 68, 56 y 73 μM para los compuestos N-1, N-4 y N-5, respectivamente, mientras que el resto de los compuestos no mostró efectos relevantes sobre las células F3II. Además, N-5 mostró un potente efecto antimigratorio en dosis no citotóxicas de 10 μM (Control: 400 ± 147 versus N-5: 196 ± 63 células/mm²; $p < 0.01$) y disminuyó de manera dosis-dependiente los niveles de activación de Rac-GTP. El tratamiento diario con 5 mg/kg de N-5 (i.p.) fue bien tolerado en ratones y redujo significativamente la formación de micrometástasis (nódulos < 2 mm) de F3II (Control: 15 ± 2 versus N-5: 9 ± 1 ; $p < 0.05$). Los resultados muestran las propiedades antitumorales de nuevos compuestos nucleosídicos anti-Rac en un modelo murino de carcinoma mamario, sugiriendo su potencial utilidad como agentes en oncología.

25. (145) EXPRESIÓN NUCLEAR DE HO1 EN CÁNCER DE PRÓSTATA. SACCA PAULA (1), MEISS ROBERTO (2), CASAS GABRIEL (3), CALVO JUAN CARLOS (1,4), MAZZA OSVALDO (5), NAVONE NORA (6), VAZQUEZ ELBA (4)

IBYME-CONICET (1); Academia Nacional de Medicina (2); Hospital Alemán (3); Dpto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (4); Hospital de Clínicas (5); Md Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA (6)

Numerosos factores están involucrados en el desarrollo del cáncer de próstata (PCa), entre ellos: edad, predisposición genética, factores ambientales, dieta, agentes infecciosos y exposición a andrógenos, los cuales inducen un desbalance del estado óxido-reductor del tejido. La hemo oxigenasa 1 (HO-1) es una enzima microsomal, que juega un rol fundamental como defensa anti-oxidante. La asociación entre la expresión de HO-1 y la malignidad son controvertidos. La translocación nuclear de HO-1 se asoció con la disminución de su actividad biológica, con su fosforilación o con la pérdida de su extremo C-terminal. En este estudio examinamos la localización celular de HO-1 por inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Se analizaron 89 muestras de pacientes con PCa (grado de Gleason: 4-9), 39 casos de hiperplasia benigna (BHP) y se utilizaron cultivos celulares de PC3 y LNCaP. Se encontró elevada marcación nuclear de HO1 en tumores 58/89 (65%), en comparación con el tejido peritumoral y BHP (31/87, 35% y 9/39 23%, respectivamente, $p < 0,05$). El riesgo relativo para la marcación nuclear fue de 1,8 tumor vs parénquima no tumoral y de 2.8 tumor vs BHP (Fisher's Test). En las líneas celulares, se indujo la expresión de HO-1 por tratamiento con el activador selectivo hemina, se aislaron las fracciones nucleares y citoplasmáticas y se determinó la expresión de HO-1 por análisis de Western Blot. Comprobamos un significativo aumento de la expresión nuclear de HO-1 en ambas líneas. Ensayos de inmunocitoquímica en células PC3 confirmaron estos resultados, detectándose expresión nuclear de HO-1 en aproximadamente el 10% de las células. Conclusión: Hemos demostrado por primera vez en un número importante de muestras de pacientes con PCa que HO-1 esta localizada en el núcleo. Si bien no se conoce aún el mecanismo de translocación de HO-1 al núcleo, la modulación de su expresión y localización podría ser un blanco para el desarrollo de nuevas terapias.

26. (181) OLIGOSACÁRIDOS DE ÁCIDO HIALURÓNICO (O-AH) MODULAN LA RESISTENCIA A MULTIDROGAS EN

CÉLULAS DERIVADAS DE UN LINFOMA T-MURINO. CORDO RUSSO ROSALÍA INÉS, ALANIZ LAURA, GARCIA MARIANA, ALVAREZ ELIDA, HAJOS SILVIA

Cátedra de Inmunología-IDEHU-FFyB-UBA-CONICET

MDR puede estar mediada por una bomba de eflujo de drogas (Pgp) o por alteraciones en la sobrevivencia y vías de señalización de apoptosis. CD44 es una molécula de adhesión que por interacción con AH modularía el crecimiento y metástasis a través de diferentes vías de señalización. La perturbación de estas señales mediante o-AH conferiría un doble rol terapéutico ya que inhibiría el crecimiento tumoral (por disminución de PI3K/Akt) y sensibilizaría a las células a agentes quimioterápicos. Se utilizaron líneas derivadas de un linfoma T murino, sensible (LBR-) o resistentes a doxorubicina (DOX) y vincristina (VCR) (LBR-D160 y LBR-V160) con el objetivo de determinar la capacidad apoptótica de o-AH (per sé y en combinación con DOX y VCR), estudiar las vías de señalización involucradas y evaluar la funcionalidad de Pgp. La apoptosis se analizó por tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio observándose con o-AH 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$ un aumento significativo en LBR-D160 ($13.76 \pm 1.58\%$ y $19.14 \pm 1.50\%$) y LBR-V160 ($14.00 \pm 1.59\%$ y $22.01 \pm 2.43\%$) en relación con LBR- ($4.69 \pm 0.68\%$ y $7.32 \pm 1.01\%$) ($P < 0.001$). Además por tratamiento con o-AH 150 $\mu\text{g/ml}$ + VCR 0.5 μM se evidenció un $29.82 \pm 0.65\%$ en LBR-V160, sin diferencias en otras combinaciones. Se evaluaron factores de sobrevivencia (p-Akt y Survivina) y Bcl-2 por western blot luego del tratamiento con o-AH 300 $\mu\text{g/ml}$. Se observó disminución de p-Akt en las tres líneas, disminución de Survivina sólo en LBR-D160 y LBR-V160; no se hallaron diferencias en Bcl-2. Se analizó la funcionalidad de la Pgp por citometría de flujo mediante acumulación de Daunorubicina, observándose con o-AH 300 $\mu\text{g/ml}$ un bloqueo de la funcionalidad en LBR-D160 y LBR-V160 similar al producido por Ciclosporina A. Se concluye que o-AH producirían un aumento de apoptosis en LBR-D160 y LBR-V160 que podría relacionarse con el bloqueo de Pgp y la disminución de p-Akt y Survivina.

27. (277) EFECTOS DE BISFOSFONATOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASAS DE TIROSINA Y LA MIGRACIÓN CELULAR EN UN MODELO DE OSTEOSARCOMA DE RATA. MOLINUEVO MARIA SILVINA (1), BRUZZONE LILINANA (2), CORTIZO ANA MARÍA (1)

Bioquímica Patológica, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata (1); Química Analítica, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata (2)

Los bifosfonatos, compuestos análogos del pirofosfato, son empleados para el tratamiento de enfermedades con alto recambio óseo, tales como la osteoporosis, enfermedad de Paget, etc. Si bien, se sabe que su principal acción antiresortiva ocurre a nivel de los osteoclastos, nuestro grupo y otros investigadores han demostrado que estos compuestos pueden regular la proliferación de células osteoblásticas y otro tipo de células del tejido conectivo. Nuestro grupo demostró que los bifosfonatos, en particular el alendronato, ejercen un efecto bifásico sobre la proliferación de células UMR106, estimulando la proliferación a dosis bajas e inhibiéndola a dosis más altas. En este estudio, hemos evaluado la acción de los bifosfonatos (por ej. alendronato) sobre la actividad de las fosfatasa de tirosina (PTPasas) y su relación con la migración celular (ensayo de crecimiento celular en tres dimensiones, esferoides), en un modelo de células de osteosarcoma UMR106. Encontramos que el Alendronato inhibió en forma dependiente de la dosis (10^{-6} - 10^{-4}M) sobre la actividad de PTPasas en un extracto celular (61% vs basal, 10^{-4}M). El alendronato agregado al medio de cultivo celular (10^{-6} - 10^{-4}M) inhibió la actividad específica de PTPasas neutras. Se observó una inhibición, dependiente de la dosis, en la migración celular (68% vs basal, Alendronato 10^{-4}M). Estos efectos fueron comparados con los efectos de compuestos de vanadio que específicamente inhiben fosfatasa de tirosina. En conclusión, el alendronato modula la actividad de PTPasas y la migración de células de un osteosarcoma de rata en cultivo.

28. (312) LA HIPOXIA IN VITRO INDUCE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO QUE FAVORECE EL CRECIMIENTO DE CELULAS MIOEPITELIALES MALIGNAS DERIVADAS DEL TUMOR MAMARIO MURINO M38. KRASNAPOLSKI MARTIN ALEJANDRO, BAL DE KIER JOFFÉ ELISA, EIJÁN ANA MARIA

Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"

La hipoxia, fenómeno común en los tumores, lleva al aumento del Factor Inducible por Hipoxia-1a (HIF-1a), un factor transcripcional que activa entre otros al gen de la Oxido Nitríco (NO) Sintasa Inducible (iNOS), enzima que produce abundante NO. In vitro, CoCl₂ (150uM) corta la cadena respiratoria y genera un estado llamado pseudohipoxia. A partir del adenocarcinoma mamario murino M38 formado por células lumbinales y mioepiteliales obtuvimos las líneas LM38-LP (mixta), LM38-HP (epitelioide) y LM38-D2 (mioepitelial). Las dos últimas presentan menor tasa de crecimiento y capacidad metastática que el tumor parental, mostrando la importancia de las interacciones poblacionales en su comportamiento. El objetivo fue estudiar si la hipoxia estimula la producción de NO via iNOS y si este puede alterar la viabilidad de las células del tumor M38. Estimamos NO por Griess y viabilidad por MTS. Evaluamos los niveles de iNOS y HIF-1a por western blot. Los datos expresados como media \pm DS son representativos de 3 experimentos. Test estadístico ANOVA/Bonferroni. En pseudohipoxia, LM38-LP y LM38-HP incrementaron significativamente ($p < 0.05$) el NO (de 153 \pm 64 a 337 \pm 67 y de 138 \pm 99 a 273 \pm 60 nmol/106 células resp.), esto fue inhibido por 1400W (inhibidor específico de iNOS). NO fue indetectable en hipoxia y normoxia en LM38-D2. En LM38-LP y LM38-HP aumentó HIF-1a a los 30min de tratamiento con CoCl₂ mientras que iNOS lo hizo a las 3h. En LM38-D2 estas moléculas resultaron indetectables. Para evaluar la función del NO tratamos las células con DETA/NONOato, un dador de NO, por 24h. A 125 μ M no mostró actividad, mientras que a 500 μ M estimulo un 30% el crecimiento de LM38-D2 sin afectar a las otras. Estos resultados sugieren que en condiciones de hipoxia, la producción de NO por el componente luminal (a través de la vía HIF-1a - iNOS) podría estar estimulando la proliferación de las células mioepiteliales, facilitando el crecimiento de M38.

29. (360) MODULACION Y SIGNIFICADO FUNCIONAL DE HEMO-OXIGENASA 1 EN CANCER DE PROSTATA. GUERON GERALDINE (1,2), ARANDA FEDERICO (1), TURNER ANTHONY J (2), WOOD EDWARD J (2), DE SIERVI ADRIANA (1), VAZQUEZ ELBA (1)

Depto Química Biológica, FCEN, UBA-CONICET (1); Institute of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds (2)

El cáncer de próstata (PCa) es uno de los tumores más frecuentes en el hombre. Aunque la progresión del PCa se caracteriza por el fenotipo de resistencia a andrógenos, no se conocen los eventos genéticos que ocurren durante dicha transformación. HO1, la isoforma inducible de la hemo oxigenasa, podría contrarrestar el daño inflamatorio a través de la prevención del estrés oxidativo o vía la inmunomodulación local de las células inflamatorias infiltrantes. Dado el rol fundamental que ejerce la inflamación en la progresión tumoral, la modulación de la expresión de HO1 podría ser crítica en la carcinogénesis prostática. Analizamos la expresión de esta proteína por WB en tres líneas de PCa: PC-3, LNCaP y MDAPCa2b, encontrando diferencias en la expresión basal de dicha enzima. Bajo condiciones inflamatorias inducidas por tratamiento con LPS (1 μ g/ml) se observó que la expresión de HO1 era tiempo y dosis dependiente en cultivos de PC3 y MDAPCa2b, obteniéndose máxima inducción para PC3. El tratamiento con hemina (70 μ M), un potente inductor de HO1, produjo un aumento de la proteína en PC3 y MDAPCa2b. El análisis de la apoptosis por anexinaV-FITC mostró un aumento significativo en ambas líneas en presencia de LPS pero solo en PC3 la apoptosis se incrementó por tratamiento con LPS+hemina. El análisis de la progresión del ciclo celular por FACS mostró respuestas diferenciales para PC3 y MDAPCa2b, dirigiendo al arresto

en Go/G1 para PC3 por tratamiento con hemina y LPS+hemina y al arresto en Go/G1 para MDAPCa2b bajo LPS, hemina y LPS+SnPP (inhibidor selectivo de HO1). Estos resultados demuestran que las distintas líneas celulares de PCa tienen un nivel diferente de expresión de HO-1 y que es factible modular farmacológicamente dicha proteína. Esta modulación bajo condiciones inflamatorias se correlaciona con la alteración de la regulación del ciclo celular y puede estar implicada en el arresto de estas líneas metastáticas.

30. (403) EFECTO DE LA FORMA TRANS DEL ACIDO RETINOICO (ATRA) SOBRE LA DIFERENCIACIÓN, CRECIMIENTO E INVASIÓN DE LAS LÍNEAS MAMARIAS MURINAS LM38. (FIRCA R03 TW007207). TODARO LAURA BEATRIZ (1), VELOSO MARÍA JOSÉ (1), FARIAS EDUARDO (2), PURICELLI LYDIA (1), MIRA Y LÓPEZ RAFAEL (2), BAL DE KIER JOFFÉ ELISA (1)

Area de Investigación del Instituto de Oncología Angel H. Roffo (1) Escuela de Medicina Mont Sinai, USA (2)

El ATRA regula crecimiento, diferenciación y apoptosis en distintos tipos celulares. Previamente demostramos que el tratamiento con ATRA inhibe el crecimiento en monocapa de las líneas de mama LM38-HP (constituida por células epitelioideas), LM38-D2 (clon mioepitelial) y LM38-LP (con ambos tipos celulares). Ahora evaluamos el efecto de ATRA sobre la diferenciación, supervivencia e invasión de células LM38 en cultivos tridimensionales. Para ello, las células cultivadas durante 3 d en matrigel se trataron o no con 1uM ATRA por 2 días adicionales. Luego las colonias se marcaron con diferentes anticuerpos y se evaluaron por microscopía confocal. LM38-LP generó colonias redondeadas acinadas y polarizadas (marcación con GM130). ATRA mantuvo la polaridad e indujo una mayor expresión y reorganización de E-caderina. Además ATRA indujo una disminución de células mioepiteliales, indicado por la menor expresión del marcador de mioepitelio CK14, en la periferia de las colonias. El tratamiento con ATRA incrementó también la expresión de Caspasa 3 activada y la translocación nuclear de p27 en el centro de la colonia, sugiriendo arresto del ciclo celular e inducción de muerte. Por otra parte, LM38-HP generó colonias estrelladas sin lumen, de tamaño variable, con células no polarizadas en las que ATRA indujo un aumento de Caspasa 3. LM38-D2 organizó colonias de tamaño y forma variable, las cuales tratadas con ATRA presentaron una disminución en la expresión de CK14, incremento de Caspasa 3 y translocación nuclear de p27. ATRA disminuyó la invasión en matrigel (cámaras transwell) de todas las líneas celulares, siendo su efecto más pronunciado en LM38-LP (64% menos que C, $p < 0,05$). En síntesis el cultivo tridimensional resultó de utilidad para estudiar algunos mecanismos implicados en la acción de ATRA. Nuestros resultados sugieren que la interacción entre células lumbinales y mioepiteliales es necesaria para acentuar el efecto del ATRA sobre la diferenciación, muerte e invasión celular

31. (581) ESTUDIO DE GALECTINA-1 COMO NUEVO FACTOR PRO-ANGIOGÉNICO: MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES INVOLUCRADOS. CROCI DIEGO O., SALATINO MARIANA, RUBINSTEIN NATALIA, TOSCANO MARTA ALICIA, ILARREGUI JUAN MARTÍN, BIANCO GERMÁN ARIEL, CAMPAGNA LEONARDO, RABINOVICH GABRIEL ADRIÁN

Laboratorio de Inmunogenética, Htal. de Clínicas, Facultad de Medicina UBA. DOC y MS, contribuyeron equitativamente.

La angiogénesis es un proceso crucial para el crecimiento y progresión de tumores sólidos. Previamente demostramos que galectina-1 (Gal-1), una proteína involucrada en la inmunomodulación de tumores posee efectos moduladores de la vasculogénesis en un modelo acelular. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de Gal-1 como modulador de la angiogénesis e investigar los mecanismos celulares involucrados en dicho efecto. El

tratamiento de células endoteliales (HUVEC) con Gal-1 promovió la tubulogénesis in vitro, efecto que fue revertido por el agregado de un Ac anti gal-1 y por inhibidores de las vías de señalización de ERK1/2 y PI-3K/AKT. Para evaluar el efecto pro-angiogénico de gal-1 in vivo se inocularon ratones nude con células de sarcoma de Kaposi tranfectadas con el antisentido de gal-1 (KS/As) y control (KS/wt). Las tinciones con HyE revelaron una reducción en el número de vasos sanguíneos en tumores KS/As respecto a los KS/wt ($p < 0.001$). La detección por IHQ mostró que en zonas hipóxicas tumorales la expresión de Gal-1 fue más intensa, y a su vez la falta de O₂ indujo in vitro un aumento en la expresión de Gal-1 en células KS/wt. El agregado exógeno de bajas concentraciones de rGal-1 a cultivos de HUVEC indujo un marcado incremento en la fosforilación de ERK1/2 a los 30 minutos ($i = 4$) y AKT a los 15 minutos ($i = 2.1$). También se observó un aumento dosis dependiente en la proliferación de estas células ($p < 0.05$), efectos que fueron suprimidos cuando las células se pre-trataron con lactosa 30 mM ($p < 0.05$) y con los inhibidores de PI3K (Ly294002 2 μ M) ($p < 0.05$), ERK1/2 (U0126 5 μ M) ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la expresión de Gal-1 inducida por hipoxia promueve la angiogénesis, al aumentar la proliferación y la morfogénesis de células endoteliales, efecto mediado por la activación de las vías de señalización ERK1/2 y PI-3K/AKT.

REPRODUCCIÓN I

32. (224) EFECTO DIRECTO DE UN AGONISTA DE GNRH-I SOBRE LA EXPRESION DE PROTEINAS ESTEROIDOGÉNICAS EN FOLICULOS OVARIOS DE RATAS ESTIMULADAS CON GONADOTROFINAS. IRUSTA GRISELDA, PARBORELL FERNANDA, MARTA TESONE

Instituto de Biología y Medicina Experimental

En los últimos años han surgido numerosos trabajos postulando a GnRH como un factor intraovárico. GnRH-I posee efectos antagonotróficos y en nuestro laboratorio, hemos demostrado que el tratamiento con un análogo de GnRH-I (Acetato de Leuprolide, LA) interfiere con el reclutamiento folicular inducido por gonadotropinas. El objetivo del trabajo fue estudiar la acción directa de LA sobre la esteroidogénesis ovárica. Se realizaron experimentos in vitro para los cuales se inyectaron ratas prepúberes (23-25 días) con eCG (Gonadotropina Coriónica equina) y fueron sacrificadas a las 48 hs. Se aislaron foliculos antrales por microdissección y se incubaron durante distintos intervalos de tiempo en presencia de FSH (20ng/ml) o FSH+LA (100 ng/ml). Se procedió a la extracción de esteroides y proteínas para la medición de androsterona y la realización de western blot, respectivamente, de las enzimas P450scc, StAR y CYP17. La incubación con FSH+ LA produjo una disminución significativa ($P < 0.05$) en el contenido folicular de androsterona comparado a los foliculos incubados solo con FSH a las 24 hs de incubación. Los niveles de StAR aumentaron significativamente en foliculos co-incubados durante 12 hs con FSH+LA (FSH: 0.23 ± 0.09 ; FSH+LA: 1.67 ± 0.15 ; $p < 0.05$). Sin embargo, no se detectaron cambios en la expresión de P450scc. Además, la incubación con FSH+LA inhibió significativamente la expresión de la enzima P450C17 a las 12 hs de incubación en comparación con los foliculos incubados con FSH (FSH: 0.51 ± 0.04 ; FSH+LA: 0.16 ± 0.03 ; $p < 0.05$). Concluimos que GnRH-I ejerce su acción inhibitoria sobre el desarrollo folicular inducido por gonadotropinas a través de una disminución de la enzima CYP17 y en consecuencia de la producción de andrógenos, sustratos necesarios para la síntesis de estrógenos durante el desarrollo folicular.

33. (260) REGULACION DE LA ANGIOGENESIS Y LA APTOSIS OVARICA POR ANÁLOGOS DE GNRH. RODRIGUEZ CELIN ALEJANDRA JIMENA, TESONE MARTA, FERNANDA PARBORELL

IBYME-CONICET

En estudios previos se observó un aumento en la apoptosis y en la expresión de caspasa-3 en foliculos ováricos provenientes de ratas inmaduras superovuladas tratadas con un agonista de GnRH. Para dilucidar si estos cambios se correlacionaban con una disminución en la vascularidad de los foliculos, llevando a éstos a la atresia, se evaluó el efecto de los análogos de GnRH sobre la expresión ovárica de dos factores proangiogénicos: VEGF-A y ANGT-1 en el modelo mencionado anteriormente y se evaluó la actividad de 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 μ g/rat/día, grupo LA) y/o GnRH-ant (antagonista, Antide, 10 μ g/rat/día; grupo LA+Ant o grupo Ant). Por western blot se observó que en el grupo LA se produjo una disminución significativa (unidades arbitrarias) en los niveles proteicos de VEGF-A y ANPT-1 comparado al grupo control (VEGF-A C: 241.81 ± 17.26 , LA: 149.8 ± 10.13 ; ANPT-1 C: 466.1 ± 33.9 , LA: 235.9 ± 48.8 ; $p < 0.05$). La co-inyección del Antide interfirió con el efecto de LA (VEGF-A LA: 149.8 ± 10.13 , LA+Ant: 200 ± 6.5 ; ANPT-1 LA: 235.9 ± 48.8 , LA+Ant: 499 ± 37 ; $p < 0.05$). En todos los grupos, las células de granulosa (CG) y tecales (CT) de foliculos preantrales (FP) exhiben una ausente o moderada señal para ANGT-1. En el grupo LA, las CG y CT de foliculos antrales (FA) mostraron leve inmunoreactividad para ANGT-1 comparado a los grupos restantes, teniendo éstos, una intensa señal para esta proteína. En el grupo LA, se observó un aumento significativo en la actividad de caspasa-3 comparado al grupo control ($p < 0.05$). La co-inyección del Antide interfirió con el efecto de LA sobre la actividad de ésta. Conclusión: Los resultados sugieren una posible disminución de aporte sanguíneo a los foliculos, conduciéndolos a la atresia; o una posible falta del efecto citoprotector directo de estos factores sobre las células foliculares.

34. (291) CATIONES DIVALENTES E HIPERPOLARIZACION DE ESPERMATOZOIDES. BACHMANN SANDRA, MIRANDA PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

La reacción acrosomal (RA) es un evento excitotóxico necesario para la fertilización y depende de la presencia de Ca en el medio. El espermatozoide debe hiperpolarizarse durante la capacitación para activar los canales de Ca que se abrirán por la depolarización inducida por el ligando de la zona pelúcida (ZP). Estudios previos de nuestro laboratorio indican que el Sr puede reemplazar al Ca en varios eventos funcionales del espermatozoide pero no en la RA espontánea o inducida por ZP. Luego de observar que la diferencia estaría a nivel de la membrana plasmática, quisimos analizar su origen. Espermatozoides de hamster fueron purificados e incubados en medio TALP común o modificado (en el cual el Ca fue reemplazado por Sr) suplementado con 3 mg/ml de BSA. En algunos casos, una vez completado el período de capacitación (3 hs de incubación), las células fueron resuspendidas en medio sin NaCl y depolarizadas por agregado de 60 mM KCl. La RA fue medida por microscopía óptica 30 minutos después del tratamiento o a tiempo final (6 hs de incubación). La depolarización de espermatozoides capacitados indujo la RA a valores similares en presencia de cualquiera de los dos iones (de 49 ± 3 a $79 \pm 1\%$ en medio con Ca, $p < 0.001$ y de 15 ± 2 a $70 \pm 2\%$ en Sr, $p < 0.001$). Por otro lado, la sola resuspensión de los espermatozoides capacitados en Sr en un medio sin NaCl produjo un aumento en la RA (54 ± 2 , $p < 0.001$ vs $15 \pm 2\%$), sugiriendo que el Na podría estar relacionado con la incapacidad del Sr de sostener la excitación. El agregado de un inhibidor de la bomba de Na (amiloride, AM, 1 μ M) a espermatozoides incubados en Sr, elevó la RA espontánea a niveles similares a los observados en Ca (72 ± 4 vs $78 \pm 4\%$ para Sr+AM y Ca, $p < 0.001$ vs. $16 \pm 2\%$ para Sr, a las 6 hs). Estos resultados sugieren que los espermatozoides incubados en Sr no estarían hiperpolarizados y revelan que el Ca está involucrado en la regulación del potencial de membrana de los espermatozoides.

35. (317) N-ACETILGLUCOSAMINA Y VÍA GLICOLÍTICA EN LA REACCIÓN ACROSOMAL. AINCIBURU SANTIAGO, ZITTA KARINA, MIRANDA PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

La reacción acrosomal (RA) es un evento excitotóxico que ocurre en el espermatozoide y es indispensable para la fertilización. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la N-acetilglucosamina (GlcNAc) inhibe la RA en espermatozoides de hamster. Dado que la GlcNAc es un inhibidor de la hexoquinasa, primer enzima del camino glicolítico, analizamos la participación de esta vía en la RA y su relación con el efecto de la GlcNAc. Espermatozoides de hamster fueron purificados e incubados en medio TALP suplementado con 3 mg/ml de BSA para su capacitación. La RA fue medida por microscopía óptica 30 minutos después del tratamiento o a tiempo final (6 hs de incubación). El tratamiento de los espermatozoides capacitados con bloqueantes de la vía glicolítica (2-deoxiglucosa, 2DG, o 3-metilglucósido, 3MG, 5 mM) disminuyó el porcentaje de espermatozoides reaccionados (37 ± 10 y $27\pm 6\%$ para 2DG y 3MG respectivamente, $p < 0.05$ vs control = $73\pm 7\%$). Para determinar si la GlcNAc afectaba la vía glicolítica, se trazaron curvas de inhibición para 2DG y GlcNAc y se analizó el efecto de dosis sub-óptimas de ambos compuestos juntos y separados. La RA fue significativamente menor en presencia de los dos agentes ($43\pm 3\%$ para GlcNAc+2DG, $p < 0.05$ vs 58 ± 3 y $62\pm 9\%$ para GlcNAc y 2DG respectivamente, control = $83\pm 4\%$). Por otro lado, la RA inducida con ionóforo de Ca (A_{23187} , 1 μM) fue inhibida por GlcNAc (43 ± 15 vs. $87\pm 4\%$ con y sin GlcNAc, respectivamente, $p < 0.05$). Lo mismo ocurrió al inducir con un agonista de IP3 (Timerosal, 3 μM) en presencia de GlcNAc o 2DG (44 ± 4 y $50\pm 3\%$ respectivamente, $p < 0.05$ vs. $67\pm 4\%$). Estos resultados indican que la inhibición de la RA por GlcNAc no está relacionada con la vía glicolítica, aunque el funcionamiento de la misma es fundamental para la ocurrencia de la RA. Tanto el efecto de la GlcNAc como la participación de la glicólisis en la RA serían posteriores a la entrada masiva de Ca al espermatozoide.

36. (319) MODULACION POR PROSTASOMAS DE LA FOSFORILACION EN TIROSINA DURANTE LA CAPACITACION ESPERMATICA. PIEHL LIDIA (1), FISCHMAN MARIA LAURA (2), CISALE HUMBERTO (2), MIRANDA PATRICIA (3)

Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (1); Área Física Biológica, Facultad de Veterinaria, UBA (2); Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET(3)

Los espermatozoides de mamífero deben residir un tiempo en el tracto femenino, o ser incubados en condiciones especiales, antes de poder fertilizar a un ovocito. En este tiempo, completan un proceso denominado capacitación que, entre otras cosas, incluye una disminución del colesterol de membrana y un aumento de la fosforilación en tirosina. Los prostasomas son vesículas que se encuentran en plasma seminal y han sido involucrados tanto en la estabilización como en la activación de los espermatozoides. En el presente trabajo analizamos si los prostasomas estaban relacionados con los cambios de fosforilación en tirosina que ocurren durante la capacitación. Los prostasomas se aislaron de semen de cerdo por ultracentrifugación y filtración molecular. Los espermatozoides fueron incubados en medio Tyrode conteniendo 3 mg/ml de BSA en presencia o ausencia de prostasomas. Luego de 3 hs de incubación a $39^{\circ}C$ y con $5\%CO_2$, se obtuvo un extracto total de espermatozoides por tratamiento con 1% SDS y la fosforilación en tirosina fue analizada por inmunoblot con un anticuerpo monoclonal específico. Los espermatozoides sin tratamiento mostraron un set de bandas fosforiladas en tirosina que no sufrieron modificaciones (30-85 kD). Por otro lado, la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes produjo un aumento en la fosforilación en tirosina de diversos polipéptidos (18-230 kD) y también la defosforilación de una banda de bajo peso molecular (< 10 kD). La presencia de prostasomas du-

rante la incubación de los espermatozoides anuló los cambios de fosforilación en tirosina asociados con la capacitación. Estos resultados sugieren que los prostasomas interfieren con los procesos de fosforilación/defosforilación de residuos tirosina que acompañan a la capacitación.

37. (331) INTERACCION DE GALECTINA-1 CON LA GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA Y GLICOPROTEINAS DE MEMBRANA DE LA LINEA TUMORAL DE LEYDIG MA-10. BIRON VERONICA ANDREA, BESIO-MORENO MARCOS, LUCILA YOSHIZAKI, MARIA FERNANDA TRONCOSO, OMAR PEDRO PIGNATARO, CARLOTA WOLFENSTEIN-TODEL

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Lab. de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, IBYME-CONICET; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

En trabajos previos demostramos la expresión de galectina-1 (Gal-1), proteína con afinidad por β -galactósidos, en la línea tumoral de Leydig MA-10 (cLMA-10), el efecto bifásico de la Gal-1 exógena sobre el crecimiento y muerte celular, la promoción de la adhesión e inhibición de la capacidad esteroideogénica de estas células. El objetivo de este trabajo fue identificar los ligandos de Gal-1 que podrían estar involucrados en los efectos de la lectina observados previamente. Se determinó mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo la presencia de sitios de unión para Gal-1 en la membrana de las cLMA-10 (IFM: Control: 2.32 ± 0.43 vs anti-Gal-1: 12.11 ± 0.36 , $p < 0.001$). Se aisló la fracción de membrana y las proteínas solubilizadas se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna de agarosa-Gal-1, eluyéndose específicamente los ligandos de Gal-1 con lactosa. El análisis de las proteínas eluidas por SDS-PAGE determinó la presencia de ligandos entre 40-120 kDa. Las distintas bandas fueron sometidas a digestión in gel con tripsina e identificadas mediante HPLC-MS. El análisis de los péptidos obtenido, en comparación con bases de datos, sugiere la presencia de las glicoproteínas de membrana CD107b (LAMP-2), CD98 (SLC3A2, antígeno 4F2) y CD147 (EMMPRIN, basigin). Por otro lado, se evaluó la interacción de Gal-1 con la hormona glicoproteica hCG, observándose la formación de complejos insolubles. Como conclusión, se pudieron identificar ligandos de Gal-1 presentes en la membrana plasmática o entorno celular de las cLMA-10 pudiendo las interacciones de la Gal-1 con estos ligandos estar involucradas en el efecto regulatorio de la lectina sobre esta línea celular.

38. (345) PARTICIPACION DE LA CASPASA 3 EN LA APOPTOSIS DE FOLICULOS OVARIOS INDUCIDA POR UN INHIBIDOR DE VEGF (TRAP). ABRAMOVICH DALHIA, PARBORELL FERNANDA, TESONE MARTA

IBYME-CONICET

VEGF es uno de los principales reguladores involucrados en la angiogénesis ovárica, expresándose junto con su receptor (Flk1) en células de granulosa y tecales. En estudios previos mostramos que la administración de un inhibidor de VEGF intrabursa en ovario de rata produce un aumento en la apoptosis de células foliculares, provocando una disminución en el número de folículos periovulatorios y un aumento en el número de folículos atróficos. Además, se observó una disminución de la relación BCL2/BAX y BCLXL/BCLXs. Para dilucidar si estos cambios tienen un efecto sobre la cascada de caspasas, se evaluaron los niveles y localización de la principal efectora: caspasa 3 y de PARP, sustrato de la caspasa 3 e inhibidor de la DNAsa I. Ratas prepúberes tratadas con eCG fueron inyectadas con un inhibidor de VEGF (Trap: quimera Flt-1/Fc recombinante, 0.5 μg) en un ovario y el contralateral fue inyectado con vehículo (C). Los ovarios fueron extraídos a las 48 hs. Folículos preovulatorios (> 400 μm) aislados por microdissección se utilizaron para Western blots y para medir la fragmentación de ADN (ladder) en geles de agarosa. El

grupo Trap mostró un aumento en la fragmentación apoptótica de ADN respecto al grupo C (C: 297.0 ± 4.7 ; Trap: 429.3 ± 36.6 , $p < 0.05$), mayores niveles del fragmento p17 activo de caspasa 3 (C: 0.18 ± 0.04 ; Trap: 0.33 ± 0.08 , $p < 0.05$) y una disminución en la proteína PARP no procesada (C: 0.33 ± 0.04 ; Trap: 0.15 ± 0.03 , $p < 0.01$) (datos expresados en unidades arbitrarias en todos los casos). En cortes de ovario se realizó una inmunohistoquímica (IHC) de caspasa 3 donde se observó una mayor inmunoreactividad en células tecales del grupo Trap respecto al grupo C. Conclusión: Estos resultados sugieren que la apoptosis provocada por el bloqueo de VEGF está en parte mediada por el desbalance de proteínas apoptóticas de la vía mitocondrial y por la activación de caspasa 3 lo que lleva a un aumento de la degradación en nucleosomas del ADN.

39. (512) EXPRESION DE LAS ISOFORMAS DE LA OXIDO NITRICO SINTASA EN EL TESTICULO DE RATAS CON ORQUITIS AUTOINMUNE. JARAZO DIETRICH SABRINA, RIVAL CLAUDIA, JACOBO PATRICIA, LUSTIG LIVIA, THEAS MARIA SUSANA

Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA

La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un modelo de inflamación testicular caracterizado por apoptosis y descamación de las células germinales y por un infiltrado de linfocitos y macrófagos (M) que alteran el ambiente inmunosupresor del testículo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de las isoformas neuronal (n), inducible (i) y endotelial (e) de la óxido nítrico sintasa (ONS) en el testículo y determinar su actividad en los M testiculares. La OAE fue inducida en ratas por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo E), las ratas del grupo control (C) fueron inyectadas sólo con adyuvantes. Los animales fueron sacrificados a los 30, 50 (inicio de la lesión) y 80 días (d) de la primera inmunización. Por inmunohistoquímica en cortes de testículo de ratas C observamos expresión de la ONSi en espermátides elongadas y células germinales en degeneración, de la ONSe en células de Sertoli, mientras que no observamos expresión de la ONSn. En los testículos de ratas con OAE observamos expresión de las 3 isoformas en las células germinales en degeneración y en las peritubulares. Por inmunofluorescencia de doble marcación en M testiculares aislados de ratas con OAE detectamos un aumento de la expresión de las 3 isoformas de la ONS respecto de los C. La actividad de la ONS, evaluada de manera indirecta mediante la determinación del contenido de ON (método colorimétrico) en el medio condicionado de M testiculares fue mayor en el grupo E respecto del C a los 50 d de la primera inmunización (30d: C: 2.35 ± 0.64 uM/50000 M, E: 3.12 ± 1.11 ; 50-60d: C: 1.29 ± 0.34 , E: $5.05 \pm 1.26^{***}$; 70-80d: C: 1.50 ± 0.43 , E: 1.53 ± 0.27 ; $p < 0.001$). Este trabajo muestra una regulación diferencial de la expresión de las isoformas de la ONS y un aumento de la producción de ON por los M testiculares en la OAE, sugiriendo que el ON generado en el testículo podría contribuir a la muerte por apoptosis de las células germinales durante el desarrollo de la orquitis.

40. (608) VIAS DE SEÑALIZACION ASOCIADAS A LA REGULACION POR BICARBONATO DEL PROCESO DE CAPACITACION DE ESPERMATOZOIDES DE RATA. DA ROS VANINA (1), COHEN DEBORA J. (1), PIGNATARO OMAR (1), VISCONTI PABLO (2), CUASNICU PATRICIA S. (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET) (1); Departamento de Veterinaria y Ciencia Animal, Univ. de Massachussets, USA (2)

Resultados previos de nuestro grupo mostraron que el bicarbonato (B) es requerido para la capacitación de espermatozoides de rata regulando la fosforilación en tirosina, la migración de la proteína DE al segmento ecuatorial y la capacidad de fusión del espermatozoide. Sin embargo, mientras la fosforilación ocurre incluso cuando el B es reemplazado por un análogo del cAMP, los otros 2 parámetros requerirían propiedades adicionales del ión.

Para estudiar la vía de transducción involucrada en la regulación de la capacitación mediada por B, se midieron los niveles intracelulares de cAMP por RIA en espermatozoides incubados en presencia o ausencia del anión. Se observó un aumento en el tiempo en los niveles de cAMP con un pico a 30 min, sólo en espermatozoides incubados en presencia de B. Para investigar si la acumulación de cAMP era inducida por ésteres de forbol, los espermatozoides fueron incubados con $10 \mu\text{M}$ PMA en presencia o ausencia de B. Los resultados indican que los espermatozoides incubados 30 min con B y PMA mostraron un aumento significativo en el contenido de cAMP no observado en ausencia de PMA. Esta acumulación de cAMP inducida por PMA fue dependiente de B. Para evaluar si el cAMP producido era requerido para los tres parámetros de capacitación analizados, se estudió la relevancia de PKA mediante la utilización del inhibidor H89. La fosforilación en tirosina, analizada por Western blot e inmunofluorescencia indirecta, fue significativamente reducida en presencia de $30 \mu\text{M}$ H89. Sin embargo, la migración de DE no se vio afectada y la capacidad de fusión sólo fue parcialmente inhibida por H89, incluso en presencia del inhibidor durante la co-incubación de gametas. En conjunto, los resultados obtenidos proveen mayor información sobre la regulación de la capacitación de espermatozoides de rata por bicarbonato y confirman que algunos eventos asociados a la capacitación y dependientes del anión serían independientes de la vía de cAMP/PKA.

41. (625) MECANISMO DE PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA TESTICULAR TPX-1 EN EL PROCESO DE FUSIÓN DE GAMETAS. BUSO DOLORES (1), GOLDWEIC NADIA (1), VALCARCEL ALBERTO (2), COHEN DEBORA J. (1), CUASNICU PATRICIA S. (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires (1) Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER), Buenos Aires, Argentina (2)

La proteína epididimaria DE y la proteína testicular Tpx-1 son miembros altamente homólogos de la familia CRISP (proteínas secretorias ricas en cisteínas). DE participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios en el ovocito. Diversas evidencias sugieren que Tpx-1 también participaría en fusión en roedores y humano. Con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en la participación de Tpx-1 en fusión, en primer lugar analizamos la existencia de sitios de unión para Tpx-1 en el ovocito humano. Para ello, ovocitos humanos descartados de programas de fertilización asistida, fueron liberados de su zona pellúcida (ZP) e incubados con Tpx-1 recombinante acoplada a MBP (maltose binding protein), y sometidos a inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anti-MBP como primer anticuerpo. Tpx-1 fue capaz de unirse a toda la superficie del ovocito como fuera descrito para la proteína humana homóloga a DE. En roedores, Tpx-1 también se une a la superficie del ovocito con el mismo patrón que lo hace DE. Recientes resultados indican que DE se uniría al ovocito a través de una región de 12 aminoácidos muy conservada en la familia CRISP, denominada Signature 2 (S2). Dado que la región S2 en Tpx-1 presenta sólo 2 sustituciones comparada con DE, evaluamos si ambas proteínas interactúan con el mismo sitio. Para ello, ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados con una concentración fija de una de las dos proteínas, y concentraciones crecientes de la otra, detectándose la unión de cada una por IFI. El hecho de que DE y TPX-1 fueran capaces de desplazarse mutuamente de la superficie del ovocito, indica que ambas proteínas compartirían los sitios de unión. Estos resultados confirman que, al igual que DE, Tpx-1 participaría en el proceso de fusión en roedores y humano, a través de sitios de unión en el ovocito, sugiriendo además, la existencia de un mecanismo de cooperación entre moléculas homólogas para garantizar el éxito de la fertilización.

42. (629) PARTICIPACIÓN DE LOS EPIDIDIMOSOMAS EN EL MECANISMO DE ASOCIACIÓN DE DE AL ESPERMATOZOIDE. MALDERA JULIETA A. (1), FORNES MIGUEL W. (2), CUASNICU PATRICIA S. (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Buenos Aires, Argentina (1); Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Mendoza, Argentina (2)

La proteína epididimaria de rata DE se asocia al espermatozoide durante la maduración existiendo una población débilmente unida que se libera durante la capacitación, y otra fuertemente unida que participa en la fusión de gametas. Mientras que la primera población se encuentra asociada por interacciones electro-estáticas, se desconoce el mecanismo de unión de la DE fuertemente unida. Recientes evidencias indican que la transferencia de proteínas integrales al espermatozoide estaría mediada por vesículas membranosas del fluido epididimario denominadas epididimosomas, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación de los mismos en la asociación fuerte de DE al espermatozoide. Para ello, fluidos epididimarios recuperados por perfusión desde el vaso deferente fueron sometidos a ultracentrifugación, confirmándose la obtención de las vesículas por microscopía electrónica. La posible contaminación de la preparación con espermatozoides fue descartada por estudios de Western blot (Wb) con anti-tubulina como marcador celular. Posteriores ensayos de Wb con un anticuerpo específico contra DE confirmaron la presencia de la proteína en las vesículas. La unión de DE a las mismas se estudió por extracción de proteínas con diferentes tratamientos y posterior análisis por Wb, utilizando espermatozoides como control. Al igual que la población fuertemente unida a los espermatozoides, DE no fue removida de las vesículas por PBS, 2M NaCl o 5U/ml PLC-PI (fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol), siendo totalmente extraída por 1% Tritón X-100. En conjunto, estos resultados demuestran la existencia de una población de DE fuertemente unida a los epididimosomas, apoyando la participación de los mismos en el mecanismo por el cual DE se asocia fuertemente al espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo.

43. (641) EXPRESIÓN DE CONEXINA 43 (CX-43) Y OCLUDINA EN EL TESTÍCULO DE RATAS PREPÚBERES EXPUESTAS AL TÓXICO TESTICULAR, MONO (2-ETILHEXIL) FTALATO (MEHP). SOBARZO CRISTIAN MARCELO, LUSTIG LIVIA, DENDUCHIS BERTA

Centro de Investigaciones en Reproducción. Fac. Medicina UBA

Se ha descrito que el metabolito del di-2-etilhexil ftalato (DEHP), el MEHP, es un tóxico que induce alteraciones en la función testicular. El objetivo de este trabajo fue estudiar las variaciones en la expresión de las proteínas Cx-43 y ocludina asociadas a las uniones intercelulares de tipo nexos y estrechas, respectivamente, en el testículo de ratas prepúberes tratadas con MEHP. Se intoxicaron ratas Sprague Dawley de 26 días de edad, con una única dosis de MEHP (1 g/kg de peso corporal) (E), vía "gavage". Como controles se utilizaron ratas a las que se les administró aceite usado como vehículo (C). Ambos grupos fueron sacrificados 24 hr. post-tratamiento. En el grupo E se observó un daño generalizado en el epitelio seminífero, que se caracterizó por una extensa descamación de las células germinales más maduras que permanecen en la luz del túbulo. Por inmunofluorescencia (IF) se localizaron las proteínas Cx-43 y ocludina principalmente en el compartimiento (CT) basal del túbulo seminífero en los animales C y E. En los animales C y E el patrón de IF para ocludina fue lineal y continuo. En las ratas C el patrón de IF de Cx-43 fue continuo en el CT basal y discontinuo en el CT ad-luminal. Sin embargo, la expresión de Cx-43 en el grupo E sólo se observó en el CT basal, con una IF de menor intensidad con respecto al grupo C. Por Western blot (Wb) se detectaron bandas de 43 kDa para Cx-43 y de 65 kDa para ocludina en ratas C y E. Se observó, una significativa disminución en la expresión de Cx-43 en el extracto testicular de las ratas E vs C (C: 0.79 ± 0.11 ; E: 0.019 ± 0.002 , $p < 0.0001$). No se observaron variaciones en la expresión de ocludina entre C y E (C: 0.798 ± 0.25 ; E: 0.793 ± 0.22 , $p > 0.05$). Los resultados obtenidos, sugieren que el MEHP induce una disminución de la expresión de Cx-43 y no altera la expresión de ocludina. La disminución de Cx-43 induciría alteraciones de las uniones Sertoli / células germinales (CG) provocando la descamación de CG.

SISTEMA CARDIOVASCULAR I

44. (541) EL PRETRATAMIENTO CON RIBOSA MEJORA LA FUNCIÓN VENTRICULAR Y REDUCE EL TAMAÑO DE INFARTO EN RATAS. PALLEIRO JIMENA, GONZÁLEZ GERMÁN E, SEROPIAN IGNACIO, GELPI RICARDO J

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular. Facultad de Medicina. UBA

Es conocido que la administración de ribosa acelera la vía de las pentosas aumentando la síntesis de ATP en estados fisiopatológicos asociados con disminución de fosfatos de alta energía como en el infarto de miocardio (IM). Sin embargo, no es conocido si el pretratamiento con ribosa reduce el tamaño de IM y mejora la disfunción ventricular aguda post-IM. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del pretratamiento con ribosa sobre el tamaño de IM y la disfunción ventricular aguda post-IM en ratas. Métodos: 24 ratas Sprague-Dawley de 220-240 gr fueron anestesiadas con una solución de Ketamina y Xilazina, y divididas en 4 grupos experimentales: Sham; IM; IM+Cloruro de Sodio (NaCl) e IM+Ribosa. En los 2 últimos grupos se realizó una infusión intravenosa continua de NaCl (1 ml/h) y de Ribosa (200 mg/kg/h) respectivamente, desde 24 hs antes del IM hasta el sacrificio final. A las 6 hs post-cirugía se realizaron mediciones de función ventricular izquierda (VI) in vivo con un cateter heparinizado ("fluid filled"). Seguidamente los animales fueron sacrificados, los corazones fueron perfundidos con Azul de Evans e incubados en trifenil de tetrazolium (TTC) y se midió el tamaño de IM (TIM) que fue expresado como % del área de riesgo. Resultados: fueron expresados como $X \pm SEM$ * $p < 0.05$ vs. sham, # $p < 0.05$ vs. IM, + $p < 0.05$ vs. IM+NaCl PSVI: presión sistólica; PDF: presión diastólica final; +dP/dt: máxima velocidad de ascenso de la PVI Conclusión: El pretratamiento con ribosa atenuó la disfunción ventricular a las 6 hs post-IM. Este hecho podría estar relacionado con un enlentecimiento en la evolución de la injuria a la muerte celular, resultando en infartos más pequeños a ese tiempo.

	Función ventricular y TIM			TIM(%)
	PSVI (mmHg)	PDF (mmHg)	+dP/dt (mmHg/seg)	
Sham(5)	100.9±0.7	4.4±0.5	1901.2±79.2	
IM(8)	87.1±1.0*	8.4±0.4*	1667±76.6	38.55±4.80
IM+NaCl(5)	78.8±0.8*#	10.9±0.7*#	1203.9±65.4*#	31.53±3.57
IM+Ribosa(6)	93.8±1.3*#+	6.5±0.8+	1993.2±59.5 #+	17.27±3.70#+

45. (703) FUNCION VENTRICULAR IN VIVO Y SU RELACION CON PARAMETROS HORMONALES Y MORFOLOGICOS DE LA HIPERTROFIA DE MIOCARDIO EN MODELOS COMBINADOS DE HIPERTENSION ARTERIAL. CERRUDO CAROLINA SUSANA, GONZALEZ GERMAN E., CAVALLERO SUSANA, PALLEIRO JIMENA, PELUSO ANTONELA, GELPI RICARDO J., FERNANDEZ BELISARIO E.

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina. UBA

Determinamos previamente la producción de péptidos natriuréticos (PN) y parámetros morfológicos en modelos de hipertensión renovascular (RV) y DOCA-sal (DS) asociados sucesivamente en secuencias diferentes. Continuamos evaluando la función ventricular en relación con dichos parámetros, en ratas con RV y DS de 2 (RV2 y DS2) y 4 semanas (RV4 y DS4) y combinados RV2/DS2 y DS2/RV2 y sus sham (Sh), (n=5-8). Se registró presión sistólica (PS) indirecta y se evaluó in vivo presión sistólica ventricular izquierda (PSVI), presión diastólica final (PDFVI), máxima velocidad de ascenso de presión (dP/dtmáx) y frecuencia cardíaca (FC). La PS aumentó en todos los grupos. La PSVI mostró mayor incremento en RV2 y RV4 que en RV2/DS2 (mmHg±ESM, Sh2: 101.8±0.6; Sh4: 99.7±0.6; RV2: 121.5±1.4*; RV4: 117.3±1.0#; RV2/DS2: 106.8±1.2&, * $p < 0.001$ vs. Sh2; # $p < 0.001$ vs Sh4, &

$p < 0,001$ vs Sh4, RV2 y RV4). La PDFVI no se modificó en RV2 y RV4 y mostró un aumento marcado en RV2/DS2 (mmHg \pm ESM, Sh2: 4.5 \pm 1.2; Sh4: 5.6 \pm 0.9; RV2: 5.1 \pm 0.6; RV4: 5.4 \pm 0.4; RV2/DS2: 14.1 \pm 2.18; & $p < 0,001$ vs. Sh4, RV2 y RV4). La PDFVI aumentó en DS4 y no varió en DS2 y DS2/RV2 (mmHg \pm ESM, Sh2: 4.5 \pm 1.2; Sh4: 5.6 \pm 0.9; DS2: 4.5 \pm 0.6; DS4: 11.9 \pm 1.6; DS2/RV2: 4.8 \pm 0.9#; # $p < 0,001$ vs Sh4). La dP/dt \max aumentó en RV4 ($p < 0,001$ vs Sh4 y RV2) y DS2/RV2 ($p < 0,001$ vs Sh4, DS2 y DS4). No hubo cambios en la FC. La PSVI correlacionó con la expresión de ARNm-BNP en VI en los grupos RV ($r = 0.9$) pero no en DS. En ambos tratamientos la PDFVI correlacionó con el ARNm-ANF ($r = 0.7$) y la dP/dt \max con el diámetro de los miocitos (RV, $r = 0.9$; DS, $r = 0.8$). El ANF circulante no guardó relación con los parámetros funcionales. Concluimos que la funcionalidad cardíaca en modelos combinados depende de la secuencia de las sobrecargas, siendo la última sobrecarga instaurada la que determina la evolución del proceso hipertrofico. Los parámetros funcionales se relacionan más con la producción de los PN que con su secreción.

46. (293) EL ODQ, INHIBIDOR DE LA GUANILATO CICLASA, REVIERTE PARCIALMENTE LOS EFECTOS PROTECTORES DEL AYUNO PREVIO Y DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO (PC) EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSION. MARINA PRENDES MARIA GABRIELA, PASCALE NATALIA, HERMANN ROMINA, SAVINO ENRIQUE, VARELA ALICIA

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, IQUIMEFA-CONICET

En trabajos anteriores demostramos que el ayuno previo mejora la recuperación funcional y el PC reduce el tamaño del infarto y mejora la recuperación funcional tanto en corazones provenientes de ratas alimentadas ad libitum (AL) como ayunadas 24 hs (AY) sometidos a isquemia global (I)-reperfusión (RP). El L-NAME, inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, revierte la protección del ayuno y produce abolición de la protección funcional aguda del PC. Para explorar la participación del GMPc en los efectos protectores del AY y del PC, se investigó la acción del inhibidor de la guanilato ciclasa, ODQ 5 μ M, en corazones perfundidos Langendorff AY o AI sometidos a I (25 min)-RP (30 min). El PC consistió en I (3 min)-RP (5 min) previos a la I sostenida. El ODQ fue administrado 5 min previos al PC (PC-ODQ) o 13 min previos a la I sostenida en corazones no precondicionados (ODQ) hasta el final de la I sostenida ($n = 8$ /grupo). La contractilidad fue evaluada con el producto PxF (presión ventricular sistólica pico por frecuencia cardíaca), las velocidades de contracción (+dP/dt max) y de relajación (-dP/dt max) y la contractura mediante la PDF (presión ventricular diastólica final). El ODQ no alteró los parámetros basales. Tanto el ayuno como el PC redujeron la contractura post-isquémica (AL 39 \pm 10%, AY 9 \pm 5 $p < 0.05$, PC-AL 4 \pm 3% $p < 0.05$ a los 5 min de RP), mejoraron la recuperación de PxF (AL 59 \pm 9%, AY 89 \pm 8% $p < 0.05$ vs AL, AI-PC 89 \pm 9% $p < 0.05$ vs AL, AY-PC 109 \pm 8% $p < 0.05$ vs AY, a los 30 min de RP). El ODQ no afectó la recuperación de los corazones AL y abolió parcialmente los efectos protectores del PC y del ayuno (PxF: AL-ODQ 59 \pm 13% n.s. vs AL, AY-ODQ 69 \pm 5 $p < 0.05$ vs AY, AL-PC-ODQ 73 \pm 13% n.s. vs AL, AY-PC-ODQ 72 \pm 4% n.s. vs AY). Los efectos sobre las velocidades de contracción y relajación fueron similares a los hallados sobre PxF en todos los casos. Estos datos sugieren la participación del GMPc en la protección aguda ejercida por el PC y en los efectos protectores del ayuno.

47. (309) LA CICLOSPORINA A, INHIBE PARCIALMENTE LA TRANSICION DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA GLOBAL- REPERFUSION (RP). MARINA PRENDES MARIA GABRIELA, TORRESIN EMILIA, GONZALEZ MARCELA, INFANTE NORMA, SAVINO ENRIQUE, VARELA ALICIA

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, IQUIMEFA-CONICET

La apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) es inhibido específicamente por la CsA. En el presente trabajo se investigaron los efectos del inhibidor sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial y la recuperación funcional del corazón de rata perfundido Langendorff sometido a I (25 min)-RP (30 min). La CsA 0.2 μ M fue agregada al medio 13 minutos antes de la I hasta el final de la RP. La contractilidad se evaluó con el producto PxF (presión ventricular sistólica pico por frecuencia cardíaca), las velocidades de contracción (+dP/dt max) y de relajación (-dP/dt max) y la contractura con la PDF (presión diastólica final). Para evaluar los cambios de la permeabilidad mitocondrial se empleó el método de atrapamiento de 3H-desoxiglucosa (DG). Los corazones fueron cargados 30 min con DG 0.5 mM (0.1 μ Ci/mL) seguidos de 13 min de perfusión sin DG previos a la I-RP ($n = 8$). 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. Al finalizar el experimento los corazones se homogeneizaron en medio Tris-CIH-sacarosa-EGTA-BSA, pH 7.4. El EGTA impide la liberación de DG en el proceso de aislamiento mitocondrial.

La CsA mejoró la recuperación funcional (PxF: 57.8 \pm 6.8 vs 23.29 \pm 8.6%, $p < 0.05$, +dP/dt max: 77.08 vs 43 \pm 14% $p < 0.05$, -dP/dt max: 78.17 \pm 9.49 vs 48.0 \pm 14.7 $p < 0.05$, PDF: 2.58 \pm 2.03 vs 25.71 \pm 6.35% $p < 0.05$ a los 15 min de RP). La captación mitocondrial de DG fue menor en presencia de CsA (67.37 \pm 7.74 vs 96.36 \pm 14.02 dpm mitocondrial x 105 /unidad de citrato sintetasa mitocondrial x dpm totales /g h, $p < 0.05$). La radiactividad total celular fue mayor en presencia de CsA al final de la I-RP (94152 \pm 8028 vs 58954 \pm 5149 dpm/gh $p < 0.05$). Los resultados indican que a pesar de ser un inhibidor específico del PTPM, la protección ejercida por CsA se acompaña de una preservación parcial de la permeabilidad mitocondrial.

48. (504) TRATAMIENTO PROLONGADO DEL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO OVINO CON HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA: SU EFECTO SOBRE LA FUNCIÓN VENTRICULAR Y LA EXTENSIÓN DEL ÁREA NECRÓTICA. OLEA DANIELA, VERA JANAVEL GUSTAVO, DE LORENZI ANDREA, CABEZA MECKERT PATRICIA, CORTÉS CLAUDIA, CENDOYA OSCAR, BERCOVICH ANDRÉS, LAGUENS RUBÉN, CROTTOGINI ALBERTO

Universidad Favaloro; Fundación Favaloro; BIO SIDUS

Introducción: En roedores, la hormona de crecimiento (GH) luego del infarto agudo de miocardio (IAM) reduce el área necrótica y el remodelamiento ventricular, y aumenta la reserva contráctil. Sin embargo, no hay estudios en mamíferos grandes a largo plazo. Métodos: 16 ovejas con ligadura de la 1^a y 2^a diagonales de la descendente anterior recibieron al azar 8 UI/día de rhGH subcutánea ($n = 8$) o vehículo ($n = 8$) durante 70 días a partir del IAM. Previo al IAM y a los 3, 15, 30 y 70 días se realizó ecocardiograma para evaluar la función global y regional del ventrículo izquierdo y se dosó somatomedina. A los 70 días (previo al sacrificio) se midieron presiones ventriculares y sus derivadas máxima y mínima (dP/dt \max y min) por cateterismo izquierdo y el score de motilidad regional por cámara gamma. El tamaño de infarto se evaluó por planimetría endocárdica, y el porcentaje de fibrosis fue determinado en cortes teñidos con tricrómico de Masson. Resultados: A los 3 días, el grupo GH exhibió mejor fracción de acortamiento (30.7 \pm 3.5% vs. 24.7 \pm 6.1%, $p < 0.05$), espesor parietal sistólico (10.1 \pm 0.8 mm vs. 8.6 \pm 1.2 mm, $p < 0.01$), onda s del doppler tisular (8 \pm 1.3 cm/seg vs. 6.4 \pm 1.1 cm/seg, $p < 0.05$) y volumen minuto (3.4 \pm 0.6 l/min vs. 2.4 \pm 0.6 l/min, $p < 0.01$). La somatomedina fue superior en el grupo GH a los 3 días (227.13 \pm 42 ng/ml vs. 130.29 \pm 41, $p < 0.001$), pero a partir de los 15 días, ésta aumentó progresivamente en el grupo placebo, des-

apareciendo las diferencias inter-grupo tanto en los valores de somatomedina como en los parámetros de función ventricular. El tamaño de infarto no difirió entre grupos, pero sí el espesor parietal peri-infarto (GH 1.01 ± 0.5 cm, placebo 0.66 ± 0.2 cm, $p < 0.01$). Las presiones, dP/dt y score de motilidad no difirieron entre grupos. Conclusión: En el IAM ovino, la administración de GH mejora precozmente la función ventricular, pero a partir de los 15 días este efecto es alcanzado también por el grupo placebo por el aumento espontáneo de la somatomedina.

49. (128) EVALUACIÓN DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL MEDIANTE ANÁLISIS DE ONDA DE PULSO RADIAL. CLARA FERNANDO (1), CAYROL MARÍA LAURA (2), MOYANO EDUARDO (2), GARCILO MYRIAM (2), INTROZZI ANIBAL (1) (3), SCANDURRA ADRIANA (1), MESCHINO GUSTAVO (1), NUÑO FERNANDO (1)

Laboratorio de Bioingeniería - Universidad Nacional de Mar del Plata (1); Servicio Universitario de Salud - Universidad Nacional de Mar del Plata (2); Instituto Nacional de Rehabilitación del Sur - Mar del Plata (3)

La disfunción endotelial (DE) se halla relacionada con el desarrollo de enfermedades vasculares. Un método reciente para evaluarla consiste en el análisis de la onda de pulso (OP) de presión radial obtenida mediante tonometría. Este analiza una onda superpuesta a la onda sistólica (OS), llamada reflexión sistólica (RS) y originada en una reflexión en las arterias terminales de la zona inferior del cuerpo. Se mide un índice de aumentación radial (IAR), definido como el máximo valor de la ordenada durante el transcurso de la RS. Dado que se halló experimentalmente que individuos con valores similares de IAR tenían amplitudes de RS notoriamente distintas, se intentó buscar otro índice que refleje en mayor grado esta última situación. Para ello se efectuó un estudio poblacional sobre $n = 92$ varones normotensos sanos de edades entre 30 y 60 años, obteniéndose la OP mediante el registro de las variaciones de diámetro de la arteria radial mediante un sensor de movimiento aplicado sobre la zona de palpación del pulso radial. Se midió en cada caso el IAR y el ancho de la OS (AOS), a una altura relativa del 50%. Se graficó el AOS en función del IAR para el conjunto, comprobándose efectivamente que individuos con similares valores de IAR tenían muy distintos valores de AOS. La correlación entre IAR y AOS resultó $r = 0.23$ para la 4ª década ($n = 22$), $r = 0.55$ para la 5ª ($n = 36$), y $r = 0.49$ para la 6ª ($n = 34$), valores que indican que ambas variables no se hallan correlacionadas. El IAR depende principalmente de la velocidad de propagación aórtica, pues al aumentar esta se adelanta el instante de llegada de la RS, trepando sobre la pendiente de descenso sistólica. Si se aumenta la amplitud de la RS sin modificar la velocidad aórtica, el IAR permanece casi invariable, pero aumenta el AOS. Se sabe que la DE aumenta la amplitud de las reflexiones. Se concluye que si el objetivo es evaluar la DE, el AOS sería un índice más apropiado para tal fin que el IAR.

50. (580) LA TRH DIENCEFALICA PARTICIPA EN EL EFECTO PRESOR DE LA LEPTINA EN RATONES OB/OB. BURGUEÑO ADRIANA LAURA, SCHUMAN MARIANO L, CARABELLI JULIETA, LANDA MARIA S, ALVAREZ AZUCENA L, GARCIA SILVIA I, PIROLA CARLOS J

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA - CONICET

La leptina es una hormona producida en los adipocitos, directamente relacionada con la ingesta y el peso corporal. Ejerce su acción sobre el hipotálamo regulando la liberación y síntesis de diversos péptidos anorexígenos. Así, demostramos que en ratas obesas la leptina produce un aumento de TRH diencefálica que es la responsable de su efecto presor modulando el sistema simpático. Los ratones ob/ob carecen de leptina funcional circulante por lo que no poseen saciedad, lo que los hace obesos y presentan una presión arterial (PA) menor que sus controles acompa-

ñada de una disminución del tono simpático. Así hipotetizamos que la disminución de presión en estos ratones debería acompañarse por un bajo contenido de TRHd y que la sustitución de la leptina debería llevar a un aumento de la TRHd con aumento de la PA en este modelo. Inyectamos leptina recombinante de ratón (10 ug /12 hs) en forma subcutánea durante 3 días. Los ratones ob/ob tratados con leptina a las 48 hs redujeron su ingesta (3.85 ± 0.65 vs basal: 5.57 ± 0.45 ; $n=5$ $p < 0.001$), por lo cual a las 72 hs se observó una disminución significativa del peso corporal (63.22 ± 11.34 vs basal: 64.93 ± 12.22 ; $p < 0.04$). A favor de nuestra hipótesis, los ratones ob/ob que recibieron leptina también mostraron un aumento de la PAS a las 24 y 72 hs luego del inicio del tratamiento con respecto al grupo ob/ob tratado con salina (24hs: 112.89 ± 29.77 vs 101.20 ± 23.38 ; 72 hs: 106.6 ± 22.40 vs 102.63 ± 4.65 ; $p < 0.04$) que se vió acompañado por un aumento del contenido disminuído de TRHd alcanzando los mismos valores que el grupo control (ob/ob salina: 386 ± 62 , ob/ob+lep: 772 ± 63 , c57: 648 ± 72 $p < 0.03$ vs ob/ob salina). En base a los resultados, proponemos a la TRHd como mediadora del efecto hipertensor de la leptina contribuyendo a la fuerte asociación entre hipertensión y obesidad.

51. (697) EL INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DEL GEN DE TRH EN EL CORAZÓN DE RATAS SHR DURANTE EL DESARROLLO DE HIPERTROFIA VENTRICULAR ES POSTERIOR AL AUMENTO DE MARCADORES PRECOCES DE HIPERTROFIA. SCHUMAN MARIANO LUIS, LANDA MARIA SILVINA, ALVAREZ AZUCENA L, PIROLA CARLOS J, GARCIA SILVIA I

Cardiología Molecular- Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari

Hemos demostrado que el sistema de la TRH cardíaco se encuentra hiperactivado (aumento de mRNA del precursor y del contenido de proteína) en el corazón hipertrofiado de las ratas SHR vs WKY. También demostramos que en un modelo de infarto por ligamiento de la arteria coronaria izquierda en rata normal la expresión de TRH aumenta en la zona adyacente a la cicatriz del VI. A su vez la TRH provoca un aumento significativo de la expresión del gen de bMCH (marcador de hipertrofia) así como la fenilefrina (hipertrofiante) aumentan la TRH más de 10 veces en cultivos de cardiomiocitos sugiriendo que la TRH actuaría en el desarrollo de la hipertrofia o aumentaría ante estímulos hipertrofiantes. Evaluamos la expresión del gen de la TRH en la rata SHR como modelo de hipertrofia en distintas edades, desde el nacimiento hasta la adultez para observar si la inducción de la expresión del gen de la TRH antecede, acompaña o es posterior a señales precoces de hipertrofia como ANP, BNP. Cuantificamos a partir de cDNA por PCR en tiempo real con primers específicos la expresión de TRH, ANP y BNP en aurículas, ventrículos y septum de ratas ($n=8$) SHR y controles WKY a distintas semanas de edad (w) (neonatos-7w-12w-18w y 34w). La expresión del gen de TRH correlacionó con el índice de hipertrofia en la población general ($r: 0.68$ $p < 0.05$ $n=80$). Analizando los grupos por edades, se observó un aumento de 1.3 y 1.8 veces en la expresión de TRH (TRH/actina) en el VI de las SHR a las 12w y 18w cuando la hipertrofia ya es severa y sorprendentemente disminuye significativamente a las 34w. No observamos cambios significativos a edades tempranas entre ambas cepas demostrando que el aumento de TRH respondería a señales hipertróficas como por ejemplo el aumento de ANP o BNP observado más tempranamente. Estos resultados descartarían a la TRH como un agente hipertrofiante que antecede el desarrollo.

52. (394) ¿SON LAS HORMONAS SEXUALES LAS RESPONSABLES DE LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA CARDIACA ENTRE HEMBRAS Y MACHOS? BERTRÁN GUILLERMO, VALVERDE ESTEBAN, ARINI PEDRO

Instituto de Investigaciones Médicas; Facultad de Ingeniería; Instituto Argentino de Matemática

Se sabe que la madurez y las hormonas sexuales afectan diferencialmente los patrones electrocardiográficos de machos y hembras. Para ello se evaluaron las características del ECG y de los potenciales de acción (PA) en 6 grupos de conejos: hembras jóvenes (HJ), machos jóvenes (MJ), hembras adultas (HA), machos adultos (MA), hembras castradas (HC) y machos castrados (MC). En el ECG se midieron: intervalo QT (QTe), intervalo JT (JTe), intervalo del punto J al pico de la onda T (JTp), intervalo del pico al final de la onda T (Tpe) y duración del QRS. Las señales fueron corregidas según una modificación del método de Framingham. En los PA, se evaluó duración al 30, 50 y 90% de su repolarización (APD30, 50 y 90), amplitud (APA), pendiente ascendente (dV/dt) y potencial de reposo (PR) a cuatro frecuencias de estimulación: 300, 500, 1000 y 5000 ms. En el ECG se observó diferencias significativas en MJ vs MA y MC en QTe, JTp y JTe (QTe: 196.4 ± 1.7 vs 174.4 ± 2.4 y 182.5 ± 3.6 ; JTp: 101.1 ± 1.3 vs 74.6 ± 2.4 y 75.5 ± 2.8 ; JTe: 144.5 ± 1.5 vs 123.2 ± 2.3 y 125.7 ± 2.6); HJ vs HA y HC en JTp (95.3 ± 2.2 vs 76.8 ± 2.2 y 81.7 ± 2.8); HA vs HJ y HC en Tpe (46.9 ± 1.7 vs 54.6 ± 1.7 y 50.1 ± 2.2) mientras que no hubo diferencias significativas en QRS. En los PA, se observaron diferencias significativas en MJ vs MA y MC en APD30 y APD50 (APD30: 95.1 ± 2.9 vs 77.5 ± 2.9 y 78.9 ± 3.4 ; APD50: 120.5 ± 4.1 vs 101.6 ± 3.7 y 101.6 ± 4.7) y de HA vs HJ y HC en el APD90 (166.6 ± 3.7 vs 155.4 ± 2.3 y 154.8 ± 5.4). Los MA presentaron un PR significativamente diferente vs MJ y MC (-76.4 ± 0.5 vs -81.6 ± 0.7 y -84.6 ± 0.9), mientras que no hubo diferencias significativas en APA ni en dV/dt. En todos los casos las p fueron menores a 0.05. Estos resultados sugerirían que varios de los cambios que aparecen en la actividad eléctrica cardíaca, podrían deberse a factores no hormonales.

53. (168) EFECTO DEL NO ENDÓGENO SOBRE LA ACTIVIDAD MECÁNICA DEL MIOCARDIO Y SU TOLERANCIA A LA HIPOXIA/REOXIGENACIÓN. LA PADULA PABLO, COSTA LIDIA E.

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA

El óxido nítrico (NO) ha emergido como un importante regulador de la homeostasis del calcio y de la función contráctil del miocardio, y estaría involucrado en el mecanismo de protección contra la isquemia/reperfusión. En el presente estudio se evaluó el efecto del NO endógeno del miocardio sobre los parámetros de actividad mecánica durante la respuesta al calcio y a la hipoxia/reoxigenación. En 20 músculos papilares aislados de ventrículo izquierdo de ratas macho adultas, se determinaron la tensión desarrollada (TD) y las velocidades máximas de contracción (+T) y de relajación (-T), en condiciones isométricas, a 0.6, 0.8, 1.3, 1.8, 2.3 y 2.8 mM Ca²⁺, y a esta última concentración, durante un período de 60 min de hipoxia y 30 min de reoxigenación. Ambos músculos papilares de cada rata se estudiaron paralelamente, uno suplementado con el sustrato de la NO sintasa (NOS), L-arginina (L-arg) 2 mM, para obtener la máxima producción fisiológica de NO, y el otro en presencia del inhibidor de la NOS, Nw-nitro-L-arginina (L-NNA) 2 mM, para bloquear la generación de NO. Los resultados significativos ($p < 0.05$) se expresan como media \pm SE, L-arg versus L-NNA. A Ca²⁺ máximo, TD (g/mm²): 1.16 ± 0.08 vs 0.85 ± 0.07 ; +T (g/mm².s): 22.6 ± 1.5 vs 15.6 ± 1.6 ; -T (g/mm².s): 15.9 ± 0.5 vs 11.4 ± 1.5 . A los 30 min de reoxigenación, +T: 16.2 ± 1.5 vs 12.6 ± 0.6 ; -T: 11.3 ± 1.0 vs 8.0 ± 0.7 . Tanto las áreas bajo las curvas de calcio como bajo las curvas de reoxigenación fueron mayores en L-arg que en L-NNA para todos los parámetros. Conclusiones: En ratas adultas en condiciones fisiológicas el NO endógeno modularía positivamente en 27-31% la actividad mecánica a calcio máximo y contribuiría a proteger al miocardio contra la hipoxia/reoxigenación.

ENDOCRINOLOGÍA II

54. (167) MICROHETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE HUMANA DU-

RANTE LA TRANSICIÓN A LA MENOPAUSIA. LORETI NAZARETH (1), AMBAO VERÓNICA (1), JULIATO CASSIA (2), MACHADO CECILIA (1), PETTA CARLOS (2), PERROTTI MARCOS (2), BAHAMONDES LUIS (2), CAMPO STELLA (1)

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Argentina (1); Unidad de Reproducción Humana, Departamento de Tocoginecología, Facultad de Medicina, Universidad Estadual de Campinas, Brasil (2)

En la perimenopausia, existiría una alteración silenciosa de los mecanismos que regulan la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. El objetivo de este trabajo fue determinar las características y la regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de la FSH circulante en mujeres perimenopáusicas. Se incluyeron 20 mujeres (45-52 años): 10 con ciclos menstruales y niveles de FSH normales, en fase folicular media (P); 10 usuarias de acetato de medroxiprogesterona de depósito (AMPD) (PU), y 7 jóvenes usuarias (20-30 años) (JU). Se determinó el perfil hormonal sérico: FSH, E2, Pro- α C e inhibina B (Inh B) por EIA y la distribución de isoformas de FSH por grado de sialilación (isoelectrofoque preparativo) y de procesamiento de carbohidratos (cromatografía en Con A) aislando las de tipo complejo (NR y DR) e híbridos (FR). Niveles normales/aumentados de E2 y Pro- α C, y disminuidos de Inh B en P, se asociaron con una proporción predominante de FSH a pH 3.8-4.39 ($p < 0.001$) e isoformas con carbohidratos complejos (NR: $45.0 \pm 2.7\%$; DR: $40.5 \pm 3.1\%$). Niveles aumentados de FSH y disminuidos de E2 e Inh B en PU, se asociaron con una distribución uniforme de FSH a pH < 3.2 -4.99 y un predominio de DR ($p < 0.001$). Niveles hormonales en el límite de la normalidad en JU se asociaron con una proporción predominante de FSH a pH 3.2-4.39 ($p < 0.01$) y de NR ($p < 0.05$). En los 3 grupos se observó una proporción similar de isoformas FR (P: $15.3 \pm 2.4\%$, PU: $21.8 \pm 2.3\%$ y JU: $13.9 \pm 2.7\%$). En la perimenopausia la FSH más ácida y con menor procesamiento de sus oligosacáridos difiere de la observada previamente en fase folicular media de ciclos ovulatorios con similar tenor estrogénico, sugiriendo una alteración en los mecanismos regulatorios de la bioactividad. Las diferencias determinadas por la edad en usuarias de AMPD permitirían utilizar la microheterogeneidad molecular de FSH como marcador de actividad gonadal.

55. (183) ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ADRENAL EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA TERMINAL E HIPOTENSIÓN ARTERIAL SOSTENIDA MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES SALIVALES EN RESPUESTA A BAJA DOSIS DE ACTH. ARREGGER ALEJANDRO, CARDOSO ESTELA, TUMILASCI OMAR, CANALIS MANUEL, CASTIGLIONE EDUARDO, CONTRERAS LILIANA

IDIM; Laboratorio de Glándulas Salivales. Facultad de Medicina. UBA; Unidad de Diálisis. Hospital Alemán.

Con el objeto de evaluar la función adrenal en pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento dialítico e hipotensión arterial sostenida (IRCDH) se investigó la respuesta de cortisol (SAF) y aldosterona (SAL) salivales a la estimulación con baja dosis de ACTH. Fueron evaluados 25 IRCDH con TA sistólica < 100 mm/Hg. El grupo control (C) lo constituyeron 21 voluntarios sanos. Se obtuvieron muestras de saliva entera en ayunas y a los 30' de la inyección intramuscular de 25 μ g de ACTH sintética para la determinación de SAF y SAL por 20 nmol/L y 100 pmol/L RIA. Resultados: en C, SAF y SAL post ACTH fueron respectivamente. En IRCDH las concentraciones de SAF y SAL a los 30' post ACTH respecto a C fueron: a) menores en dos (SAF: 5.6 ± 1.9 nmol/L, $p=0.025$ y SAL: 51.7 ± 54.9 pmol/L, $p=0.025$); b) menores en SAF (8.4 ± 7.9 nmol/L, $p=0.025$) y no diferentes en SAL (175.0 ± 7.0 pmol/L $p=0.701$) en dos; c) no diferentes en SAF (38.7 ± 27.7 nmol/L, $p=0.553$) y menores en SAL (13.7 ± 0.2 pmol/L, $p=0.007$), en cuatro, d) no diferentes en SAF (34.0 ± 11.8 nmol/L $p=0.296$) asociadas a niveles basales elevados de SAL

(260.0±212.3 pmol/L $p < 0.001$), en nueve y, e) no diferentes, en ocho (SAF: 62.7 ± 39.9 nmol/L, $p=0.075$ y SAL: 237.5±233.7 pmol/L, $p=0.731$). Las determinaciones de ACTH y renina circulantes confirmaron la etiología de los defectos: insuficiencia adrenal primaria en 2 casos, insuficiencia adrenal secundaria en 2, e hipoaldosteronismo selectivo en 4. Conclusiones: se halló insuficiencia adrenal selectiva (24%) y total (8%) en pacientes con IRCDH. La determinación de esteroides salivales en respuesta a baja dosis de ACTH fue útil para identificar de manera poco invasiva estadios tempranos de disfunción adrenal en estos pacientes.

56. (425) EFECTOS DE FLAGELINA SOBRE LA FUNCIÓN ADIPOCITARIA. GIOVAMBATTISTA ANDRÉS (1,2), ZUBIRÍA GUILLERMINA (1), RUMBO MARTÍN (3), SPINEDI EDUARDO (1)

(1)-Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CONICET-CICPBA), La Plata;(2)- Cátedra de Biología, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP; (3)- Cátedra de Inmunología, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP

Es conocido que las células adiposas son productoras de adipocitoquinas y que este tejido está involucrado en la respuesta inflamatoria ante agentes infecciosos. Flagelina (Flag), proteína componente de los flagelos bacterianos, es un ligando natural de Toll-like receptor 5. El objetivo del presente estudio fue evaluar la posible respuesta in vitro de las células adiposas a la Flag. Pre-adipocitos aislados de tejido adiposo retroperitoneal, obtenido de ratas Sprague-Dawley macho adultas, se cultivaron (2x10⁴ cel/pozo) para inducir su diferenciación a adipocitos. El día ocho de cultivo, las células fueron lavadas y el medio se reemplazó por medio fresco sólo o conteniendo diferentes concentraciones de Flag (0,01-1 µg/ml) y se cultivó por 12 y 24 hs adicionales. En el medio de cultivo se determinó la concentración de leptina (RIA). En experimentos adicionales Flag (0,01-1 µg/ml) se adicionado desde el día que se indujo la diferenciación hasta el día 8 de cultivo. Luego se determinó la leptina liberada al medio de cultivo cada 48 hs, y el contenido lipídico por la técnica de OIL-Red O. Los resultados obtenidos indican que Flag (a las tres concentraciones utilizadas) incrementó significativamente ($P < 0,05$ vs. Basal) la liberación de leptina al medio, luego de 12 y 24 hs de cultivo. Contrariamente, la presencia de Flag (1 y 0,1 mg/ml) desde la inducción de diferenciación disminuyó la secreción de leptina a partir del día 6 de cultivo (en ng/ml de leptina, Basal: 0,31±0,03, Flag 1: 0,18±0,01, Flag 0,1: 0,23±0,01; $P < 0,05$ vs. Basal) y el contenido de lípidos adipocitarios ($P < 0,05$) al día 8 de cultivo. Los resultados obtenidos indicarían que: a- las células adiposas serían receptivas a los efectos de Flag; b- aunque Flag estimularía en la liberación de leptina por adipocitos maduros, inhibiría la diferenciación de pre-adipocitos. Estos efectos de Flag podrían resultar de importancia en el control homeostático durante estados de infección bacteriana.

57. (429) EFECTOS IN VITRO DE DES-GHRELINA SOBRE LA FUNCIÓN ADIPOCITARIA. GIOVAMBATTISTA ANDRÉS (1,2), ALZAMENDI ANA (1), SPINEDI EDUARDO (1)

(1)-Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CONICET-CICPBA), La Plata; (2) - Cátedra de Biología, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP.

La forma des-acilada de Ghelina, Des-octanoil-Ghrelina (Des-Ghr), representa la mayor parte de Ghrelina circulante. Aunque inicialmente se le adjudicó a Des-Ghr una carencia de actividad biológica, trabajos recientes demuestran lo contrario. El objetivo de este trabajo fue evaluar, in vitro, los efectos de Des-Ghr sobre la producción de leptina (Lep) y el consumo de glucosa por adipocitos. Pre-adipocitos, aislados de tejido adiposo retroperitoneal de rata S-D macho adulta, se cultivaron (2x10⁴ cel/pozo) para inducir su diferenciación. El día 8 post-diferenciación las células fueron lavadas y cultivadas, por diferentes periodos de tiempo (6, 12 y 24 hs), en presencia de medio sólo o conteniendo Des-Ghr (0,1-10 nM) o insulina (1-100 nM). Finalizados los cultivos, se

determinó las concentraciones de Lep y glucosa en el medio, y la expresión adipocitaria de ARNm de ob (RT-PCR). Adicionalmente, se co-cultivó (12 hs) M) Des-Ghr (1nM) con inhibidores de transcripción (Actinomicina D; 0,5 µM) o de traducción (Cicloheximida; 35,5 µM) o antagonista del receptor GHSr1a (1µM). Los resultados indican que: 1) Des-Ghr (1 y 10 nM) estimuló significativamente ($p < 0,05$ vs. basal) la secreción adipocitaria de Lep; 2) Des-Ghr 1nM aumentó significativamente ($p < 0,05$ vs. basal) el consumo de glucosa; 3) la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas, pero no la acción del antagonista de GHSr1a, bloquearon el efecto adipocitario de Des-Ghr 1 nM sobre la liberación de Lep; y 4) Des-Ghr 1nM incrementó significativamente ($p < 0,05$ vs. basal) la expresión adipocitaria del ARNm de ob. Estos resultados indican que Des-Ghr ejerce un efecto estimulador de la producción de Lep adipocitaria, mecanismo que involucra la síntesis de novo de la adipoquina, e induce la utilización de glucosa por estas células. Este estudio sugiere un nuevo rol modulador de Des-Ghr sobre la función adipocitaria y, por consiguiente, sobre el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Subvencionado por PICT 13634.

58. (256) ALENDRONATO PROTEGE A LOS OSTEÓBLASTOS EN CULTIVO DE LA ACCIÓN NOCIVA DE LOS PRODUCTOS DE GLICACIÓN AVANZADA (AGES). GANGOITI MARIA VIRGINIA, CORTIZO ANA MARIA, MC CARTHY ANTONIO DESMOND

Cát. Bioquímica Patológica - Fac Cs Exactas - UNLP

En patologías crónicas como Diabetes mellitus, se acumulan productos de glicación avanzada (AGEs) sobre proteínas afectando sus funciones. Previamente hemos demostrado que los AGEs ejercen efectos deletéreos sobre el crecimiento y diferenciación de los osteoblastos en cultivo. Los bisfosfonatos (BP) son análogos del PPI que se utilizan en el tratamiento de patologías como la osteoporosis posmenopáusicas. En trabajos previos encontramos que BP como el Alendronato, incrementan de forma directa la maduración de osteoblastos en cultivo. El objetivo de este trabajo es investigar si el Alendronato revierte los efectos deletéreos de los AGEs en dos líneas celulares osteoblásticas: MC3T3E1 y UMR106. Se evaluó la diferenciación osteoblástica (actividad específica de fosfatasa alcalina), la apoptosis (método de anexina-V/ioduro de propidio), y la producción de especies de oxígeno reactivas (ensayos con dihidrorrodamina 123 y nitro blue tetrazolium). Los osteoblastos se cultivaron en presencia de albúmina sérica bovina (BSA) o AGE-BSA (100ug/ml), con o sin Alendronato (10⁻⁸M) durante 24-72hs. Los AGEs inhibieron la actividad de fosfatasa alcalina (87% basal, $p < 0.001$) y estimularon fuertemente la apoptosis (158% basal, $p < 0.001$). Estos efectos fueron acompañados de un aumento en el estrés oxidativo intracelular (123% basal, $p < 0.001$). La coincubación con alendronato revirtió parcial o totalmente los efectos inducidos por los AGEs. Estos resultados muestran que el alendronato es capaz de bloquear los efectos nocivos de los AGEs sobre osteoblastos en cultivo.

59. (438) ANÁLISIS MOLECULAR DEL POLIMORFISMO BSMI DEL RECEPTOR DE VITAMINA D (RVD). DARQUIER ROSARIO (1), FERNANDEZ NAHUEL (1), BARRIO GABRIEL (1), SPITZER EDUARDO (1), BUTTAZZONI MIRENA, ROSA DIEZ GUILLERMO, CRUCELEGUI SOLEDAD (3), PLANTALECH LUISA (2), COPELLI SILVIA (1)

Depto. de Cs. Biológicas Universidad CAECE (1) Servicio de Endocrinología del Hospital Italiano de Bs. As (2) Nefrología del Hospital Italiano de Bs. As (3)

La síntesis de la parathormona (PTH) según su afinidad por el calcitriol es modulada por variantes alélicas del RVD que presentan diferente actividad biológica. Estos polimorfismos estarían implicados en la patogenia del hiperparatiroidismo secundario (HPT2). El polimorfismo BsmI del RVD condiciona el HPT2 en pacientes con Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT) en estadio predialítico. Sin embargo poco se conoce sobre su influen-

cia en el HPT2 de pacientes con IRCT en HD. Objetivos: 1. Evaluar la prevalencia del polimorfismo BsmI del RVD en pacientes con IRCT en HD. 2. Determinar si existe predisposición genética para el desarrollo del HPT2 y/o hipoparatiroidismo funcional-hueso adinámico-(HIPOPTF). Pacientes y Métodos: se evaluó el polimorfismo BsmI del RVD en el ADN de 128 pacientes con IRC en HD y en 105 voluntarios sanos. Los pacientes se dividieron según el valor de PTH: mayor de 300 (HPT2) y PTH menor de 100 (HIPOPTF) y se correlacionaron con el genotipo bb, Bb, y BB por PCR y Digestión enzimática (BsmI); Dosaje de calcemia (Ca), fosfatemia (P), fosfatasa alcalina (FAL), parathormona intacta (PTHi). Resultados: Se realizó análisis de regresión lineal y prueba de χ^2 . En población IRCT se observó Ca 9.1 ± 0.8 mg/dl, P 5 ± 1.8 mg/dl, producto fosfocálcico 46.3 ± 17 , FAL 199 ± 270 UI, PTHi 203 ± 343 pg/ml, t $\frac{1}{2}$ de hemodiálisis 45 ± 40 meses. La regresión lineal bivariable entre PTH, bb ajustado a tiempo de HD es r:0.40, F22.4 p< 0.0001. Existen diferencias genotípicas entre los pacientes con IRCT y los controles. bb es más frecuente en IRCT y en HPT2. BB se asocia a HIPOPTF, siendo protector del HPT2 en los primeros años del tratamiento dialítico. Conclusiones: El polimorfismo BsmI del RVD en pacientes con IRCT es de utilidad clínica pues identificaría a la población de riesgo y permitiría modificar los factores ambientales para evitar el HPT2.

60. (515) EFECTO DEL 4-MBC SOBRE LA REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DEL EJE GONADAL EN RATAS MACHO PREPUBERALES Y PERIPUBERALES. CAROU MARIA ELENA, CARDOZO GUTIERREZ ROMINA, SZWARCFARB BERTA, REYNOSO ROXANA, CARBONE SILVIA, MOGUILVSKY JAIME A, SCACCHI PABLO, PONZO OSVALDO J.

Inst. Fisiología - Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires

El disruptor endocrino 4-methyl-benzyl-camphor (4-MBC) es utilizado en pantallas solares y actuaría sobre el sistema reproductor a través de un efecto estrogénico. Objetivo: evaluar el efecto de la exposición embrionaria a medianas y altas dosis de 4-MBC, sobre la regulación neuroendócrina gonadal en ratas macho durante el desarrollo puberal. Materiales y Métodos: Ratas Wistar hembra preñadas fueron inyectadas sc con 4-MBC en dosis de 100 y 500 mg/kg (MBC 100 y 500) a partir del primer día de preñez. Las crías macho de estas ratas fueron sacrificadas a los 15 y 30 días de edad (n= 8-12 por grupo). Los hipotálamos anteromediobasales se incubaron durante 60 minutos en buffer de Earle's, para la determinación de Gn-RH. En el suero obtenido se determinó la concentración de LH, FSH y prolactina. Las gónadas fueron pesadas y sus pesos expresados cada 100 gr de peso corporal. Resultados: En ratas de 15 días se observó un descenso en la liberación de Gn-RH con MBC 100 (Co: 14.5 ± 1.24 , MBC 100: 10.37 ± 0.64 p< 0.005, MBC 500: 11.38 ± 0.93 pg/10 mg tej). Los niveles de LH disminuyeron con ambas dosis (Co: 42.2 ± 4.98 , MBC 100: 26.88 ± 4.23 p< 0.05, MBC 500: 29.66 ± 2.34 p< 0.05 ng/ml). En estos animales también disminuyó el peso testicular (Co: 170.64 ± 4.27 , MBC 100: 142.1 ± 5.31 p< 0.001, MBC 500: 124.25 ± 1.94 gr/100 g BW p< 0.001). En ratas de 30 días no hubo cambio en la liberación de Gn-RH (Co: 15.53 ± 1.52 , MBC 100: 13.49 ± 0.91 , MBC 500: 12.64 ± 1.26 pg/10 mg tej). Los niveles de LH (Co: 30.13 ± 3.35 , MBC 100: 89.43 ± 20.16 p< 0.02, MBC 500: 44.33 ± 3.07 ng/ml p< 0.01) y FSH (Co: 72.25 ± 26.89 , MBC 100: 533.75 ± 48.02 p< 0.001, MBC 500: 292.33 ± 92.1 ng/ml p< 0.05) aumentaron con ambas dosis. El peso testicular aumento con la dosis de MBC 100 (Co: 293.8 ± 11.83 , MBC 100: 331.5 ± 9.69 p< 0.025, MBC 500: 314.25 ± 18.34 gr/100 g BW). Conclusión: El 4-MBC inhibe el eje gonadal prepuberal y estimula el peripuberal en ratas macho. La prolactinemia no se ve afectada.

61. (520) EFECTO DE BAJAS DOSIS DE 4-MBC SOBRE EL EJE GONADAL EN RATAS PREPUBERALES Y PERIPUBERALES. CAROU MARIA ELENA, PONZO OSVALDO J.,

CARDOZO GUTIERREZ ROMINA, SZWARCFARB BERTA, CARBONE SILVIA, REYNOSO ROXANA, MOGUILVSKY JAIME A, SCACCHI PABLO

Inst. Fisiología - Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires

El 4-methyl-benzyl-camphor (4-MBC) es un disruptor endocrino (DE) que se utiliza en las pantallas solares. Hemos demostrado, que altas dosis de este disruptor producen alteración del eje gonadal en ratas durante el desarrollo puberal. Objetivo: evaluar el efecto de bajas dosis de 4-MBC, sobre la regulación neuroendócrina gonadal durante el desarrollo puberal, en ratas macho y hembras que estuvieron expuestas a esa droga durante el desarrollo embrionario. Materiales y Métodos: Se utilizaron ratas Wistar macho y hembras de 15 (prepuberales) y 30 (peripuberales) días de edad (n= 8-12 por grupo). El 4-MBC fue administrado a ratas hembra preñadas, en forma sc. en dosis de 20 mg/kg (MBC 20), a partir del primer día de preñez. Las crías de estas ratas fueron sacrificadas a los 15 y 30 días de edad. Los hipotálamos anteromediobasales se incubaron durante 60 minutos en buffer de Earle's, para la determinación de Gn-RH. En el suero obtenido luego de la decapitación, se determinó la concentración de LH, FSH y prolactina. Resultados: En ratas hembra prepuberales no se observó cambios significativos en la liberación de GnRH, ni en los niveles plasmáticos de LH y prolactina. Tampoco se produjeron cambios significativos de GnRH, LH, FSH y prolactina en los machos de esa edad. Por otra parte, en ratas peripuberales solo se observó un aumento significativo de LH plasmático en machos (Control: 8.5 ± 1.02 , 20 MBC: 26.1 ± 5.99 ng/ml p< 0.02) y una reducción de FSH plasmática en hembras (Control: 370 ± 30.47 , 20 MBC: 179 ± 30.51 ng/ml p< 0.005). Conclusión: Contrariamente a lo descrito con altas dosis de 4-MBC, bajas dosis de este disruptor solo provocan cambios gonadotróficos en ratas peripuberales y no altera el eje a los 15 días de edad. En forma similar a lo observado en ratas con altas dosis del DE, bajas dosis de 4-MBC no alteran los niveles circulantes de prolactina en ratas de ambos sexos y edades.

62. (533) ESTRES OXIDATIVO (EO) EN RATAS CON INSULINORRESISTENCIA (IR) INDUCIDA POR DIETA RICA EN FRUCTOSA. REBOLLEDO OSCAR R, MARRA CARLOS A, RASCHIA AGUSTINA, RODRÍGUEZ SEBASTIÁN, GAGLIARDINO JUAN J

CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, UNLP-CONICET), Centro Colaborador (OPS/OMS) INIBIOLP - Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (UNLP-CONICET)

Previamente demostramos que la administración de dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce IR y aumento de marcadores de estrés oxidativo (EO) en distintos tejidos. Se ha sugerido que la liberación de diferentes componentes del tejido adiposo (TA) contribuiría al desarrollo de la IR y el EO. Objetivo: evaluar marcadores de EO y los cambios en la composición lipídica del TA de ratas con IR inducida por DRF. Material y Métodos: alimentamos ratas Wistar normales durante 3 semanas con dieta comercial sin y con el agregado de fructosa al 10% en el agua de bebida (DC y DRF). En ambos grupos medimos glucemia (G), triglicéridos (TG) e insulinemia (I) y en grasa abdominal la actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CT), glutatión peroxidasa, (GSH-Px), glutatión total (GSH), antioxidantes liposolubles (α -tocoferol (α -TC), β -caroteno (β -CT), TBARS y composición de ácidos grasos de TG (técnicas colorimétricas, cinéticas y HPLC). Resultados: las diferencias entre DC vs. DRF en mmol/l (otras unidades indicadas en paréntesis) y con p< 0.02, fueron: G: 7.2 ± 0.27 vs. 8.3 ± 0.23 ; TG: 0.76 ± 0.08 vs. 1.30 ± 0.07 ; I (ng/ml): 2.7 ± 0.5 vs. 4.7 ± 0.6 ; TBARS (nmol/mg): 243.4 ± 12.2 vs. 378.9 ± 31.9 ; (U/mg) SOD: 5.68 ± 0.29 vs. 3.44 ± 0.17 ; CT: 0.09 ± 0.01 vs. 0.13 ± 0.01 ; GSH-Px: 2.87 ± 0.08 vs. 1.62 ± 0.06 ; (μ g/g) α -TC ($\times 102$): 3.31 ± 0.06 vs. 2.88 ± 0.02 ; β -CT: 0.89 ± 0.02 vs. 0.56 ± 0.03 ; GSH (nmol/g): 88.7 ± 3.43 vs. 63.9 ± 1.87 ; (mol %),

Σ PUFAs: 38,1±0,9 vs. 35,0±0,8 y SSat/SPUFA: 1,19±0,05 vs. 1,49±0,04. Conclusiones: La DRF induce en el TA un estado prooxidativo que contribuiría al desarrollo de la IR favoreciendo la aparición ulterior de fallo de células β. En consecuencia su control terapéutico apropiado representaría una estrategia de prevención y tratamiento de la diabetes tipo 2.

63. (573) EFECTO DEL PENTADECAPÉPTIDO DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A LA NEOGENESIS INSULAR (INGAP-PP) SOBRE LA MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN INSULAR EN HAMSTERS NORMALES. MADRID VIVIANA, DEL ZOTTO HÉCTOR, MAIZTEGUI BÁRBARA, BORELLI MARÍA INÉS, ALZUGARAY MARÍA EUGENIA, GAGLIARDINO JUAN JOSÉ

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)

Objetivo: estudiar el efecto de la administración de INGAP-PP, pentadecapéptido biológicamente activo de la proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP) a hamsters normales sobre la morfología de sus islotes pancreáticos y su homeostasis metabólica. Metodología: Inyectamos durante 10 días INGAP-PP (500 µg/día i.p. en dos dosis diarias) (T) o solución salina (C) a hamsters normales. Al sacrificarlos determinamos su peso corporal, glucemia (G), trigliceridemia (TG) e insulinemia (I); luego extrajimos el páncreas total para cuantificar los cambios morfológicos ocurridos (inmunocitoquímica y morfometría) y aislar islotes (digestión con colagenasa). Incubamos los islotes con diferentes concentraciones de glucosa midiéndose su contenido de ADN y la secreción de insulina (RIA). Resultados: No hubo diferencias significativas (T vs. C) en peso corporal (109±5 vs. 109±7 g), la G (96±4 vs. 91±4 mg/dl), los TG (204±12 vs. 171±33 mg/dl) y la I (4±1 vs. 2±0.3 ng/ml), ni en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. En cambio los hamsters T mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) de su masa de células β (6.6±0.04 vs. 4.1±0.7 mg), del número de islotes/µ2 (2.8±0.3 vs. 2.1±0.2 x106/µ2) y de células β extrainsulares (2.3±0.5 vs. 1.35±0.3x106/µ2), del porcentaje de islotes en contacto con conductos (77.±11 vs. 50±3.3%) y del índice de replicación de células β (3.0±0.5 vs. 1.7±0.3%). En los hamsters T disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el tamaño insular (6800±692 vs. 8083±785 µ2), el contenido de ADN insular (0.07±0.002 vs. 0.1±0.01) y el número de células INGAP+ (130±62 vs. 589±123/10 campos, x400). Conclusión: El INGAP-PP induce un aumento de la masa de células β a través de un incremento simultáneo de su índice de replicación y de neogénesis y una retroalimentación negativa en las células INGAP+ endógenas. Las nuevas células β mantendrían intacto su mecanismo de regulación de la secreción de insulina ya que no afectan la homeostasis metabólica.

64. (590) EXPRESION Y ACTIVIDAD DE LA GLUQUINASA INSULAR EN RATAS CON INSULINORRESISTENCIA. MAIZTEGUI BARBARA, BORELLI MARÍA INÉS, GAGLIARDINO JUAN JOSÉ

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA)

La administración de dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce insulinorresistencia, aumento de la actividad de glucoquinasa (GQ) insular, de la producción de CO₂, y de la secreción de insulina in vitro en respuesta a la glucosa. Objetivo: Estudiar la correlación entre actividad, transcripción y expresión de hexoquinasa (HQ) y GQ en islotes aislados de ratas alimentadas con DRF. Metodología: Alimentamos ratas Wistar macho normales durante 3 semanas con dieta comercial (C) sin o con el agregado de fructosa al 10% en el agua de bebida (F). Al sacrificio medimos las glucemias (G), trigliceridemias (TG) e insulinemias y removimos el páncreas para aislar islotes (colagenasa). Cuantificamos la expresión de HQ y GQ insular mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos y la transcripción midiendo ARNm de ambas enzimas (RT-PCR). Cuantificamos la densi-

dad de las bandas utilizando una cámara digital y software Kodak 1D. Resultados: (F vs.C). Las G fueron similares en ambos grupos (132 ± 3 vs. 131 ± 4 mg/dl); las ratas F tuvieron TG (159 ± 5 vs. 98 ± 4 mg/dl, $p < 0.001$) e insulinemias (1.15 ± 0.07 vs. 0.77 ± 0.05 ng/ml, $p < 0.001$) significativamente mayores. La expresión de GQ aumentó en F, manteniéndose sin cambios la de HQ: (GQ % incremento sobre C (F/C): 138 ± 22; HQ 99 ± 11). Los valores de ARNm de HQ y GQ fueron similares en ambos grupos (% sobre tubulina [GQ/T]): 25 ± 1 vs. 24 ± 2; % HQ/T: 27 ± 5 vs. 29 ± 3). Conclusiones: Dado que los cambios registrados en la actividad y en la expresión de la GQ no se correlacionaron con los ocurridos a nivel del ARNm, el aumento de la actividad de GQ sería consecuencia de cambios adaptativos post-transcripcionales en respuesta a la insulinorresistencia inducida por la DRF. El fracaso de esta adaptación sería parte de la patogenia de la diabetes tipo 2.

65. (593) EFECTO DE DIFERENTES PROTOCOLOS EN LA DIFERENCIACION DE CELULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATON A CELULAS PRODUCTORAS DE INSULINA. FRANCINI FLAVIO, NAUJOK ORTWIN, JOERNS ANNE, LENZEN SIGURD

CENEXA Instituto de Bioquímica Clínica, Hanover-Alemania

El objetivo del trabajo fue comparar el efecto de diferentes protocolos de diferenciación sobre la expresión génica y morfología de células madre embrionarias (CME) de ratón. Se diferenciaron CME, según 4 protocolos. La expresión génica se midió por real-time PCR y la morfología mediante microscopía electrónica (ME). Nuestros resultados muestran que CME diferenciadas en 1) medio sin suero fetal bovino (SFB) expresan marcadores génicos de diferenciación endocrina. ME: 20% de células diferenciadas, con alto grado de apoptosis (30-40%). 2) 5% SFB en el medio en el estadio de diferenciación, disminuyó la expresión de insulina 50%, igual que glucagón y somatostatina ($p < 0.05$). La expresión de Glut-2 (199%), Sur-1 (215%), Kir6.2 (149%), Nestina (319%) y Nkx6.1 (206%) aumentó respecto al protocolo de referencia ($p < 0.01$). ME: aumento de células con características endocrinas y elevado grado de diferenciación (40-60%) y niveles de apoptosis constantes. 3) La omisión del paso de selección de células nestina positivas, normalizó la expresión de insulina (114%) y aumentó significativamente ($p < 0.05$) otros genes marcadores (Glut-2 196%, Sur1 148%, Kir6.2 145%), ME: alto grado de diferenciación celular (40%). 4) En suspensión, la expresión de marcadores endocrinos disminuyó significativamente (Insulina 28%, glucagon no determinable, somatostatina 17%, Glut-2 86%, Sur1 66% Kir6.2 37%, nestina 23% y Nkx6.1 37%, $p < 0.01$). Sólo la expresión de Oct-4 (276%) y Eras (300%) (marcadores de CME) aumentó ($p < 0.001$). ME: fenotipo embrionario con poca diferenciación (0-5%). En conclusión las condiciones de cultivo afectan la diferenciación de CME a células productoras de insulina. Se estableció un protocolo que induce la expresión de insulina y otros marcadores génicos beta específicos en células con morfología similar a célula beta, y al mismo tiempo reduce la apoptosis. Estas células representan una fuente potencial de insulina para la terapia de reemplazo en diabetes.

GENÉTICA II

66. (349) HALLAZGOS INÉDITOS DE LA BIOTINIDASA PLASMÁTICA COMO MARCADOR SECUNDARIO EN LA GLUCOGENOSIS TIPO IA. POSIBLE EXPANSIÓN A OTRA GLUCOGENOSIS HEPÁTICA. ANGARONI CELIA JUANA, PASCHINI DE CAPRA ANA, GINER DE AYALA ALICIA, GUELBERT NORBERTO, BAY LUISA, ARGARAÑA CARLOS ENRIQUE, DODELSON DE KREMER RAQUEL

Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas, CEMECO. Hospital de Niños de Córdoba; Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; Centro de Errores Congénitos

del Metabolismo, Hospital Nacional de Pediatría J.P. Garrahan CIQUIBIC-CONICET; Facultad de Ciencias Químicas, UNC

La Glucogenosis Tipo Ia (Gg-Ia) es una patología genética producida por la deficiencia de glucosa-6-fosfatasa y es la única enfermedad descrita que cursa con incremento de Biotinidasa Plasmática (BP). Aunque en un número reducido de pacientes, no se demostró una actividad anómala de esta enzima en otras Glucogenosis Hepáticas (GH) como Gg-Ib, Gg-III, Gg-IX. Las bases fisiopatológicas del incremento de BP aún no se ha elucidado. El objetivo de este trabajo es comunicar aspectos relacionados y otros previamente no descritos en la literatura sobre este biomarcador secundario. Se determinó la BP en 60 controles normales, 24 pacientes con diagnóstico preciso de GH (14 Gg-Ia, 1 Gg-Ib, 4 Gg-III, 1 Gg-VI, 4 Gg-IX) y 2 pacientes varones con diagnóstico presuntivo de GH. En estos últimos probandos, se realizó el estudio del gen glucosa-6-fosfatasa por análisis de secuencia de nucleótidos. En CEMECO, se definió molecularmente 13 pacientes con Gg-Ia (genotipo completo), todos ellos presentaron aumento de BP (rango patológico: 15-32 nmol/min/ml, valor normal: 9,08±2,20 nmol/min/ml) excepto 1 de ellos que tuvo BP normal. En 2 pacientes varones, con fenotipo clínico y bioquímico compatible con Gg-IX, se demostró un incremento de la BP (17,3 y 19,6 nmol/min/ml, respectivamente), este hallazgo inusual condujo al análisis molecular del gen responsable de la Gg-Ia, no encontrándose variación en la secuencia de nucleótidos del gen glucosa-6-fosfatasa. Si bien los valores de BP encontrados en nuestros pacientes con otras GH (Gg-Ib, Gg-III, Gg-VI y Gg-IX) estuvieron dentro del rango normal, coincidente con la escasa bibliografía foránea, se proyecta estudiar el gen de la fosforilasa quinasa (responsable de la Gg-IX) en estos dos pacientes. En conclusión, este es el primer trabajo en donde se evidencia que el aumento de BP no se restringe a la variante de Gg-Ia y por otra parte que no todas las Gg-Ia cursan con incremento de este biomarcador.

- 67. (439) VARIABILIDAD CLÍNICA, BIOQUÍMICA Y GENOTÍPICA DE PACIENTES ARGENTINOS CON DEFICIENCIA DE HIPOXANTINA FOSFORIBOSILTRANSFERASA. LARÓVERE LAURA E (1), FAIRBANKS LYNETTE (2), O'NEILL J PATRICK (3), GUELBERT NORBERTO(1), CZORNYJ LILIANA (4), PALACIO CLAUDIO (5), DODELSON DE KREMER RAQUEL (1)**

Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas, Hospital de Niños, Cát. Clínica Pediátrica, Fac. Cs. Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (1), Purine Research Unit, Guy's Hospital, London, Uk (2), Department of Pediatrics, University of Vermont, USA (3), Servicio de Neurología, Hospital Garrahan, Bs. As. (4), Servicio de Neurología, Hospital Infantil, Córdoba (5)

La deficiencia de hipoxantina fosforibosiltransferasa (d-HPRT) es un error genético en el metabolismo de las purinas responsable de la Enfermedad de Lesch-Nyhan (ELN) y sus variantes (VLN), caracterizadas por hiperuricemia combinada o no a manifestaciones neurológicas. La d-HPRT es una entidad con herencia ligada al cromosoma X. Objetivo: Comunicar el reconocimiento de la casuística y destacar la variabilidad clínica, bioquímica y genotípica en pacientes argentinos con d-HPRT. Pacientes: 5 varones (4 familias) con ELN y 6 (2 familias) con VLN. Métodos: determinación de metabolitos de purinas (orina, plasma, LCR) y determinación de HPRT (eritrocitos lisados) por cromatografía líquida; análisis molecular por PCR, digestión con enzimas de restricción y secuenciamiento. Resultados: Ambos grupos de pacientes presentaron concentraciones elevadas de los metabolitos marcadores del defecto enzimático en fluidos biológicos: ácido úrico, hipoxantina y xantina, y una actividad de la enzima HPRT < 1 nmol/h/mg Hb (normal: 83-150). El análisis molecular demostró en Grupo ELN: paciente 1, mutación novel c.203T> C; paciente 2, mutación "de novo" c.209G> A; pacientes 3 y 4, IVS8+6t> g; paciente 5, 212dupG y en Grupo VLN: mutación novel c.584A>

C en una familia y c.143G> A en la otra. Conclusiones: La casuística presentada señala el reconocimiento de d-HPRT con fenotipo clásico y variante neurológica en Argentina. Reafirma que la actividad HPRT en eritrocitos lisados no se correlaciona con la variabilidad fenotípica de los pacientes. Respecto a los defectos moleculares, cada familia presentó una mutación privativa, y aunque el análisis molecular no predice la severidad de la enfermedad, es una herramienta importante para la identificación de portadoras y de nuevos casos en una familia afectada.

- 68. (340) SORDERAS NEUROSENSORIALES OTOTÓXICAS SINDRÓMICAS Y NO SINDRÓMICAS. CHAIG MARÍA ROSA (1), SORIA NÉSTOR (1), ROMERO ORELLANO FERNANDO (2), ROMERO MORONI FERNANDO (3), GEREZ DE BURGOS NELIA (1)**

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, FCM, Universidad Nacional de Córdoba (1), Hospital de Niños de Córdoba (2), Hospital de Clínicas FCM UNC (3)

Las sorderas neurosensoriales (NS) se presentan en el 70% de los casos como un síntoma aislado y se denominan sorderas NS no sindrómicas, mientras que el 30% restante acompañan a un síndrome. Si las sorderas son de origen genético pueden ser clasificadas en: somáticas o nucleares (nDNA) y mitocondriales (mtDNA). Nuestro objetivo es realizar un estudio epidemiológico de sorderas NS de origen genético mitocondrial sindrómicas y no sindrómicas. Las mutaciones más frecuentes en el mtDNA descritas en la literatura, como causa de sorderas NS, son las siguientes, en el gen que transcribe al rRNA 12S: mutaciones A1555G, T1494C; ins C o del 961; T1095C; en el gen que transcribe al tRNA ser (UCN): mutaciones: A7443G; G7444A; A7445G; A7511G; ins. C 7472; y en el gen que transcribe al tRNA leu (UUR): mutación A3243G. Se estudiaron 70 individuos con sordera NS y 65 controles; para los estudios moleculares se amplificó el DNA con "primers" específicos y enzimas de restricción adecuadas. Se obtuvieron los siguientes resultados: La mutación G7444A en dos niñas no emparentadas entre sí; la mutación A1557C en dos niñas emparentadas (esta mutación no está descrita en la literatura), y en otra niña, sin relación de parentesco con las anteriores, se detectaron las mutaciones A1557C y A1555G. En todos los casos la presentación es homoplásmica, se transmite por línea materna; y la manifestación de la sordera NS fue posterior a la administración de antibióticos aminoglicósidos (ATB-AG), es decir ototóxicas. Cabe destacar que la mutación G7444A posiblemente sea sindrómica, como una nueva expresión clínica de esta mutación. Estos resultados indica la importancia de realizar "screening" poblacional de estas mutaciones, a fin de prevenir o retrasar la aparición de sordera NS posterior a la administración de ATB-AG, como así también la posibilidad de realizar tratamiento para atenuar o retrasar signos y síntomas de citopatía mitocondrial.

- 69. (382) APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE TRÍADAS PARA EL ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE GENES DE RIESGO Y DEFECTOS DE CIERRE DEL TUBO NEURAL (DCTN). BUZZALINO NOEMÍ DELIA, CORTESE RENÉ, BRONBERG RUBÉN, GOLDSCHMIDT ERNESTO, MERCADO GRACIELA, LIASCOVICH ROSA, DAIN LILIANA**

Centro Nacional de Genética Médica Servicio de Genética, Hospital Fernández

Diferentes genes candidatos han sido estudiados para comprender el origen de los DCTN. Resultados previos de nuestro grupo en los que se compararon las frecuencias de variantes genéticas entre casos y controles, indicaron que la metilente-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) 677TT se asocia con la ocurrencia de DCTN. Sin embargo, no se puede descartar que dichos hallazgos pudieran estar afectados por diferencias en la estratificación poblacional. El objetivo de este trabajo fue estudiar la asociación entre 4 variantes genéticas y la ocurrencia de DCTN, mediante la prueba de desequilibrio de transmisión (Transmission

Disequilibrium Test, TDT). Esta metodología se basa en el estudio de tríadas y considera a los padres de los afectados como pseudocontroles. La genotipificación se realizó por PCR de las zonas de interés y posterior digestión con enzimas de restricción. Se analizaron 73 tríadas (afectado (AF), madre (M) y padre (P)) y 19 díadas (AF y M) para las variantes genéticas MTHFR C677T; MTHFR A1298C, inserción de 68 pb del gen cistationina-beta sintetasa y metionina reductasa A66G. El análisis del TDT mostró que ninguna de las variantes genéticas estudiadas se apartan de las frecuencias esperadas según la segregación mendeliana ($p=0,529$; $p=0,655$; $p=0,532$; $p=0,529$, respectivamente). Estos resultados se contradicen con la asociación previamente hallada para la variante MTHFR 677. Sin embargo, dado que se sugiere que el factor de riesgo sería el genotipo TT y no el alelo T, el TDT fue reanalizado sólo para aquellas familias cuyos genotipos paternos pudieran dar descendencia homocigota TT (Shields y col., 1999). Este nuevo análisis tampoco mostró diferencias significativas ($p=0,330$) en la segregación de los alelos MTHFR 677 T y C. Estos resultados estarían indicando que las variantes analizadas no constituyen factores de riesgo en nuestra población. Es necesario un futuro análisis con un mayor número de familias a fin de confirmar estos hallazgos.

70. (446) POLIMORFISMOS 677C>T Y 1298A>C DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA Y 844INS68 DEL GEN DE LA CISTATIONINA B-SINTASA. EFECTOS SOBRE LA HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA EN UN GRUPO POBLACIONAL ARGENTINO. GROSSO CAROLA LUCRECIA, DODELSON DE KREMER RAQUEL

Centro de Estudio de las Metabopatías Congénitas, CEMECO. Hospital de Niños de Córdoba, Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

La hiperhomocisteinemia moderada (HHCM) es un factor de riesgo independiente para una variedad de enfermedades vasculares. Estudios familiares demostraron que la heredabilidad de la HHCM es aproximadamente del 40%. La sustitución 677C>T es un polimorfismo frecuente en el gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y constituye la determinante genética más importante de HHCM. Otras variantes funcionales en genes que codifican enzimas claves del metabolismo de la homocisteína (Hci) son la 1298A>C de la MTHFR y la 844ins68 de la Cistationina β sintasa (CBS), entre otras. El impacto de estos polimorfismos en conjunto sobre los niveles de Hci ha sido poco estudiado y en Argentina no hay registro de estudios previos sobre el tema. Objetivos y métodos: Determinar la prevalencia de los genotipos 677C>T, 1298A>C de la MTHFR y la 844ins68 de la CBS por PCR, en un grupo poblacional normal ($n=100$) y correlacionar el efecto de estos polimorfismos, individualmente o en combinación, sobre los niveles de Hci basal y post L-Met (PM), determinada por HPLC. Resultados: Los valores de Hci ($\mu\text{mol/L}$) basal y PM en nuestro estudio fueron de $9,7\pm 5,3$ (media \pm DE) y $28,1\pm 11,0$, respectivamente. Las frecuencias genotípicas de la 677T/T y 1298C/C MTHFR y 844ins68/WT CBS fueron 11,6%, 6,4% y 10,5%, respectivamente. El genotipo 677TT está asociado a niveles incrementados de Hci en ayunas, comparado con el genotipo CC ($p < 0,05$); no se observó correlación entre el genotipo y la homocisteinemia PM ($p=0,40$). Los genotipos 1298AC, 1298CC, 677CT/1298AC MTHFR y 844ins68/WT CBS no se asociaron a niveles elevados de Hci basal y PM ($p > 0,05$). Conclusión: El grupo control mostró una alta prevalencia de los polimorfismos estudiados, pero sin asociación con HHCM basal y PM. La investigación de las causales de HHCM en condiciones patológicas (estudios de intermediarios y rol de vitaminas dependientes) permitirá la mejor comprensión etiopatogénica de estos procesos multifactoriales.

71. (522) IDENTIFICACIÓN DE PEQUEÑAS MUTACIONES EN EL GEN RB1 Y SU EFECTO SOBRE EL FENOTIPO. REPETTO KARINA, FERNÁNDEZ CECELIA, DALAMÓN VIVIANA, FERREIRO VERÓNICA, SZIJAN IRENE

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facult. Farm. y Bioquim. Hospital de Clínicas. UBA

El retinoblastoma (RB) es la neoplasia maligna más común de la niñez y se produce por la proliferación desmesurada de los retinoblastos, en el período intrauterino o neonatal. El desarrollo de RB requiere dos mutaciones en el locus RB1 (13q14): la primera mutación puede ocurrir en la línea germinal (forma hereditaria) o en el retinoblasto (forma no hereditaria), la segunda mutación es somática en todos los casos. Las mutaciones en el gen RB1 pueden ser: grandes deleciones (20%) o mutaciones pequeñas (80%). El objetivo de este trabajo es el estudio molecular de 24 pacientes con RB para poder determinar las mutaciones responsables de la patología y predecir el riesgo para los familiares. Se analizaron 10 pacientes con RB bilateral y 14 con RB unilateral. Para ello se amplificaron por PCR: la región promotora del gen, los 27 exones y la zona de poliadenilación, los productos se analizaron mediante la técnica de heteroduplex para detectar los que mostraran distinta movilidad electroforética. Los mismos fueron secuenciados para identificar la mutación responsable de la pérdida de funcionalidad de la proteína. Se identificaron dos mutaciones en el exón 4: 41966 del A y 42001 del G con consecuente corrimiento del marco de lectura y aparición prematura de un codón stop. Estas mutaciones no han sido descritas con anterioridad. Las otras 2 mutaciones fueron transiciones C por T, una en el exón 11, 65386 C>T (R358X), y otra en el exón 18, 150037 C>T (R579X). Dicho cambio generaría una alteración en la traducción del codón CGA que codifica para arginina por un codón stop TGA. Estas mutaciones llevarían a una finalización prematura de la traducción que generaría una proteína más corta que ha perdido la región funcional. Por lo tanto se las considera como las mutaciones responsables para la predisposición a la patología, con utilidad en diagnóstico presintomático.

72. (645) DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER: DIAGNOSTICO MOLECULAR DIRECTO. FERREIRO VERÓNICA, GILIBERTO FLORENCIA, SZIJAN IRENE

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Fac. Farm. y Bioquim. Hospital de Clínicas. UBA

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500). Es recesiva, ligada al X, con síntomas clínicos progresivos y de evolución fatal. La distrofia muscular de Becker (DMB) es menos frecuente y más leve. Las DMD/DMB se deben a mutaciones, principalmente grandes deleciones, en el gen de la distrofina (locus Xp21). La diferencia molecular entre las DMD/DMB es la presencia (DMD) o ausencia (DMB) de corrimiento del marco de lectura. Se realizó un estudio molecular directo en 316 pacientes con diagnóstico clínico de la patología y en 7 mujeres portadoras sintomáticas de DMB. La identificación de la deleción en varones se realizó por PCR multiplex, utilizando 4 reacciones cuadruplex para la amplificación de 16 exones. La confirmación de la presencia de una deleción y el análisis de su extensión se realizó por medio de PCR simplex de los exones faltantes y de los contiguos a los mismos. Se verificó la conservación del marco de lectura mediante el análisis de la secuencia resultante luego del empalme de los exones flanqueantes a la deleción. Con este diagrama de trabajo se pudieron no solo confirmar los diagnósticos clínicos de 149 pacientes sino también interpretar las consecuencias fenotípicas de las alteraciones moleculares halladas en 92 de ellos. El estudio de elección para el rastreo de deleciones en mujeres portadoras sintomáticas se basó en el análisis de la segregación de hasta 11 STRs intragénicos, hallándose deleciones en 2 de las 7 mujeres analizadas. Circunstantialmente el estudio de STRs también permitió evidenciar deleciones en varones. Se quiere demostrar la importancia del hallazgo y caracterización de deleciones en pacientes con DMD, con el objeto de conocer la alteración que dio origen al fenotipo patológico, para poder acceder en un futuro a la corrección específica del defecto genético de cada afectado en particular.

- 73. (592) RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO -219 G/T EN EL PROMOTOR DEL GEN APOE, LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR ATROSCLERÓTICA Y LOS NIVELES DE COLESTEROL EN PLASMA, EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN ARGENTINA.** BAÑARES VIRGINIA, QUESADA FABIANA, WYSZINSKI DIEGO, SCHREIER LAURA, TAVELLA JULIO

CNGM ANLIS "Carlos G. Malbrán"; UNLP-CIC Genetics Program, Boston Univ. Med., Boston, Massachusetts, USA Lab. Lípidos y Lipoproteínas, FFyB, UBA INIBIOLP, CONICET

El alelo e4 del gen APOE fue asociado con riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ECA) y con mayores concentraciones de colesterol total (CT) y colesterol de LDL (LDL-c) en plasma, sin embargo algunos estudios no reprodujeron esos resultados. Esta controversia señala que otros factores, genéticos y/o ambientales podrían actuar sobre estas asociaciones. Además de las modificaciones cualitativas de la proteína propias de cada alelo, se podría esperar que variaciones cuantitativas en los niveles de expresión del gen originadas por polimorfismos en el promotor, tal como el -219G/T, tuvieran un rol como factor de riesgo de la enfermedad. Previamente hemos reportado la asociación entre el alelo e4 y la presencia de lesiones ateroscleróticas en varones de nuestra población, en este trabajo investigamos si hay asociación entre el polimorfismo APOE -219G/T, la ECA y los niveles de lípidos en plasma en esa población. Se estudiaron 380 muestras, del banco de ADN para el estudio de factores de riesgo genético de ECA en Buenos Aires, 258 casos con estenosis mayor o igual al 30% y 122 controles con angiografía normal. Los genotipos se obtuvieron con PCR y RFLP. El test de Chi cuadrado mostró diferencias no significativas en la presencia/ausencia del alelo G entre casos y controles, aún después de estratificar por sexo y por edad. El test de ANOVA mostró diferencias significativas en los valores medios de colesterol total (220 ± 50.79 y 198 ± 50.75) ($p=0.001$) y colesterol de LDL (144 ± 46.97 y 128 ± 42.17) ($p=0.015$) para los portadores del alelo G respecto de los no portadores del mismo. Estos resultados señalan que el alelo G del polimorfismo -219 del gen APOE se asocia con valores mayores de CT y LDL-c pero que no actuaría como un factor de riesgo de ECA en nuestra población.

INFECTOLOGÍA I

- 74. (328) EFECTO DEL TRYPANOSOMA CRUZI (T. CRUZI) SOBRE LA REPLICACIÓN DEL HIV-1 EN MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS (MDM).** ANDREANI GUADALUPE (1), CELENTANO ANA MARÍA (2), SOLANA MARÍA ELISA (2), MARTÍNEZ PERALTA LILIANA (1), DOLCINI GUILLERMINA (1)

Centro Nacional de Referencia para el SIDA-Dpto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Fac. de Medicina, UBA (1), Lab. de Parasitología-Dpto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Fac. de Medicina, UBA (2)

Introducción: Los monocitos de sangre periférica y macrófagos tisulares juegan roles fundamentales en la historia natural de la infección y en la patogenia de HIV-1. Estas células son blanco de la infección por T. cruzi y activadas, ejercen el control de la multiplicación parasitaria. Datos de la literatura sugieren que la interacción potencia la replicación de ambos patógenos en algunos pacientes coinfectados; sin embargo, no existen ensayos de coinfección in vitro que analicen si este fenómeno se debe a algún aspecto de disfunción inmunológica secundaria a la coinfección. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de T. cruzi sobre la replicación de HIV-1 en un modelo de coinfección in vitro en MDM. Métodos: Se empleó la cepa VD de T. cruzi: a) tripomastigotes sanguíneos (tripS), b) tripomastigotes de cultivo (tripC) (células Vero), c) sobrenadante de 24hs de tripomastigotes (ST). Se realizaron coinfecciones en MDM con pseudotipos de

HIV-1 conteniendo el gen reportero de la luciferasa y con el stock viral Bal, evaluando respectivamente la transcripción viral por actividad luciferasa y la replicación viral por producción de antígeno (Ag) p24. Para evaluar la viabilidad de los MDM se midió la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. Resultados: Tanto los tripS como los tripC disminuyen significativamente la actividad transcripcional del HIV-1 y los niveles de Ag p24 ($p < 0.05$). El ST tiene un efecto similar, pero en menor medida que la infección por el parásito, dependiendo del dador de MDM y del lote de ST utilizado. Conclusiones: Estos ensayos muestran por primera vez el efecto inhibitorio de T. cruzi sobre la replicación HIV-1, en este modelo de coinfección in vitro. Experimentos en curso intentan esclarecer los mecanismos involucrados en este fenómeno.

- 75. (141) EQUIVALENCIA ENTRE LA VACUNA A VIRUS JUNIN VIVO ATENUADO CANDID #1 PRODUCIDA EN LA ARGENTINA Y LA PRODUCIDA EN LOS ESTADOS UNIDOS.** ENRIA DELIA, BRIGGILER ANA, FEUILLADE MARIA, CRIVELLI ELEONORA, AMBROSIO ANA,

Grupo Estudio Vacuna Candid #1 INEVH "J. Maiztegui Hospital San José de Pergamino

Candid # 1 es la primera vacuna eficaz contra un arenavirus. Lograda su producción nacional, se necesitó incorporarla en un ensayo puente para cumplir con los requisitos regulatorios. Se realizó un estudio clínico en 946 voluntarios humanos sanos, de entre 15 y 65 años de edad, de ambos sexos, a riesgo de adquirir fiebre hemorrágica argentina (FHA), aleatorio, a doble ciego, para evaluar la equivalencia entre la vacuna Candid # 1 producida en la Argentina (A) y la producida en los Estados Unidos (E). Como punto final primario se evaluó la eficacia utilizando como marcador subrogante a la inmunogenicidad medida por detección de anticuerpos neutralizantes. Como punto final secundario se evaluó la seguridad de la vacuna comparando las tasas de reacciones adversas. Ambas vacunas mostraron una tasa equivalente de seroconversión ($A = 97\%$, $E = 99\%$; $p > 0,05$), ligeramente superior a la eficacia estimada para Candid # 1 en estudios previos, que es del 95,5%. No se observaron eventos adversos serios relacionados con la vacuna. Los eventos adversos generales considerados relacionados fueron de escasa significación clínica; se presentaron en los receptores de ambas vacunas en tasas equivalentes (29,9% para A y 35,0% para E; $p > 0,05$), e incluyeron: cefaleas, decaimiento, mialgias, náuseas y/o vómitos, fiebre, dolor retro-ocular, mareos, lumbalgia, exantema, leucopenia < 4000 blancos /mm³, plaquetopenia < 150000 plaquetas/mm³ y microhematuria. Las reacciones locales en el sitio de inoculación fueron también de escasa significación clínica y se observaron en tasas equivalentes (13% para A y 15% para E; $p > 0,05$). Estos resultados indican que la vacuna Candid # 1 elaborada en Argentina es equivalente a la vacuna producida en los Estados Unidos. Con cantidades suficientes de vacuna nacional como para proteger a toda la población a riesgo de adquirir FHA se podrá lograr el control definitivo de esta endemia

- 76. (314) RECOMBINACIÓN GENÉTICA DE HBV: COEXISTENCIA DE DIFERENTES MOSAICOS GENÉTICOS INTER-GENOTIPO A-D EN UN PACIENTE COINFECTADO CON HIV-1.** MORETTI FRANCO, LAUFER NATALIA, BOUZAS MARÍA BELÉN, SALOMÓN HORACIO, QUARLERI JORGE

Centro Nacional de Referencia para el Sida Hospital Fernández, Unidad de Enfermedades Infecciosas Hospital Muñiz, Unidad de Virología

Objetivo: La recombinación inter-genotípica del virus de la hepatitis B (HBV) es pilar fundamental de su diversidad genética. Profundizando en la caracterización genómica del HBV en el escenario de la coinfección con HIV-1, se persigue estudiar la heterogeneidad de cuasiespecies del HBV, con énfasis en la detección de variantes recombinantes. Métodos: Paciente (36 años,

masculino) con infecciones crónicas por HIV y HBV, con: HBsAg y HBeAg (+), anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs (-). Carga viral de HBV: 4,45 log. Tres años de tratamiento con lamivudina. Desde suero se amplificó por PCR, un fragmento del gen S (nt 203-787), que fue clonado (pGEM-T Easy Vector), secuenciando bidireccionalmente en forma automática 16 clones. Se estudiaron las relaciones filogenéticas empleando métodos de distancia (neighbor-joining) y, los eventos de recombinación intergenotípica (SimPlot v 2.5). Resultados: En la población de HBV coexisten los genotipos A, D, y formas recombinantes A-D. Éstas mostraron un mosaicismos genético diferente: (i) A-D; (ii) D-A; y (iii) D-A-D-A en el segmento genómico estudiado y sostenidos por el análisis filogenético parcial correspondiente a cada uno de los segmentos implicados. Estas diferencias no tuvieron impacto en la constitución aminoácida inferida del determinante mayor "a". Conclusiones: Por vez primera se describe en Latinoamérica la presencia de cepas de HBV con evidencia genómica de recombinación inter-genotípica A-D en un contexto de concomitante presencia de infección mixta por dichos genotipos. La recombinación del HBV exhibe diferente mosaicismos genético entre las cepas halladas en el paciente, sin correlación de cambios antigénicos del determinante mayor "a". Estos hallazgos contribuyen a sustentar el switch genotípico F - A del HBV en pacientes coinfectados con HIV-1 y, al conocimiento de la epidemiología molecular del HBV en Argentina.

77. (342) ANÁLISIS GENÓMICO DE LA REGIÓN PRECORE-CORE DEL HBV EN PACIENTES COINFECTADOS CON HIV-1. CASSINO LUCILA, MORETTI FRANCO, LAUFER NATALIA, BOUZAS MARÍA BELEN, SALOMÓN HORACIO, QUARLERI JORGE

Centro Nacional de Referencia para el Sida Hospital Fernandez, Unidad de Enfermedades Infecciosas Hospital Muñiz, Unidad de Virología

Introducción: En la región genómica preC-C del virus de hepatitis B (HBV) se han descrito mutaciones que pueden afectar elementos reguladores. Aunque no es posible deducir el efecto de éstas en la replicación viral y fitness, se procura relacionarlas y evaluar el impacto en la región ϵ de encapsidación. Materiales y métodos: Entre 246 pacientes infectados con HIV-1 y expuestos al HBV, desde suero de 13 de ellos [HBeAg (+), DNA viral detectable], se amplificó por PCR un fragmento genómico del marco preC-C (nt 1629-2026) que fue secuenciado en modo directo y bidireccional. Desde allí, se establecieron las relaciones filogenéticas basadas en distancia (neighbor-joining). Por inferencia del RNA, se realizó la evaluación de la estructura secundaria del fragmento genómico correspondiente a la señal de encapsidación epsilon (Mfold 3.2). Resultados: El análisis comparativo entre las secuencias nucleotídicas preC-C, evidenció un alto grado de homología (desde 93.5 a 100%). El análisis filogenético se correlacionó en modo completo con el hallado para la región preS-S, siendo 12/13 pertenecientes al genotipo A del HBV y el restante, al genotipo D. Entre los primeros, sólo uno de ellos (ARG159018) mostró la presencia de las mutaciones G1809T, C1812T, G1862 T, G1888A, A1984G y C1999A. La eficiencia de replicación viral del HBV fue alta (carga viral plasmática -log-: 6,71 a > 7,6) para las cepas salvajes, en tanto que la mutada mostró menor nivel (4,45). Irrespective de ello, el análisis de su estructura secundaria evidenció máxima del RNA pregenómico para la señal de encapsidación epsilon conservación. Conclusión: En aislamientos de HBV de pacientes con hepatitis crónica, y replicación viral activa, la presencia de mutaciones fue baja. Aún sin afectar la producción de HBeAg, todas las mutaciones halladas -ante la ausencia de otras asociadas a resistencia- afectaron negativamente el fitness del HBV.

78. (185) ESTUDIO DE LAS MITOCONDRIAS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO COMO MARCADORES DE EVOLUCIÓN DE LA MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA. LO PRESTI SILVINA, BÁEZ ALEJANDRA, GUZMÁN GUSTAVO,

RIVAROLA HÉCTOR WALTER, PONS PATRICIA, FRETES RICARDO, PAGLINI PATRICIA

Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba; Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba; Cátedra de Histología, Embriología y Genética. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

Se ha demostrado que la infección con *T. cruzi* produce alteraciones estructurales y funcionales en las mitocondrias del corazón, órgano altamente dependiente de la energía que éstas producen, de diferente magnitud de acuerdo a la etapa de la infección y a la cepa que infectó al huésped. Además se ha postulado, en otras cardiopatías, que las alteraciones mitocondriales del músculo cardíaco serían acompañadas de daños similares en la misma organela del músculo esquelético. Si esto fuera así, la biopsia de músculo esquelético permitiría, de manera relativamente sencilla, inferir sobre lo que ocurre en el miocardio y tener así un marcador de evolución de la cardiopatía. Por ello estudiamos la estructura mitocondrial en corazones y músculo esquelético de la pata trasera de ratones albinos suizos infectados con 5000 tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen (TUL n: 10) y aislamiento SGO Z12 (n: 10) a los 10 días post infección (dpi). Los cortes fueron procesados y fijados como de rutina estudiándose en microscopio electrónico Zeiss con magnificación de 10.000 y 27.800 X. En miocardio se observaron crestas mitocondriales desorganizadas, poco definidas, dilatadas y presencia de cisternas en TUL en un 10% de los cortes. El músculo esquelético presentó crestas y cisternas dilatadas en un 60% de los cortes. Las mismas alteraciones pero menos frecuentes fueron halladas en SGO Z12 (p < 0.05). Estos resultados demuestran que desde el inicio de la infección comienzan las alteraciones mitocondriales tanto en miocardio como en músculo esquelético, que la frecuencia de las mismas dependen de la cepa del parásito y serían una herramienta de diagnóstico clínico para determinar de manera sencilla la evolución de la miocardiopatía.

79. (73) PRIMAINFECCIÓN ORAL EXPERIMENTAL POR EL VIRUS HERPES SIMPLEX-1: COMPROMISO DEL PARÉNQUIMA HEPÁTICO. GONZALEZ MARÍA INÉS, SANJUAN NORBERTO

Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, UBA

La comprensión de la patogenia de la primoinfección bucal por el virus Herpes simplex-1 (HSV-1) importa, por cuanto es una de las virosis más observadas en las prácticas médica y odontológica. Es sabido que luego de la primoinfección bucal el virus avanza por vías neurales. No obstante, se desconoce el destino de los virus que son deglutidos durante la primoinfección o en cada una de las recurrencias observables en pacientes inmunocompetentes. En este trabajo se estudió este punto en un modelo experimental desarrollado en el ratón. Se inocularon por vía oral 25 ratones Balb/c menores de una semana de edad con un tip adosado a una micropipeta, cada uno con 5.000 ufp de HSV-1. Un grupo control de 10 animales recibió sólo el sobrenadante de cultivos celulares no infectados. Se realizó un seguimiento clínico diario y se sacrificaron los animales que presentaron síntomas en estado pre-mortem. Se realizaron necropsias completas y en los cortes histológicos se detectó la presencia de antígenos de HSV-1 por inmunoperoxidasa y la presencia de virus en sangre por adsorción en monocapas de células Vero. En el 76% de los animales (19/25) la infección fue mortal. En 14/19 (73,68%) ratones enfermos se observó inmunomarcación positiva difusa en los núcleos de los hepatocitos, acompañada por degeneración ballooniforme, sin cambios histoarquitecturales. Se detectó viremia entre las 48 y las 96 post-infección. Los animales empleados como control no presentaron síntomas ni lesiones similares a las descriptas en los inoculados con HSV-1. Se concluye que la primoinfección experimental de ratones por vía oral con HSV-1 produce lesiones del parénquima hepático consecutivas a la

replicación del virus. Este aspecto es novedoso en la patogenia de los virus Herpes simplex ya que, hasta ahora, sólo el HSV-2 había sido asociado con hepatitis virales.

80. (161) ALLOPURINOL: UN FÁRMACO ALTERNATIVO EN EL TRATAMIENTO DEL PACIENTE CHAGASICO. GOBBI PAOLA (1), LO PRESTI SILVINA (1), GEA SUSANA (2), FRETES RICARDO (1), FERNÁNDEZ RUTH (1), ENDERS JULIO (1), PAGLINI PATRICIA (1), RIVAROLA WALTER (1)

Facultad de Ciencias Médicas - U.N.C. (1), Facultad de Ciencias Químicas - U.N.C. (2)

El allopurinol, utilizado habitualmente para el tratamiento de la hiperuricemia, inhibe la hipoxantina-guanina ribosil transferasa del T. cruzi que interviene en la síntesis del ADN. El objetivo de este trabajo es aportar al esclarecimiento de la posible efectividad del allopurinol en el tratamiento del paciente chagásico. Utilizamos ratones Albinos Suizos, SI: sin infectar (n=18) e infectados con 50 tripomastigotes de T. cruzi cepa Tulahuen / ratón, que se dividieron en: ST: Sin tratamiento (n=18), Inf+A1: Infectados + Allopurinol 5 mg/kg/día (n=18), Inf+A2: Infectados + Allopurinol 10 mg/kg/día (n=18) e Inf+A3: Infectados + Allopurinol 15 mg/kg/día (n=18). La droga se administró oralmente por 90 días. El tratamiento de evaluó a través de: Parasitemia: La parasitemia de Inf + A2 fue significativamente inferior con respecto que los ST (p < 0.05). Los tres grupos tratados negativizaron la parasitemia 15 días antes que los ST. Electrocardiografía: El 25% del grupo ST presentó alteraciones, no detectándose en los tratados. Serología: Sin diferencia entre los grupos. Receptores β^1 cardiacos: La afinidad (Kd) tiende a parecerse al SI (3.61 \pm 0.05 nM) medida que aumenta la dosis del tratamiento, Inf+A3 (4.65 \pm 0.52 nM). La Bmax no fue diferente entre los tratados (77.12 \pm 2.57 fm/mg prot) y los no tratados (77.28 \pm 0.91 fm/mg prot). Histopatología: Se observaron en los ST focos inflamatorios, principalmente en ventrículo derecho que no se detectaron en los grupos tratados. Sobrevida: En el grupo ST: 80%, Inf+A1: 50%, Inf+A2: 78%, Inf+A3: 71%. Estos resultados demuestran que el allopurinol tiene un claro efecto sobre la Enfermedad de Chagas experimental, mejorando la parasitemia, la función de los receptores β^1 cardiacos, electrocardiografía e histopatología, y no modificó la serología y la sobrevida. Por ello consideramos importante ahondar las investigaciones que permitan esclarecer su acción terapéutica.

81. (191) ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA) EN LA INFECCIÓN POR VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA ASINTOMÁTICA. PIERI ELSA CRISTINA, CAULA CINTHYA, COOKE PAULA MARÍA, CARLE NATALIA, FERRO MARÍA ELENA, ORSILLES MIGUEL ÁNGEL

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba

La infección por VIH ha sido asociada con numerosas manifestaciones autoinmunes. Nuestro objetivo fue determinar la prevalencia de ANA en pacientes con infección por VIH asintomática y comparar su presencia en pacientes con o sin terapia antiretroviral de alta eficiencia (TAAE) y su relación con el estado inmunológico. En este estudio retrospectivo, se incluyeron 83 pacientes con infección por VIH asintomática (28 sin TAAE y 55 con TAAE). Como grupos controles se incluyeron 20 pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y 24 sujetos sanos. Los ANA fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta y el número de linfocitos T (LT) CD4+ por citometría de flujo. Los ANA fueron detectados en 23% de pacientes VIH (+) y en 4% de controles sanos (p < 0,05). Todos los pacientes con LES fueron ANA (+). En los pacientes VIH (+) se detectaron bajos títulos de ANA en el 14% de los casos y solo en el 6% de ellos se detectaron títulos de 1/320. El 65% de los pacientes con LES presentaron títulos > 1/320. En el control sano, ANA fue detectado a dilución 1/40. La diferencia más significativa en los patrones de coloración nuclear fue la ausencia de patrón homogéneo en la infección por VIH y que fue característica de los pacientes con LES. No hubo asociación significativa entre presencia de ANA y edad, sexo, facto-

res de riesgo para la transmisión o tiempo de detección de la infección. La prevalencia de ANA fue mayor en pacientes con < 500 \times 10³/mL LT CD4+ respecto a pacientes con > 500 \times 10³/mL LT CD4+ (41% vs 14%, p < 0,05). Además, hubo una mayor prevalencia de ANA en pacientes con TAAE en relación a pacientes sin TAAE (29% vs 11%, p < 0,05). En la infección por VIH asintomática pueden ser detectados títulos bajos a intermedios de ANA con patrones de coloración nuclear diferentes a los detectados en el LES. Además, la presencia de ANA está asociada con niveles bajos de LT CD4+ y es más prevalente en pacientes con TAAE.

INMUNOLOGÍA II

82. (212) EFECTOS INMUNOMODULADORES IN VIVO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE LARREA DIVARICATA CAV. DAVICINO ROBERTO CARLOS, MATTAR MARIA AIDA, CASALI YOLANDA, PORPORATTO CARINA, CORREA SILVIA GRACIELA, MICALIZZI BLAS

Cátedra de Inmunología. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. UNSL, Cátedra de Valoración y Control de Calidad de Medicamentos. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. UNSL, Inmunología, CIBICI (CONICET). Facultad de Ciencias Químicas. UNC

Larrea divaricata Cav (jarilla) es una planta empleada en medicina popular en nuestra región. El conocimiento de sus efectos sobre el sistema inmune permitirá su uso racional. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de extractos acuosos de jarilla en macrófagos murinos in vivo. Ratones sensibilizados con proteasa peptona se trataron con dos dosis a intervalos de 48 h de infusión (I) o decocción (D) en concentraciones de 0.5, 5, 50 y 200 mg/kg. Se determinó la actividad sobre la inflamación inducida por carragenina y la toxicidad aguda cuantificando GPT. A los macrófagos tratados con D a la concentración de 0.5 mg/kg se les determinó: i) la producción de NO con reactivo de Griess, ii) la actividad fagocítica por reducción del NBT, iii) la expresión de iNOS por inmunoblotting, iv) la expresión de receptores de LPS-FITC y v) la apoptosis determinada por tinción con Giemsa, bromuro de etidio/naranja de acridina y por la técnica de la escalera. Los resultados mostraron que D (0.5 mg/kg) aumentó la inflamación producida por carragenina (p < 0.05) y que los extractos no indujeron hepatotoxicidad aguda en todas las concentraciones ensayadas. Los macrófagos aumentaron la producción de NO respecto a los controles (p < 0.05) con aumento de la expresión de iNOS, la actividad fagocítica fue significativamente mayor (p < 0.05) y mayor expresión de receptores de LPS. Staphylococcus aureus inhibió la unión a los receptores de LPS-FITC. Podemos concluir que D activa in vivo a los macrófagos, que no posee efectos pro-apoptóticos y que presenta actividad proinflamatoria in vivo. La inhibición de la unión de LPS a sus receptores por S. aureus nos permite inferir que los receptores up-regulados serían los scavenger receptors. Por todo ello D podría, potencialmente, utilizarse como estimulante del sistema inmune innato, en individuos con inmunodeficiencias en las que estén involucrados los fagocitos, por ejemplo la Enfermedad Granulomatosa Crónica.

83. (567) ALTERACIONES EN LAS POBLACIONES DE CÉLULAS T REGULATORIAS CD4+ EN RATONES DEFICIENTES EN CATEPSINA L. CAMICIA GABRIELA, RICARDI MARTINIANO, CABRERA GABRIEL, COSTA HÉCTOR, PIAZZON ISABEL, NEPOMNASCHY IRENE

ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IHEMA, Academia Nacional de Medicina

Los ratones nkt/nkt -portadores de una mutación en el gen que codifica para la catepsina L- presentan alteraciones tempranas durante la selección positiva en el contexto de moléculas MHC de clase II, las que se evidencian por un aumento en el porcentaje de timocitos CD4+CD8+ (DP) y una importante reducción en

el porcentaje de células CD4+ en el timo y la periferia. En este trabajo investigamos la población de células T CD4+ con fenotipo regulatorio (Treg), involucradas en la tolerancia inmunológica. Evaluamos mediante citometría de flujo la expresión del factor de transcripción Foxp3 -marcador de las Treg- en el timo de ratones de 8-9 días de vida. Observamos dentro de la población Foxp3+ un menor porcentaje de células simple positivas CD4+ en los ratones nkt/nkt (N) con respecto a sus controles Balb/c (C) (media del porcentaje±DS: N: 23,0±7,7; n=4; C: 59,3±8,1; n=6; p< 0,01) y un mayor porcentaje de células DP (N: 62,7±4,8; n=4; C: 32,4±5,4; n=6; p< 0,001), sugiriendo la presencia de alteraciones en la selección positiva de las células Foxp3+. El porcentaje de células CD4+ que expresan Foxp3 no muestra diferencias significativas en el timo (N: 3,36±0,76; C: 3,67±0,74), no obstante presenta alteraciones en los ganglios linfáticos donde se encuentran aumentadas tanto la población CD4+ con fenotipo regulatorio CD25+Foxp3+ (N: 16,12±4,25; C: 4,48±0,42; p< 0,001; n=5) como la población CD25-Foxp3+, considerada un reservorio de Treg en la periferia (N: 17,18±1,41; C: 6,57±0,62; p< 0,001; n=5). Nuestros resultados muestran que en los ratones mutantes para la catepsina L, la maduración intratímica de células CD4+ con fenotipo Treg presenta alteraciones y que la población Treg periférica está aumentada. Los aumentos en el porcentaje de linfocitos Foxp3+ dentro de la población CD4+ podrían estar relacionados con aumentos en los niveles de proliferación de células Foxp3+ o bien con la adquisición del fenotipo Foxp3+ en la periferia.

84. (692) EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO INDUCE AUMENTOS EN EL NÚMERO DE CÉLULAS T CON FENOTIPO REGULATORIO ESPECÍFICAS PARA EL SUPERANTÍGENO VIRAL. CABRERA GABRIEL, BURZYN DALIA, CAMICIA GABRIELA, NEPOMNASCHY IRENE, PIAZZON ISABEL

ILEX-CONICET. División Medicina Experimental-Instituto de Investigaciones Hematológicas-Academia Nacional de Medicina

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es transmitido durante la lactancia. La infección induce en las placas de Peyer (PP) un aumento de células T reactivas al superantígeno viral (Sag), el cual se expresa en células B y dendríticas (DC) infectadas. Estudiamos por citometría de flujo la expresión de CD25 y Foxp3 en la población respondedora al Sag (células T Vb6+) en la primera semana de infección. Observamos un aumento en el porcentaje y número absoluto de células Vb6+CD25+Foxp3+ (fenotipo regulatorio) en las PP. P.ej. día 2: infectados (A): 0,20±0,05; no infectados (B): 0,11±0,03; p< 0,01; día 6: A: 0,34±0,06; B: 0,11±0,02; p< 0,005 (media del porcentaje±DS, n=4). El aumento en el porcentaje de células Vb6+CD25+Foxp3- (fenotipo activado) fue: día 2: A: 0,50±0,06; B: 0,04±0,03; p< 0,005; día 6: A: 0,07±0,02; B: 0,03±0,01; p< 0,05 (n=4). Se muestra un experimento representativo de 4. A lo largo de la infección, dentro de la población Vb6+ se produce un aumento no sólo en el porcentaje de células Foxp3+CD25+ sino también en el porcentaje de células Foxp3+CD25- (consideradas reservorio de células Foxp3+CD25+ en periferia): p.ej. día 6: %Foxp3+CD25+/Vb6+, A: 6,7±0,9; B: 4,1±0,4 (p< 0,01); %Foxp3+CD25-/Vb6+, A: 7,4±0,9; B: 4,5±0,4 (p< 0,01). Dado que el MMTV activa a las DCs a través del receptor de tipo Toll 4 (TLR4), investigamos si los aumentos inducidos por este virus en las subpoblaciones Vb6+ dependen del TLR4. En ratones C.C3H Tlr4LPS-d mutantes en TLR4 infectados con MMTV el porcentaje de células Vb6+ con fenotipo regulatorio fue significativamente menor que en ratones BALB/c infectados, tanto al día 2 como al 6 (p< 0,05). Resultados similares se observaron con las células Vb6+CD25+Foxp3- (p< 0,05). Estos resultados indican que la respuesta al Sag del MMTV no sólo se produce por un aumento de células activadas, sino que también involucra un incremento de células T Vb específicas con fenotipo regulatorio. Ambos eventos son dependientes de la presencia de un TLR4 funcional.

85. (131) EFECTO DE LA TERAPIA ANTIOXIDANTE EN LA PREVENCIÓN DEL ABORTO RECURRENTE ASOCIADO A FALLAS INMUNOLÓGICAS Y HEMATOLÓGICAS DE UN MODELO MURINO. JUNOVICH GISELA(1)(2), DUBINSKY VALERIA(1), GENTILE TERESA(1), PASQUALINI SERGIO(2), GUTIERREZ GABRIELA(1)(2)

IDEHU (CONICET-UBA)(1) /Haitus Instituto Médico(2)

En los últimos años la Inmunología y Hematología se han acercado a la Medicina Reproductiva para explicar el mecanismo por el cual se produce la injuria endotelial que conduce al aborto. La investigación actual se ha enfocado en mecanismos por los cuales la inflamación desencadena la formación de coágulos que provocan la muerte fetal por isquemia debido a un desbalance de citoquinas reguladoras. En este trabajo se evaluó si la suplementación con Vitamina E (Vit E) de las hembras del modelo abortador CBA/j vs DBA/2, podría contrarrestar las pérdidas gestacionales de origen inmunológico y hematológico, mediante un efecto inmunomodulador como el ejercido por la terapia anticoagulante. Hembras CBA/j en edad reproductiva fueron tratadas con Vit E por vía endogástrica o con Enoxaparina intraperitonealmente. Al día 14.5 de gestación se obtuvieron las unidades fetoplacentarias y se midió el índice de resorción. Se cuantificaron las distintas citoquinas mediante ELISA. El tratamiento post-implantación con 15mg/día de Vit E natural y con 0.7mg/kg de Enoxaparina disminuyó en un 93% y 77% (p< 0,0001) respectivamente el índice de aborto, mientras que normalizo los niveles de la citoquina reguladora, IL-6 (p=0,0004), y de citoquinas angiogénicas, VEGF (p> 0,05). Sin embargo, los tratamientos con Vit E y Enoxaparina no modificaron los niveles placentarios de IL-10 y TNF-α (p>0,05). Estos datos sugieren que el efecto preventivo del aborto ejercido por la Vit E natural y la Enoxaparina, estaría acompañado por un efecto inmunomodulador similar para ambos tratamientos, capaz de compensar los niveles deficientes de citoquinas reguladoras de la transición de una respuesta inflamatoria necesaria en la implantación, hacia una respuesta angiogénica, fundamental para la correcta vascularización placentaria.

86. (473) SLPI (INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASA LEUCOCITARIA) DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE CD29. AMIANO NICOLAS, REITERI ROMINA MACARENA, COSTA MARIA JULIETA, TATEOSIAN NANCY, BARBOZA MARCOS, CHULUYAN HECTOR EDUARDO

LANAIS-CITO de la Facultad de Medicina. UBA

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad del SLPI para modular la expresión de moléculas de adhesión. Para ello se usaron como modelo dos líneas celulares: HeLa; (carcinoma de cervix humano) y F3II (carcinoma mamario murino). Se cuantificaron las expresiones de CD54/ICAM-1 y CD29/β1 integrina por citometría de flujo. El tratamiento de HeLa con rhSLPI (4 µg/ml, 16hs, 37°C) disminuyó la expresión de CD29 (23±3%) pero no produjo ningún efecto sobre CD54. Posteriormente, se transfecaron las células HeLa con un vector de expresión eucariota con el gen para hSLPI con orientación sentido y antisentido; con el objeto de aumentar y disminuir la expresión basal de la proteína, respectivamente. Los clones que producían hSLPI en niveles superiores a los basales (basal 10±2ng/ml; clon 3A: 17±2ng/ml) presentaron disminución (27±3%) en la expresión de CD29. En tanto que la expresión de CD29 fue levemente superior (12±2%) en clones que producían niveles inferiores a los basales (clon 5: 2±1ng/ml). En cambio, no se observaron diferencias en la expresión de CD54 en ninguno de los clones examinados. Por otro lado, células F3II murinas transfectadas con el gen sentido para SLPI humano y que producían niveles muy altos de hSLPI (basal: 0 ng/ml vs clon 2C1: 97±13ng/ml), mostraron niveles casi indetectables de CD29, medidos en un ensayo de Western Blot. Es importante señalar que los clones que sobreexpresan mayor cantidad de hSLPI, no mostraron diferencias en cuanto a la viabilidad celular, a pesar de presentar una menor adhesión al plástico y una mor-

fología claramente diferente comparada con los clones controles. Estos resultados sugieren que tanto el SLPI exógeno como el endógeno es capaz de modular la expresión de CD29.

87. (622) SKALP/ELAFIN DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ INDUCIDA POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. TATEOSIAN NANCY, GÓMEZ SONIA A., MAFFIA PAULO, JURADO JAVIER, COSTA MARÍA JULIETA, GUERRIERI DIEGO, GARCÍA VERÓNICA, CHULUYÁN EDUARDO H.

LANAIS de la Facultad de Medicina, Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Dpto. Microbiología, Facultad de Medicina, UBA.

SKALP/ ELAFIN (skin derived anti leukoproteinas) es un inhibidor de serino proteasas de 9.9 kDa, con un dominio sustrato N-terminal de la transglutaminasa, presente principalmente en las secreciones pulmonares. En nuestro laboratorio clonamos al SKALP/ ELAFIN humano y determinamos su actividad inhibitoria de elastasa con un sustrato cromogénico. Resultados previos demuestran que algunos inhibidores de serino proteasas, tales como SLPI, inhiben la activación y proliferación celular. El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de SKALP/ ELAFIN de inhibir la activación celular inducida por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Para ello se utilizó como modelo a células mononucleares de sangre periférica humana tratadas o no con un lisado de MTB a diferentes tiempos y se examinó la producción de IFN γ en el sobrenadante de los cultivos celulares. Como era de esperar, los sobrenadantes de cultivo de células mononucleares tratadas con el lisado de MTB, presentaron niveles elevados de IFN γ luego de 24, 48 y 120 hs de cultivo (control: 0.02 ± 0.002 ng/ml; 24 hs: 5.3 ± 1.8 ng/ml; 48 hs: 6.9 ± 1.7 ng/ml y 120 hs: 7.3 ± 0.16 ng/ml). En tanto que en los sobrenadantes de las células mononucleares de sangre periférica pretratados con SKALP/ ELAFIN (4 μ g/ml, 30 min) y luego con el lisado de MTB se observó una marcada disminución en la concentración de IFN γ a las 24hs y 48, pero no a las 120 hs (3.3 ± 1.5 ng/ml; 4.4 ± 2.4 ng/ml y 6.3 ± 0.14 ng/ml; $p < 0.05$). También observamos que la inhibición es un efecto dosis dependiente. Estos resultados indican que SKALP/ELAFIN tiene la capacidad de inhibir la activación de células mononucleares inducida por MTB y sugieren una posible participación de SKALP/ELAFIN en la fisiopatología de la tuberculosis.

88. (633) IFN- γ MODULA LA EXPRESIÓN DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASA LEUCOCITARIA (SLPI) EN LÍNEAS CELULARES EPITELIALES. COSTA JULIETA, AMIANO NICOLAS, GUERRIERI DIEGO, MAFFIA PAULO, TATEOSIAN NANCY, CHULUYAN EDUARDO

LANAISCITO - Facultad de Medicina

El Inhibidor Secretorio de Proteasa Leucocitaria (SLPI) es una serpina de 11,7kDa que pertenece a la familia de las proteínas ácidas del suero (WAP); caracterizadas por dominios con cuatro puentes disulfuro. El SLPI tiene la capacidad de inhibir la elastasa de los neutrófilos, tripsina, cathepsina G y quimiotripsina. Su función principal es prevenir la acción deletérea de las serino-proteasas presentes en el foco inflamatorio. El SLPI se encuentra modulado tanto a nivel transcripcional como proteico por citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α . El objetivo de este trabajo fue estudiar la modulación de la expresión del SLPI por IFN- γ . Con tal fin, las líneas celulares HeLa and A549 fueron crecidas y tratadas con IFN- γ (2ng/ml) a distintos tiempos (0-16 hs). Luego, se retiró el sobrenadante y se extrajo el ARN total de las células para realizar una RT-PCR. El nivel transcripcional de SLPI en HeLa disminuyó $50 \pm 5\%$ en todos los tiempos analizados, mientras que en A549 aumenta ($20 \pm 1\%$) a tiempos cortos (15 min) y disminuye ($5 \pm 1\%$) a tiempos largos (2-16 hs). Analizado el nivel proteico de SLPI en el sobrenadante de las células tratadas con IFN- γ (20 ng/ml, 16 hs) por ensayos de ELISA, se observó una disminución comparada con las células HeLa sin tratar (Control: 1658 ng/ml ± 116 ; SLPI: 1316 ng/ml ± 151 $p < 0.005$).

Estos resultados fueron también confirmados en un ensayo de Western Blot. Estos resultados indican que el IFN- γ es una posible señal moduladora para la secreción y producción de SLPI en células epiteliales.

89. (108) PRODUCTOS VEGETALES Y DROGAS ANTIALÉRGICAS SOBRE LA DESGRANULACION DE BASOFILOS Y EFECTOS DE DERIVADOS DE MINTHOTHACHYS VERTICILLATA SOBRE PHA O CONA. MALDONADO ANA MARÍA (1), CARIDDI LAURA NOELIA (1), PANERO ADRIANA (1), ALANIZ FLAVIA (1), SANTA DANIELA (1), ZIGADLO JULIO (2), GROSSO MARGARITA (1), SABINI LILIANA INES (1)

Universidad Nacional de Río Cuarto (1); Universidad Nacional de Córdoba(2)

Derivados de *Achyrocline satureioides* (A.s.) y *Minthostachys verticillata* (M.v.), han sido utilizados tradicionalmente por sus propiedades antiinflamatorias y broncodilatadoras. En estudios in vitro, comprobamos que decocción y aceite esencial de M.v., tenían efectos mitogénicos similares a PHA, ConA y PWM; estimulaban a LTCD8+, incrementaban la síntesis de IFN- γ e inhibían la desgranulación de basófilos desafiados con el alérgeno específico. Los objetivos fueron: comparar la inhibición in vitro de la liberación de β -hexosaminidasa (β -h) de basófilos, por dexametasona, teofilina, cromoglicato disódico, bromuro de ipratropio+salbutamol, decocciones de hojas/flores de A.s y decocción/aceite esencial de M.v. y determinar los efectos de derivados de M.v. en cultivos de linfocitos co-estimulados con PHA o ConA. Las muestras eran de 38 pacientes alérgicos a hongos evaluados por Prick y dosaje de IgE total por EIA. La liberación de β -h se midió por EIA desafiando a los basófilos con el alérgeno solo o adicionado de las drogas comerciales o de los derivados de A.s. o M.v. Se realizaron cultivos de linfocitos, co-estimulados con derivados de M.v. y PHA o ConA por el método del MTT. Todos los pacientes mostraron IgE total elevada y reactividad cutánea frente a los alérgenos específicos. Los basófilos desafiados por el alérgeno, liberaron β -h, liberación que fue reducida por cada droga o derivado de A.s. o M.v. ($p < 0,001$). Los índices de proliferación en los cultivos co-estimulados fueron menores respecto a los de cada mitógeno o derivado de M.v., en ensayos independientes ($p < 0,02$). Decocción de flores de A.s. y de hojas de M.v. tuvieron efectos similares a los de las drogas comerciales sobre la liberación de β -h. Los mitógenos en co-estimulación mostraron antagonismo sobre la expansión celular. Los estudios de funcionalidad linfocitaria de quienes ingieren estas hierbas, podrían observar valores subnormales.

90. (196) NKG2D REGULA POSITIVAMENTE LA SECRECIÓN DE IFN-GAMA POR CÉLULAS NK HUMANAS ESTIMULADAS CON IL12 Y AGONISTAS DE TLR3 Y TLR7. GIRART MARÍA VICTORIA, FUERTES MERCEDES BEATRIZ, DOMAICA CAROLINA INÉS, ROSSI LUCAS EZEQUIEL, ZWIRNER NORBERTO WALTER

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA

La citotoxicidad y secreción de IFN γ por células NK está regulada por NKG2D y el reconocimiento de sus ligandos MICA/B y ULBPs1-3. MICA se expresa en tumores y células infectadas. Además, las células NK expresan TLR2, 3, 7, 8 y 9. Previamente demostramos que agonistas de TLR3 (polyIC) y TLR7 (Loxoribine-loxo-) + IL12 o IL15 no modulan la expresión de NKG2D ni la citotoxicidad de las células NK contra un clon del melanoma MEL-LES (no expresa MICA en superficie) transfectado con MICA (MICA+) vs un clon control (MICA-), pero que en presencia de IL12 promueven la producción de IFN- γ . Objetivo: estudiar las vías de señalización que regulan la producción de IFN- γ en células NK estimuladas con IL12+polyIC o loxo y el papel de NKG2D en esta respuesta. Estimulamos células NK humanas durante 24h con IL12-loxo o polyIC y observamos una disminución dosis-dependiente en el

IFN γ producido (por ELISA; [IFN γ] en pg/ml) en presencia de U0126, SB202190, rapamicina y sulfasalazina -Sz- (tabla; todos con $p < 0,01$) pero no con ciclosporina -CsA-. La producción de IFN γ vía IL12+loxo o polyIC fue sensible a cloroquina: 1574 \pm 185 (loxo s/cloreq) vs 97 \pm 1 (loxo c/cloreq), $p < 0,01$; 227 \pm 13 (polyIC s/cloreq) 89 \pm 1 (polyIC c/cloreq), $p < 0,01$ y aumentó por cocultivo de cél NK con el clon MICA+ (loxo: 672 \pm 87; polyIC: 623 \pm 120) pero no con el clon MICA- (loxo: 386 \pm 8; polyIC: 285 \pm 29), con $p < 0,05$ (para ambos estímulos). Conclusiones: La secreción de IFN γ por cél NK estimuladas con agonistas de TLR3 o 7 + IL12 depende de la señalización en endosomas (como en cél dendríticas), lo que activa las vías de ERK, p38 MAPK, p70S6K y NF κ B. Esta capacidad se potencia por estimulación de NKG2D, lo que resalta el papel de las cél NK en la respuesta innata cuando reconocen ligandos de NKG2D expresados por células infectadas o tumorales, y participa en el perfilado de la respuesta adaptativa hacia un perfil Th1 a través de IFN γ secretado.

IFN γ (pg/ml) producido por cél NK estimuladas con IL12+loxo o IL12+polyIC en presencia de distintos inhibidores. [IFN γ] s/ inhibidor=1590 \pm 394 (loxo) y 1325 \pm 93 (polyIC). [IFN γ] c/ CsA=1238 \pm 175 (loxo) y 1382 \pm 33 (polyIC)

	U0126	SB202190	Rapa	Sz
IL12+loxo	73 \pm 9	17 \pm 11	338 \pm 15	28 \pm 1
IL12+polyIC	68 \pm 4	42 \pm 4	666 \pm 7	61 \pm 3

91. (665) ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SÍNTESIS DE PGE 2 E IL-8 EN LEUCOCITOS DE PACIENTES NORMALES, DIABÉTICOS Y CON ÚLCERAS CRÓNICAS, DESAFIADOS CON PSEUDOMONAS AERUGINOSA (PA) Y LACTOBACILLUS PLANTARUM. (LP). GOBBATO NADIA (1), RACHID MIRTA (1), PERAL MARIA CRISTINA (2), HUAMAN MIGUEL (3), VALDEZ JUAN CARLOS (1)

Universidad Nacional de Tucumán- Fac. de Bioquímica, Química y Farmacia (1); Universidad Nacional de Tucumán- Fac. de Medicina (2); Hospital Centro de Salud (3)

PGE2 producidas por macrófagos-monocitos, actúan sobre Polimorfonucleares (PMN) y modulan la producción de citoquinas. Bacterias gram (+) inducen diferentes niveles de citoquinas y PGE2 que las gram (-). Estudiamos esta inducción en leucocitos de sangre circulante de pacientes normales (N), diabéticos (D), no diabéticos con úlceras y diabéticos con úlceras, para aplicar estos datos al uso de Lp en la Bacterioterapia de heridas crónicas. Los Mononucleares (MN) fueron separados de los PMN por Ficoll-hypaque, cultivados en RPMI-1640. MN (10^6 /ml) fueron desafiados por separado con 2 dosis: 2×10^5 /ml y 2×10^7 /ml de Pa y de Lp (muertas por UV). Después de 18 h a 37 °C, se determinó en los sobrenadantes PGE2 por ELISA (Cayman Chemical). PMN (10^6 /ml), preincubados y no preincubados con Lp, fueron desafiados con Pa (2×10^5 /ml y 2×10^7 /ml). Luego de 1h se estudiaron las células positivas para IL-8 por ICQ (Sta. Cruz Biotechnology). PGE2 (pg/ml): el basal es mayor en los diabéticos: D=3567 \pm 582 vs N=2917 \pm 273 $p < 0,05$. En los D el nivel de PGE2 es mayor desafiando con Pa 4789 \pm 961 que con Lp 3739 \pm 842 $p < 0,005$. En los N esa diferencia es menor Pa=4683 \pm 299 vs Lp=4017 \pm 655 $p < 0,05$. Pacientes con úlcera sean o no diabéticos muestran niveles altos de PGE2 sin diferencias entre basales ni estimulados con Pa o Lp. IL-8: el basal en los D=36 \pm 7 es mayor que en N=28 \pm 10 $p < 0,001$. La estimulación con Pa aumenta el nivel de IL-8 en todos los casos (D y N) sin diferencias entre ellos. La preincubación con Lp disminuye la IL-8 sólo en los normales $p < 0,01$. En pacientes con úlceras, diabéticos o no, no hay diferencia entre los basales y son mayores que el basal normal ($p < 0,0001$). Hay una gran estimulación con Pa $p < 0,0001$. Es inhibida por Lp solo en los no diabéticos con úlceras $p < 0,0001$. Esto indica que, en diabéticos y en pacientes con úlceras, PGE2 e IL-8 están elevadas espontáneamente, son más inducibles por patógenos (Pa) y menos regulables por Lp.

92. (146) MODULACIÓN DEL RECEPTOR PARA FRACTALQUINA, CX3CR1, EN MONOCITOS HUMANOS POR EFECTO DE LA INTERLEUQUINA 10 (IL-10). RAMOS MARIA VICTORIA, FERNÁNDEZ GABRIELA C, LANDONI VERONICA I, BENTANCOR LETICIA V., FERNÁNDEZ-BRANDO ROMINA J., ISTURIZ MARTIN A., PALERMO MARINA S

Academia Nacional de Medicina

El CX3CR1 presente en monocitos (Mo) tiene como ligando la fractalquina (FKN), única quimiocina de membrana expresada en endotelio inflamado que actúa como molécula de adhesión favoreciendo el reclutamiento de Mo, población potencialmente tóxica. Hemos observado un descenso significativo en el porcentaje de Mo CX3CR1+ en los pacientes con Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Por este motivo, nos interesó analizar si el CX3CR1 es modulable por factores inflamatorios y anti-inflamatorios. Anteriormente, demostramos que LPS y toxina Shiga-1 (Stx1) disminuyen significativamente la expresión de CX3CR1 en Mo. En el presente, analizamos el efecto de la IL-10. Se purificaron monocitos de dadores sanos y luego de los tratamientos, se marcó con anticuerpos y se analizó por Citometría de flujo. El cultivo (20hs) per se, disminuye significativamente la expresión de CX3CR1, efecto que es inhibido por IL-10, en forma dosis dependiente, siendo la concentración óptima 10-20ng/ml (0hs= 80.1 \pm 2.3%; 20hs basal= 55.1 \pm 5.5%; 20hs IL10=74.8 \pm 5.5%)* $p < 0,05$ vs.0hs, n=8. También se utilizó una línea celular monocítica, THP1, que expresa CX3CR1. Previamente se diferenciaron con PMA (5ng/ml) durante 48hs, para inducir la expresión de CD14. Se incubaron con LPS (100ng/ml), Stx-1 (2,5ng/ml) e IL-10, durante 20hs. Sólo se observó un aumento significativo en la expresión de CX3CR1 en presencia de IL-10. (basal: 65.8 \pm 3.9%, mediana 25.7 \pm 3; IL10: 82.1 \pm 4.5%, mediana: 44.5 \pm 9.9)* $p < 0,05$, n=7. Además se observó una disminución en la expresión de CD14 con LPS y Stx-1; y aumento con IL10, el cual también ocurre en monocitos según bibliografía (%CD14: basal= 62.4 \pm 3.2, LPS= 44.8 \pm 5.1**, Stx-1= 48.8 \pm 3.9*, IL-10= 70.9 \pm 3.2*) * $p < 0,05$ **, $p < 0,001$ vs basal, n=7. Concluimos que mientras factores inflamatorios presentes durante el SUH, como LPS y Stx disminuyen la expresión de CX3CR1, la IL-10, citoquina antiinflamatoria evita su descenso en Mo e induce su aumento en células THP1.

93. (121) EFECTO DE ÁCIDOS GRASOS DIETARIOS SOBRE LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA EN RATONES. VEAUTE CAROLINA, ANDREOLI FLORENCIA, RACCA ANDREA, BAILAT ALEJANDRA, BERNAL CLAUDIO, MALAN BOREL ILEANA

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral

En trabajos previos hemos observado que los ácidos grasos dietarios afectarían parámetros reproductivos en la primera generación de ratones. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que la cantidad y el tipo de ácidos grasos ejercen sobre la capacidad reproductiva en la segunda generación de animales. Para esto, ratones CF1 fueron alimentados, desde el destete y durante un mes, con dietas conteniendo: Grupo tAG: 17g% aceite rico en ácidos grasos trans (tAG)+3 g% aceite de maíz (AM), Grupo CAL: 3g% aceite rico en conjugados del ácido linoleico (CAL)+17 g% AM, Grupo AM: 20g% AM y Grupo DCE: dieta comercial estándar (DCE) (7% grasa total) y posteriormente apareados. Las crías recibieron el mismo tratamiento y a los 18 días de preñez, las hembras fueron sacrificadas, evaluándose el número de fetos y de resorciones. La expresión de TNF- α e IL-4 placentarias fue evaluada por inmunohistoquímica y expresada como el n° de células positivas/campo. En machos, se evaluó número y motilidad espermáticas, así como la tasa de reacción acrosomal (RA) inducida por ionóforo de calcio. Se observó una asociación directa entre el contenido de grasa en la dieta y la expresión de TNF- α (AM: 0,367 \pm 0,099 vs DCE: 0,067 \pm 0,017; $p < 0,05$). Asimismo, en todos los grupos alimentados con 20% de grasa se observaron resorciones. La presencia de CAL llevó los niveles de TNF- α a

los obtenidos con la DCE (CAL: $0,109 \pm 0,013$; $p > 0,05$) y condujo a una menor expresión de IL-4 (CAL: $0,10 \pm 0,02$ vs AM: $0,477 \pm 0,117$; $p < 0,05$). En machos, la presencia de tAG y CAL, disminuyó la tasa de RA (%) a los 30 y 60 min post-inducción (tAG: $41,8 \pm 4,9$ [30 min]; $64,2 \pm 2,7$ [60 min]. CAL: $39,4 \pm 6,7$ [30 min]; $68,4 \pm 2,7$ [60 min]) respecto al grupo AM ($71 \pm 4,5$ [30 min]; $80,4 \pm 1,9$ [60 min]) ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que tanto la cantidad como el tipo de ácidos grasos dietarios afectaría el perfil de expresión de citoquinas en la interfase materno-fetal así como la funcionalidad espermática.

94. (494) CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MOTIVO DE INTERNALIZACIÓN YXXLI EN EL COMPLEJO DEL RECEPTOR DEL IFNG. YANCOSKI JUDITH, BERNASCONI ANDREA, ROSENZWEIG SERGIO DAMIÁN

Hospital Juan P. Garrahan

El complejo del receptor del IFN γ (IFN γ R) es un heterodímero formado por las subunidades de transmembrana (TM) IFN γ R-1 e IFN γ R-2. La internalización del receptor es vista como un mecanismo involucrado en el reciclaje, la traducción de señal y la finalización de la misma. La distribución de proteínas TM a los diferentes compartimentos del sistema endosoma-lisosomal están gobernadas por un sistema de señales aminoacídicas en el dominio citoplasmático (DC) de las mismas y una maquinaria molecular que las reconoce y dirige la proteína a su destino final. Dentro de este tipo de señales se encuentran las basadas en tirosina (NPxY y YxxØ) y en dileucinas (LL o LI). Para el IFN γ R-2 se demostró que la LI 255-256 controlaba la acumulación del receptor en membrana. En el IFN γ R-1 se reportó que una delección de los aa 256-303 del DC provocaba alteración en la internalización y se propuso, sin ser comprobado, que la LI 270-271 estaría involucrada en el proceso. Existe una secuencia YxxLI en la posición 287-291 con características compartidas de señales tipo YxxØ y LI. Para determinar su implicancia en la internalización realizamos un estudio de mutagenesis dirigida y medimos la acumulación de cada uno de los clones mutados. La delección de Y 287 o su reemplazo por A provocó una acumulación mayor al clon salvaje ($p < 0,05$). Este mismo resultado se obtuvo al mutar la LI ($p < 0,004$) indicando que tanto la Y como la LI son importantes en este nuevo motivo. Por otro lado la delección y alanización de LI 270-271 no produjo sobreacumulación del receptor. Este trabajo nos permite proponer un nuevo motivo YxxLI en 287-291 basado en T y en LI en forma conjunta, como el determinante de la internalización del IFN γ R-1. Además, esta estructura YxxLI fue encontrada en 252-256 del IFN γ R2. Estudios preliminares indicarían que Y 252 estaría involucrada en este mismo proceso en cuyo caso podríamos definir a YxxLI como un nuevo dominio de internalización común a todo el IFN γ R

95. (255) LA INFECCIÓN POR BRUCELLA NO INDUCE QUEMOQUINAS NI TNF-ALPHA EN CÉLULAS EPITELIALES ALVEOLARES TIPO II HUMANAS. FERRERO MARIANA (1), DOCENA GUILLERMO (2), RUMBLO MARTÍN (2), FOSSATI ALBERTO (1) (2), BALDI PABLO (1)

Instituto de Estudio de la Inmunidad Humoral. CONICET-UBA (1); Cátedra de Inmunología. UNLP (2)

Distintos patógenos respiratorios inducen la producción de quemoquinas y citoquinas proinflamatorias por el epitelio pulmonar. Aunque la infección por *Brucella* puede adquirirse por mucosa respiratoria, no se ha evaluado la interacción de esta bacteria con el epitelio alveolar. Investigamos la capacidad de distintas cepas de *Brucella* para infectar e inducir la secreción de citoquinas en una línea de células alveolares humanas tipo II (A549). Para ello las células fueron infectadas durante 14 hs. con B. abortus 2308 (cepa virulenta lisa), B. abortus RB51 (vacunal rugosa) y B. canis (virulenta rugosa) a una relación de 150 bacterias/célula. A las 2, 24 y 48 hs. posinfección (p.i.) se cuantificaron las bacterias intracelulares por ensayos de protección con gentamicina y plaqueo en medio nutritivo. Todas las cepas ensa-

yadas se adhieren e invaden las células A549. La adherencia de B. abortus RB51 es significativamente mayor que la de la cepa lisa ($1,1 \pm 0,1 \times 10^6$ vs. $2,5 \pm 0,2 \times 10^5$ UFC/pocillo), y lo mismo ocurre con la invasión ($1,4 \pm 0,09 \times 10^5$ vs. $1,2 \pm 0,1 \times 10^3$ UFC/pocillo). Sin embargo, sólo la cepa lisa logra replicarse intracelularmente ($1,1 \pm 0,8 \times 10^4$) y $6,5 \pm 0,2 \times 10^5$ UFC/pocillo a las 48 hs. p.i. para B. abortus rugosa y lisa, respectivamente). Notablemente, ninguna infección incrementó significativamente la producción de las quemoquinas IL8 y MCP-1 ni de TNF- α . A las 24 hs. p.i., sus niveles en sobrenadantes de cultivo de células infectadas con cepa lisa y células no infectadas fueron $1039 \pm 9,4$ vs. 1050 ± 57 pg/ml, 874 ± 13 vs. 839 ± 16 pg/ml, y 0 ± 0 vs. 0 ± 0 pg/ml, respectivamente. En cambio, en las células estimuladas con flagelina de *Salmonella typhimurium* los niveles de quemoquinas fueron incrementados. Estos resultados muestran que *Brucella* es capaz de invadir y replicarse en células epiteliales alveolares sin inducir la producción de quemoquinas y TNF- α , lo cual podría constituir un mecanismo de evasión inmunitaria.

96. (720) EFECTO DIFERENCIAL DEL BENZNIDAZOL (BZL) SOBRE LA ACTIVACIÓN DE NF-KB Y AP-1 EN CÉLULAS RAW 264.7. MANARIN ROMINA (1) (2), PASCUTTI MARÍA FERNANDA (1) (2), REVELLI SILVIA (1), SERRA ESTEBAN (2)

Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR (1); IBR-CONICET, Fac. de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR (2).

El BZL se utiliza como parasiticida en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En trabajos previos, hemos demostrado que este compuesto posee además actividad anti-inflamatoria al inhibir la producción de mediadores pro-inflamatorios inducida por LPS tanto in vivo como in vitro, en la línea de macrófagos murinos RAW 264.7, inhibiendo la activación de NF- κ B en respuesta a LPS al impedir la degradación de I κ B α . NF- κ B es activado por numerosos inductores, y se postula que las vías convergen a nivel de IKK. Además, su activación se encuentra frecuentemente coordinada con la de otros factores de transcripción como AP-1. El objetivo de este trabajo fue ahondar en los mecanismos moleculares por los cuales el BZL inhibe la activación de NF- κ B. Para ello, células de la línea RAW 264.7 se transfectaron con un plásmido que contiene el gen reportero luciferasa bajo el control de elementos κ B y luego se incubaron con diferentes inductores (LPS, IL-1, FNT- α , PMA y H $_2$ O $_2$) con o sin BZL 0.1 y 1 mM durante 24 hs, para luego determinar la actividad luciferasa en los extractos totales. Esto permitió evidenciar un aumento de la actividad luciferasa en respuesta a todos los inductores, que disminuyó en forma significativa en los cultivos tratados con BZL 1 mM. Estos resultados se confirmaron por Ensayos de Retardo en Gel (ERG). Además, con el fin de evaluar la selectividad del BZL, se estudió la activación de AP-1 en extractos nucleares de células RAW 264.7 estimuladas con LPS y tratadas con BZL 0.1 y 1 mM. A través de ERG se observó la aparición de una banda específica en respuesta a LPS, cuya intensidad no disminuyó frente al tratamiento con BZL. De los resultados obtenidos se desprende que el BZL inhibe en forma específica la activación de NF- κ B, sin modificar la activación de AP-1, y que este efecto es independiente de la vía de inducción, lo que sugiere que la inhibición podría encontrarse a nivel de la activación de IKK o de la actividad del proteosoma.

97. (346) SEÑALES INDUCIDAS POR EL POLISACÁRIDO QUITOSANO EN EL EPITELIO INTESTINAL: UN ESTÍMULO NO INFLAMATORIO. CANALI MARIA MAGDALENA, PORPORATTO CARINA, CORREA SILVIA GRACIELA

Inmunología. Dto Bioquímica Clínica. CIBICI (Conicet). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba

Las células del epitelio intestinal (CEI) reciben continuamente señales del lumen que traducen hacia la mucosa. Además de cumplir una función absorbente y secretora, podrían tener un papel clave en el inicio y regulación de los procesos inflamatorios.

Un potente regulador negativo de la inflamación es el TGF β que actúa señalizando desde el receptor al núcleo a través de la familia de las Smad. Estas proteínas median la transcripción de genes (Smad 3) o inhiben la acción del TGF β (Smad7). Frente a estímulos inflamatorios el balance de estas proteínas se altera pudiendo bloquearse los efectos endógenos del TGF β . Hemos observado que la administración oral de una o varias dosis del polisacárido quitosano (Q) aumenta significativamente el TGF β en los sitios inductivos de la mucosa y favorece la tolerancia hacia antígenos proteicos. Para evaluar las señales que Q estimula en el epitelio ratas Wistar recibieron una única dosis de 1, 3 o 5 mg de Q y se purificaron CEI para la obtención de proteínas y ARNm. La expresión de CCL20 (RT-PCR), una quemoquina importante en el reclutamiento de células dendríticas inmaduras incrementó de forma dosis dependiente ($p < 0,05$) en tanto que no se modificaron los niveles de transcritos para TGF β (RT-PCR) ($p = NS$). La proteína Smad3 aumentó con el tratamiento (WB) en tanto que la administración del polisacárido no modificó la expresión citoplasmática de Smad7 (WB). La relación Smad7/Smad3 mostró una significativa disminución con la ingesta de Q ($p < 0,05$). Estos estudios se complementaron con la determinación de Smad 3 y Smad 7 (WB) en la línea de epitelio intestinal IEC-6 estimulada con 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ de Q durante 18-24 hs. En este sistema *in vitro*, el cultivo sostenido con el polisacárido estimuló el aumento de ambas proteínas. Estos resultados muestran que Q se comporta como un estímulo no inflamatorio generando distintas señales en el epitelio que amplificarían los mecanismos regulatorios de la mucosa.

98. (614) EL ADN BACTERIANO ACTIVA A LOS NEUTRÓFILOS A TRAVÉS DE UNA VÍA INDEPENDIENTE DE MOTIVOS CPG Y TLR9, PERO DEPENDIENTE DE MYD88. ÁLVAREZ MARÍA EUGENIA, FUXMAN BASS JUAN I., VERMEULEN MÓNICA, GEFFNER JORGE R., TREVANI ANALÍA S

IIHEMA. Academia Nacional de Medicina

Previamente demostramos que el ADN de *E. coli* simple cadena (ADNec) induce la activación de neutrófilos a través de un mecanismo CpG-independiente que involucra la activación de las MAPK p38 y ERK1/2 y de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. El objetivo del presente estudio consistió en completar la caracterización de los mecanismos transduccionales activados en neutrófilos por ADNec. Ensayos de Western Blot (WB) indicaron que JNK y Akt son fosforiladas a consecuencia de la estimulación de neutrófilos con ADNec (100 $\mu\text{g/ml}$). El pre-tratamiento de neutrófilos con el inhibidor de JNK SP600125 (10 μM), redujo el incremento en la expresión de CD11b inducido por ADNec (100 $\mu\text{g/ml}$; $n=6$; $p < 0,01$) pero potenció la producción de IL-8 inducida por ADNec (100 $\mu\text{g/ml}$; $n=6$; $p < 0,01$), sugiriendo que esta vía podría modular negativamente la síntesis de IL-8. Por el contrario, la wortmannina (50 nM), inhibidor de PI3K, no afectó la producción de IL-8 inducida por ADNec (100 $\mu\text{g/ml}$; $n=6$), descartando la participación de esta vía en la síntesis de IL-8. Mediante ensayos de kinasa, determinamos que el ADNec induce la actividad kinasa de IRAK1, y mediante WB confirmamos que IRAK1 es fosforilada y degradada a consecuencia de la estimulación de neutrófilos con ADNec (100 $\mu\text{g/ml}$), sugiriendo que el ADNec induce la activación de neutrófilos activando la vía canónica de los receptores tipo Toll (TLR). Apoyando esta posibilidad, el ADNec no incrementó la expresión de CD11b en neutrófilos de ratones deficientes en MyD88, aunque indujo un incremento significativo en neutrófilos de ratones no deficientes ($n=5$; $p < 0,05$). El ADNec (100 $\mu\text{g/ml}$) incrementó la expresión de CD11b en neutrófilos deficientes en TLR9 en niveles similares a los observados en neutrófilos no deficientes. En conjunto nuestros resultados sugieren que el ADN bacteriano estimula a los neutrófilos por una vía CpG- y TLR9-independiente y MyD88-dependiente que podría conducir a activar NF- κ B y AP-1.

99. (492) MECANISMOS TRANSDUCCIONALES INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN MEDIADA POR GM-CSF DE LA PRODUCCIÓN DE IL-8 INDUCIDA POR ADN

BACTERIANO EN NEUTRÓFILOS HUMANOS. FUXMAN BASS JUAN IGNACIO, ALVAREZ MARIA EUGENIA, GEFFNER JORGE R, VERMEULEN MÓNICA, GABELLONI MARÍA LAURA, TREVANI ANALÍA S

IIHEMA - Academia Nacional de Medicina

Previamente demostramos que el ADN bacteriano (ADNb) induce la activación de neutrófilos a través de un mecanismo CpG- y TLR9-independiente, y MyD88-dependiente. También reportamos que el GM-CSF potencia respuestas de neutrófilos CpG-independientes inducidas por ADNb. El objetivo del presente estudio consistió en caracterizar la vías transduccionales involucradas en la potenciación de la producción de IL-8 mediada por el tratamiento de neutrófilos con GM-CSF (15 ng/ml; 30 min) y posterior estimulación con ADN de *E. coli* (ADNec; 100 $\mu\text{g/ml}$). Ensayos de Western blot (WB) indicaron que el GM-CSF incrementó marcadamente la fosforilación de las MAPK p38 y ERK1/2 inducida por estimulación con ADNec. La participación de dichas vías fue confirmada porque el pre-tratamiento de neutrófilos con SB203580 (inhibidor de p38) o PD98059 (inhibidor de MEK), redujo el incremento ejercido por el GM-CSF en la producción de IL-8 inducida por ADNec ($p < 0,01$; $n=4$), mientras que el pre-tratamiento conjunto con ambos inhibidores la inhibió marcadamente ($p < 0,01$; $n=4$). El SP600125 (inhibidor de JNK) incrementó la producción de IL-8 inducida por ADNec en neutrófilos pre-tratados con GM-CSF, sugiriendo que JNK podría modular negativamente la síntesis de IL-8. Mediante ensayos de WB, JNK se encontró fosforilada en neutrófilos estimulados con ADNec y pre-tratados o no con GM-CSF, sin embargo, dicha fosforilación disminuyó a los 60 min post-estimulación con ADNec por efecto del GM-CSF. El GM-CSF también potenció la degradación de I κ Ba inducida por ADNec evaluada por WB. En acuerdo con esta observación, el inhibidor del proteasoma ALLN redujo la potenciación de la producción de IL-8 ejercida por GM-CSF ($p < 0,05$; $n=5$). En conclusión, el GM-CSF potencia la producción de IL-8 inducida por el ADNb a través de mecanismo que involucra un incremento en (1) el nivel de activación de mediadores como p38 y ERK1/2 y (2) la translocación de NF- κ B al núcleo.

100. (559) AMP CÍCLICO: REGULACIÓN NEGATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE IFN-GAMMA CONTRA MYCOBACTERIU TUBERCULOSIS. PASQUINELLI VIRGINIA (1), QUIROGA FLORENCIA (1), JURADO JAVIER O (1), BARNES PETER (2), SAMTEN BUKA (2), GARCÍA VERONICA E (1)

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Laboratorio de Inmunogenética. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (1); Center for Pulmonary and Infectious Disease Control. University of Texas Health Center At Tyler (2)

Ha sido demostrado que el segundo mensajero AMP cíclico (AMPc) es un regulador negativo de la activación de células T. Las concentraciones elevadas de AMPc inhiben la mitogénesis inducida por varios estímulos, incluyendo alo-antígenos, IL-2 y anticuerpos anti-CD4. Interesantemente, los pacientes con tuberculosis presentan altos niveles de AMPc respecto a dadores sanos, pero no se conoce el rol de este segundo mensajero en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. Nosotros encontramos en individuos sanos PPD+ que el tratamiento con forskolina (FSK, activador directo de la adenilato ciclasa) y Bt2cAMP (análogo sintético de AMPc) disminuían significativamente la producción de IFN- γ inducida por *M. tuberculosis* (ELISA, $p < 0,001$), independientemente de la concentración. Mas aun, encontramos una disminución significativa de la producción de TNF- α ($p < 0,05$), así como un incremento de la secreción de IL-10. A fin de determinar el mecanismo por el cual este segundo mensajero produce este desbalance en la producción de citoquinas estudiamos la fosforilación de los factores de transcripción CREB y ATF-2, ambos implicados en la regulación de la producción de IFN- γ por células T que responden a *M. tuberculosis*. Para esto, células mononucleares de sangre periférica proveniente de individuos

PPD+ fueron estimuladas con M. tuberculosis en presencia/ausencia de FSK o Bt2cAMP, se realizaron extractos nucleares y se determinó la expresión total y la fosforilación de CREB y ATF-2 por western blot. Interesantemente, encontramos que el incremento en el AMPc intracelular inhibió la fosforilación de CREB y de ATF-2 inducida por el antígeno, impidiendo así la activación de estos factores de transcripción y posiblemente la unión de los mismos al promotor de IFN- γ . Así, se demuestra por primera vez un rol inhibitorio del AMPc en la generación de respuestas Th1 frente a M. tuberculosis.

101. (552) REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINAS-1 Y -3 EN LINFOCITOS TH1 Y TH2. CAMPAGNA LEONARDO (1), TOSCANO MARTA ALICIA (1), ILARREGUI JUAN MARTÍN (1), BIANCO GERMÁN ARIEL (1), CROCI DIEGO OMAR (1), SALATINO MARIANA (1), FEDEDA JUAN PABLO (2), LEIMBRUBER CAROLINA (3), KORNBLIHTT ALBERTO R (2), RABINOVICH GABRIEL ADRIÁN (1)

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA. (1); Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA. (2); Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC(3)

Recientemente demostramos que células T helper 1 (Th1) y T helper 2 (Th2) poseen susceptibilidad diferencial a apoptosis inducida por galectina-1 (Gal-1) y galectina-3 (Gal-3), dos miembros de la familia de galectinas con afinidad por azúcares β -galactósidos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión diferencial y localización subcelular de Gal-1 y Gal-3 en células polarizadas hacia perfiles Th1 y Th2 e investigar las vías de señalización implicadas. Para ello se polarizaron células mononucleares humanas y murinas hacia perfiles Th1 y Th2, estableciendo por Western Blot una cinética de expresión y secreción de Gal-1 y Gal-3. La localización subcelular se estudió por citometría de flujo, microscopía confocal y electrónica. Las células Th1 humanas presentaron niveles mayores de Gal-1 intracelular (índice de incremento: 1,5) y en sobrenadantes (ii: 2,6) que las células Th2. Resultados que también se observaron en células de ratón polarizadas. Por otro lado, Gal-3 intracelular fue más abundante en células Th2 humanas (ii: 2), no observándose secreción de esta proteína. En ratón ocurrió lo opuesto, siendo los niveles de Gal-3 intracelular mayores en Th1 (ii: 1,6) y detectando niveles bajos de secreción que respetan este patrón. Estos resultados fueron confirmados en un modelo in vivo de inducción de respuestas Th1 y Th2 generadas con PAA (P. acnes antigens) y SEA (S. mansoni egg antigen) respectivamente. Finalmente, mediante el uso de inhibidores selectivos se exploró la participación en este fenómeno de las vías de señalización de ERK1/2, PI-3K/AKT, p38, calcineurina/NFAT y NFKB, para el cual se encontró en ambos genes sitios de unión en las regiones promotoras. Los resultados expuestos demuestran la existencia de una regulación diferencial y coordinada de Gal-1 y Gal-3 en células Th1 y Th2, pudiendo tener relevancia en la sobrevida diferencial y homeostasis de estas poblaciones.

102. (483) DESARROLLO EXPERIMENTAL DE UNA CEPA DE SALMONELLA TYPHIMURIUM RECOMBINANTE PARA UTILIZAR COMO VACUNA ORAL CONTRA EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH). LETICIA BENTANCOR (1)(2), CATARINA BRAGA (3), M.E. SBROGIO-ALMEIDA (3), ROMINA J FERNÁNDEZ BRANDO (1), DANIEL GHIRINGHELLI (2), L.C.S FERREIRA (3), MARINA PALERMO (1).

(1)Inmunología, Academia Nacional de Medicina; (2)LIGBCM, UNQ; Argentina (3)Laboratorio de desarrollo de vacunas, USP, Brasil

El SUH es la complicación más severa de una infección con E.coli productoras de toxina Shiga (Stx). Las vacunas experimen-

tales contra el SUH no fueron efectivas debido, en parte, a que la subunidad B es poco inmunogénica y la subunidad A es tóxica. Nosotros desarrollamos una vacuna a DNA expresando la toxina Stx2 sin su sitio activo conservando los últimos 31aas de la subunidad A y la subunidad B. Los ratones inmunizados con esta construcción, mostraron actividad neutralizante en suero (100% a 15 d.p.v.) y sobrevivieron al desafío (50%). Para optimizar la respuesta inmunológica, y evaluar el papel de la respuesta local en mucosas, se obtuvieron diferentes cepas atenuadas de Salmonella como vector vacunal. Para esto, la misma secuencia fue clonada en un vector de expresión para Salmonella bajo un promotor inducible in vivo. Se obtuvieron tres cepas vacunales: Salmonella typhimurium SL3261 y Salmonella dublin ICB5 (ambas expresan flagelina) y Salmonella dublin SL5928 (no expresa flagelina). Los ratones inmunizados (cuatro dosis de 1×10^{10} UFC por ratón a 0, 7, 14 y 21 días, vía oral), con las cepas que expresan flagelina desarrollaron un título mayor de IgA (13; 30d.p.v. ICB5Stx2DAB= 1399; 2610, SL3261Stx2DAB=3065; 10000, SL5928Stx2DAB=165; 2565, cada valor es un pool de 5 ratones, los controles dieron < 300 en todos los casos). Sin embargo no se detectaron anticuerpos específicos en circulación. Ya que no se observó colonización posterior a las 24hs con ninguna de las cepas vacunales, se realizaron cinéticas de expresión in vitro sugiriendo toxicidad de la proteína para la cepa vacunal, justificando la ausencia de respuesta sistémica (DO600nm de SL3261Stx2DAB a 8hs inducido vs no inducido; 1.87 ± 0.04 vs 8.48 ± 0.03). Estos resultados sugieren que un plan combinado, utilizando un priming con vacunas a DNA y un booster con SL3261Stx2DAB, podría aumentar el porcentaje de sobrevida frente a la infección natural ya que se desarrollaría respuesta local y sistémica.

103. (507) LA INMUNIZACIÓN CON NUEVAS FORMAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS DE TRANS-SIALIDASA PROTEGE A RATONES BALB/C DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR TRYPANOSOMA CRUZI. FONTANELLA GERMÁN H. (1), DE VUSSER KRISTOF (2), DAURELIO LUCAS (1), PEZZOTTO STELLA (1), CONTRERAS ROLAND (2), REVELLI SILVIA (1)

Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas. UNR.(1); Department of Molecular Biomedical Research, University of Ghent, Bélgica (2)

El Trypanosoma cruzi (Tc) expresa trans-sialidasa (TS), enzima que cataliza la transferencia de residuos de ácido siálico desde los glucoconjugados del huésped hacia la superficie del parásito y sería un factor de virulencia importante en la enfermedad de Chagas. Se estudió si la inmunización con nuevas formas de TS -3 inoculaciones vía subcutánea (sc), cada 14 días, $15 \mu\text{g}$ c/u modificaba el curso de la infección experimental con Tc en ratones BALB/c adultos inducida 14 días después de la última inmunización. Todas las formas utilizadas de TS carecen de la cola inmunodominante SAPA: una activa (WT); una reducida en glucanos y activa (OCH1 -Vervecken et al. Appl Environ Microbiol, 70:2639, 2004) y otra reducida en glucanos y mutante en el sitio activo (Mut) la cual demostró un 3.6% de actividad sialidasa y sólo un 4.5% de actividad transferasa. Cada grupo de animales (n=10 c/u) fue desafiado con Tc -100 tripomastigotes, cepa Tulahuén, sc- y en paralelo se realizaron los controles respectivos. Se estudió la repercusión sistémica (mortalidad y parasitemias -14 y 21 días postinfección -dpi-) y respuesta de anticuerpos específicos anti-TS (60dpi). Respecto de la mortalidad se observó: animales inmunizados con WT 2/10, OCH1 0/10, Mut 0/10 y no inmunizados 8/10 (p< 0.001, global). Las menores parasitemias (mediana [rango]) se obtuvieron con la forma Mut: 14dpi: 0[15-0] y 21dpi: 0[19-0], mientras que en animales no inmunizados: 14dpi: 43[80-14] y 21dpi: 102[224-10] (p< 0.001). El nivel de anticuerpos anti-TS fue significativamente mayor en los grupos inmunizados con respecto a los no inmunizados (p< 0.001). La menor severidad de la infección experimental en los ratones inmunizados con las nuevas formas de TS implica una mayor efectividad de la respuesta inmune anti-parasitaria.

104. (431) ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS (MO) POR EL TRATAMIENTO SUBCUTÁNEO DE RATAS CON LEVADURAS MUERTAS POR CALOR (LMC) DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. BARONETTI JOSÉ LUIS, CHIAPELLO LAURA SILVINA, GARRO ANA PAULA, MASIH DIANA TERESA

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. CIBICI-CONICET

En infecciones humanas y experimentales con *Cryptococcus neoformans* se ha demostrado que la respuesta inmune innata, en particular la activación de Mo, constituye un mecanismo central en el control de la diseminación fúngica. Por otra parte, en un modelo de protección desarrollado en nuestro laboratorio, el tratamiento de ratas con LMC emulsificado en adyuvante de Freund completo (AFC), cuatro días previos a la infección intraperitoneal con *C. neoformans*, resulta protectoro contra dicha infección, pero el mecanismo por el cual se produce este fenómeno no ha sido dilucidado. Nuestro objetivo fue evaluar la activación de Mo peritoneales tras el tratamiento con LMC-AFC, que podría contribuir a la protección observada en nuestro modelo. Para tal fin, ratas Wistar fueron tratadas subcutáneamente con LMC-AFC o AFC-PBS como control, y cuatro días después, la producción de citoquinas (IL12, TGF β) fue determinada por ELISA, además distintos marcadores de activación tales como ED2, CD86 y MHC II fueron evaluados a través de citometría de flujo. Por otra parte la funcionalidad de estos Mo fue determinada a través de su capacidad para fagocitar y matar a levaduras de *C. neoformans* en ensayos in vitro. Nuestros resultados demuestran que Mo de ratas tratadas con LMC-AFC poseen un aumento en ED2 ($p < 0,006$) y CD86 ($p < 0,025$), pero no de MHC II, con respecto a Mo de ratas controles. En relación a las citoquinas liberados por los Mo, se observó un aumento en la producción de IL12 ($p < 0,010$) y una disminución en la producción de TGF β ($p < 0,030$) con respecto a los controles. Por otra parte, Mo de ratas tratadas con LMC-AFC poseen una mayor capacidad para fagocitar ($p < 0,050$) y matar ($p < 0,020$) levaduras de *C. neoformans*, que los provenientes de ratas controles. Estos resultados indican que el tratamiento con LMC-AFC activa a Mo peritoneales, con aumento de IL12 y en su actividad fagocítica y anticriptococcica, lo cual podría ayudar a la protección observada en nuestro modelo de protección.

105. (616) AUTOANTICUERPOS EN SINDROME POLIGLANDULAR AUTOINMUNE INFANTIL. CARABAJAL PATRICIA (1), GINACA ALEJANDRA (1), PAPENDIECK PATRICIA (2), GRUÑEIRO LAURA (2), BEZRODNIK LILIANA (1)

Inmunología. Hospital de Niños R. Gutiérrez (1); Endocrinología. Hospital de Niños R. Gutiérrez (2)

El Síndrome Poliglandular Autoinmune (APS) se caracteriza por falla de al menos dos órganos endócrinos asociado o no con órganos no endócrinos, mediado por mecanismos autoinmunes. Se ha reportado que la presencia de autoanticuerpos específicos de cada patología aparecen previo a las manifestaciones clínicas y son de alto valor predictivo para el desarrollo de enfermedad. Objetivo: evaluar un panel amplio de autoanticuerpos en suero de pacientes pediátricos con riesgo de APS. Material: se incluyeron 25 niños, x edad: 11 años (rango: 4-18); 21 mujeres; con una o mas enfermedades autoinmunes órgano específicas y/o historia familiar de autoinmunidad. Métodos: anticuerpos anti islote pancreático (ICA), anti músculo liso (ASMA), anti microsomal de hígado/rinón (LKM), anti mitocondrial (AMA), anti nucleares (ANA), anti célula parietal gástrica (APCA), anti adrenal (AA), anti endomisio (EMA), anti ovario (AO) por IFI; anti Transglutaminasa tisular (TG) por ELISA, anti Glutamato decarboxilasa (GADA) por radiobinding; anti tiroperoxidasa (TPO) por Quimioluminiscencia. Resultados: AA 3/25 (12%); 2 Addison; ICA 15/24 (62%) y GADA 13/20 (65%):10 DBT-1, TPO 12/22 (54%): todos con tiroiditis, LKM 2/25 (8%): ambos hepatitis autoinmune; APCA 4/25 (16%): 1 gastritis no atrofica; EMA/TG 5/22 (23%): 3 celíacos; ASMA 1/25 (4%), ANA 9/25 (36%): ninguno con criterios para enfermedad

autoinmune sistémica; AMA y AO 0%. El 72 % (18/25) de los pacientes asociaron dos o más autoanticuerpos órgano-específicos. 15 pacientes presentaron criterios de APS, siendo la asociación más frecuente tiroiditis y diabetes. En 5 APS y en 5 pacientes con 1 enfermedad autoinmune se encontraron anticuerpos específicos para otras enfermedades sin la clínica correspondiente. Conclusiones: El screening con autoanticuerpos permite identificar aquellos pacientes con riesgo de desarrollar APS.

106. (337) ESPECIFICIDAD DE LOS AUTOANTICUERPOS (AUTOAB) INDUCIDOS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV-A59). DUHALDE VEGA MAITE (1), LOUREIRO MARIA EUGENIA (2), MATHIEU PATRICIA A.(3), RETEGUI LILIA A. (1)

IQUIFIB (UBA-CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica. (1); CEVAN (CONICET) (2); Instituto Leloir (UBA-CONICET) (3)

Hemos demostrado que los ratones infectados con MHV-A59 desarrollan autoAb contra la Fumarilacetato hidrolasa (FAH) hepática. Como existe homología de secuencias entre la FAH y las proteínas virales, los autoAb podrían reflejar una reacción de cruce entre estas proteínas, acompañada o no de la expansión de la respuesta inmune. Para estudiar la especificidad de los autoAb inducidos por el MHV se sintetizaron 206 decapeptidos (técnica del PEPSCAN), que representan la secuencia completa de la FAH murina, los cuales se enfrentaron a sueros de ratones BALB/c luego de 15, 30, 45, 60 o 90 días post-infección. Resultados obtenidos por ELISA utilizando muestras individuales, indicaron: I) ausencia de correlación entre los títulos de Ab anti-FAH y anti MHV y la unión de los autoAb a los péptidos; II) reactividad de los autoAb con ciertas secuencias homólogas (FAH 1-46, 60-92 y 359-378); III) reconocimiento de porciones de la FAH no relacionadas con las proteínas virales (FAH 110-127, 140-187 y 223-232 y 390-420); IV) inexistencia de la expansión de la respuesta inmune. Experimentos realizados con mezclas de sueros corroboraron las observaciones descriptas en los ítems II y III. Además, se inmunizaron ratones con la FAH purificada y se midió la reactividad de los Ab anti-FAH frente a los péptidos sintéticos. Los resultados indicaron que estos Ab se comportaron esencialmente como los autoAb inducidos por el virus, excepto que reconocieron la región FAH 180-200. Se concluye que los autoAb no reconocen sólo secuencias homólogas entre la FAH y el MHV, y que el proceso autoinmune no se debe al fenómeno de expansión de la respuesta. Puesto que la especificidad de los autoAb fue similar a la de los Ab inducidos por la FAH utilizada como inmunógeno, es probable que la respuesta autoinmune esté relacionada con la liberación de adyuvantes naturales - las denominadas "alarminas" -, que permiten eliminar el patógeno pero también promueven la formación de autoAb.

107. (575) INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO EN UN MODELO DE ORQUITIS. GUAZZONE VANESA ANABELLA, JACOBO PATRICIA, LUSTIG LIVIA

Centro de Investigaciones en Reproducción-Facultad de Medicina-UBA

La orquitis autoinmune experimental (OAE) se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfomonocitario intersticial y lesión de los túbulos seminíferos con células germinales que sufren apoptosis y descamación. El reclutamiento de leucocitos dentro de los tejidos está regulado por una serie de interacciones entre los leucocitos circulantes y las células endoteliales (CE). Nos propusimos estudiar, durante el desarrollo de la OAE, la expresión de las moléculas de adhesión celular endotelial CD31 y CD106 así como la expresión de su ligando, específicamente la subunidad CD49d. La OAE fue inducida en ratas por inmunización activa con homogenado testicular y adyuvantes (E). A las ratas del grupo control (C) se les administró solución fisiológica y adyuvantes. Por citometría de flujo se estudió la expresión de CD31 y CD106 en CE aisladas del intersticio testicular y de CD49d en linfomonocitos de sangre (S) y de ganglios (G) de ratas E, C y normales (N)

sacrificadas a diferentes tiempos posteriores a la primera inmunización. Los testículos de ratas con OAE presentaron un mayor porcentaje (%) de CE CD31+ en comparación con las ratas C y N (E=2,37±0,01; C=0,42±0,01; N=0,68±0,04% p=0,03). En dichas células, se observó una mayor intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD106 (E=125,1±6,4; C=60,6±9,3 p=0,05). Por el contrario, durante el período de inmunización la expresión de dicha molécula en los grupos C y E fue similar. La mayoría de las CE de las ratas N no expresaron CD106. Al analizar CD49d se observaron 2 subpoblaciones de linfomonocitos con diferente expresión de esta molécula. El % de linfomonocitos, de S y de G, con alta IFM fue mayor después del período de inmunización aunque no se observaron diferencias entre C y E (S:C=40,4±2,0 vs E=38,6±3,4% p=0,48; G:C=37,4±2,5 vs E=28,2±4,0% p=0,20). Estímulos inflamatorios del microambiente testicular activarían a las CE testiculares a expresar moléculas de adhesión que facilitan la trans migración leucocitaria.

108. (669) IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE GALECTINA-1 EN LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD AUTOINMUNE DESMIELINIZANTE. BIANCO GERMAN ARIEL (1), TOSCANO MARTA ALICIA (1), ILARREGUI JUAN MARTIN (1), CAMPAGNA LEONARDO (1), CORREALE JORGE (2), RABINOVICH GABRIEL ADRIÁN (1)

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. UBA (1); Departamento de Neurología Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de La Infancia (FLENI). (2)

Previamente hemos observado, en diferentes modelos de autoinmunidad, que la terapia génica y proteica con galectina-1 (Gal-1), es capaz de suprimir la respuesta inflamatoria y desviar el balance de citoquinas hacia un perfil Th2. Observamos además que Gal-1 tiene un efecto pro-apoptótico selectivo sobre la población Th1, fenómeno asociado a la glicosilación diferencial de estas dos subpoblaciones. El objetivo del presente trabajo fue investigar la relevancia de Gal-1 endógena en el desarrollo y severidad de la encefalomiyelitis autoinmune experimental (EAE), modelo de inflamación Th1 del sistema nervioso central. R ratones gal-1^{-/-} (ko) o gal-1^{+/+} (wt), fueron desafiados con el antígeno MOG (glicoproteína oligodendrocitaria de mielina) emulsificada en adyuvante completo de Freund. Se observó un mayor grado de compromiso clínico y severidad de la EAE en ratones ko vs wt (Score Clínico: 3,0±0,4 vs 1,8±0,2; p< 0,05), así como también mayor grado de infiltrado inflamatorio y desmielinización en secciones de medula ósea y cerebro teñidos con hematoxilina y eosina y Luxol Fast Blue. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la incidencia y tiempo de inicio de la enfermedad (onset). A los fines de evaluar el perfil de respuesta inflamatoria, se cultivaron células de bazo y ganglios linfáticos de ratones ko o wt, en presencia o ausencia de MOG, y se evaluó la proliferación, apoptosis y producción de citoquinas. Se observó una mayor proliferación (p< 0,01) y secreción de IFN- γ (p< 0,0001) en ratones ko vs wt, resultado que se correlaciona con un mayor porcentaje de células productoras de INF- γ (p< 0,0001). Por otro lado no se observaron diferencias en los niveles de otras citoquinas. El presente estudio revela el papel crítico de Gal-1 endógena en la regulación negativa de la respuesta Th1 patológica in vivo y postula un nuevo blanco terapéutico en la enfermedad desmielinizante.

109. (555) VARIACIONES EN LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS EN EL TESTÍCULO DE RATAS DURANTE EL DESARROLLO DE UNA ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE). JACOBO PATRICIA, THEAS MARIA SUSANA, GUAZZONE VANESA ANABELLA, RIVAL CLAUDIA, LUSTIG LIVIA

Centro de Investigaciones en Reproducción-Facultad de Medicina-UBA

Con el objetivo de estudiar el papel de los linfocitos en la inducción de la lesión testicular en un modelo de OAE, se analiza-

ron las variaciones en las subpoblaciones linfocitarias del testículo por citometría de flujo. La OAE fue inducida por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes (E). Las ratas controles (C) fueron inyectadas solo con adyuvantes. Las ratas fueron sacrificadas a los 30 (período de inmunización), 50 (lesión focal) y 80 (lesión severa) días (d) luego de la primera inmunización. El marcador CD45 fue utilizado para identificar los leucocitos totales en el intersticio testicular. En dicha población se estudió la expresión de CD4, CD8 y CD25. Un aumento en el % de células CD45+ fue observado en ratas E vs C a los 50 y 80 d (50 d: E: 20.68±1.93*, C: 3.97±0.60; 80 d: E: 13.30±1.53*, C: 5.94±0.60, p< 0.001). Durante el período de inmunización, no se detectaron diferencias en los % de células CD4+ y CD8+ en ratas E y C, predominando la subpoblación CD8+ (CD4: E: 1.27±0.16, C: 1.15±0.21; CD8: E: 3.87±0.27, C: 3.88±0.82). A los 50 días, se incrementó el % de linfocitos en el testículo de ratas E vs C, principalmente la subpoblación CD4+ (CD4: E: 13.25±1.79*, C: 1.55±0.24; CD8: E: 6.32±0.50*, C: 2.12±0.45, p< 0.0001). A los 80 d se observó una disminución en el % de células CD4+ en ratas E 80 d vs E 50 d (80 d: CD4: E: 3.78±0.25, p< 0.01), mientras que no se detectaron diferencias respecto de las células CD8+. Incrementos en los % de células activadas CD25+ fueron detectados a los 50 y 80 d en ratas E vs C (50 d: E: 1.73±0.15*, C: 0.74±0.08; 80 d: E: 0.66±0.08*, C: 0.28±0.04, p< 0.01). Resultados preliminares indican un aumento en el % de células CD25+ FoxP3+ en ratas E vs C. Las variaciones temporales en las subpoblaciones linfocitarias durante el desarrollo de la OAE sugieren un papel selectivo de las células CD4+ en la inducción de la lesión testicular mientras que las células CD8+ predominarían en la etapa de inflamación crónica.

110. (719) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CX3CR1 EN LA MICROGLIA POR INTERLEUQUINA 4. SORIA JAVIER, ARROYO DANIELA, IRIBARREN PABLO

CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Córdoba. Argentina

Las células de la microglia (CM) se encuentran en estado de reposo y se activan rápidamente cuando contactan con señales pro-inflamatorias. El rol propuesto para la quimioquina CX3CL1 (fractalquina) en el control de la activación de la microglia mediada por neuronas y en la infiltración leucocitaria del tejido nervioso, establece que CX3CL1 y su receptor CX3CR1 serían muy importantes en los mecanismos patogénicos de diversas enfermedades neurodegenerativas. En trabajos previos relacionados al efecto de IL-4 sobre CM activadas por LPS o TNF α describimos que IL-4 fue capaz de inhibir la expresión y función de mFPR2, el cual es un receptor quimiotáctico específico para amiloide beta, una molécula patogénica en la enfermedad de Alzheimer. En este trabajo preliminar evaluamos el efecto de IL-4 sobre la expresión de CX3CR1 en CM y/o macrófagos. En estudios de RT-PCR detectamos que las CM expresan constitutivamente el gen CX3CR1 y que luego de la activación de éstas células con TNF α los niveles de CX3CR1 incrementaron (cambio vs. no estimulado: 1.8±0,2 veces; p< 0,01). Posteriormente detectamos que la estimulación de CM con IL-4 suprimió la exacerbación de los niveles de CX3CR1 en CM estimuladas con TNF α (cambio vs. no estimulado: 0.6±0,1 veces; p< 0,01). Además, IL-4 fue capaz de suprimir los niveles constitutivos de CX3CR1 en CM (cambio vs. no estimulado: 0.03±0,01 veces; p< 0,001). Estos estudios preliminares indicarían que IL-4 podría modular la comunicación entre las neuronas y CM mediada por CX3CL1, y que IL-4 sería un blanco molecular potencial para su intervención con fines terapéuticos en patologías del sistema nervioso central.

111. (594) POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA HEPATITIS AUTOINMUNE PEDIÁTRICA TIPO I. PALADINO NATALIA (1), FLORES ANA CLAUDIA (1), FAINBOIM HUGO (2), THEILER GRACIELA (1), SCHRODER TERESA (2), LEVI DIANA (3), REIG MARÍA (4), ARRUVITO LOURDES (1), FAINBOIM LEONARDO (1)

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas (1), Unidad de Hepatología, Hospital de Enfermedades Infecciosas F. J. Muñiz (2), Unidad de Hepatología, Hospital de Gastroenterología Dr. C. Bonorino Udaondo (3), Sección Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires (4)

La hepatitis autoinmune tipo I (HA1) es una enfermedad hepática progresiva caracterizada por la presencia de autoanticuerpos, hipergamaglobulinemia y por su respuesta al tratamiento inmunosupresor. Previamente reportamos que las características clínicas y la susceptibilidad genética difieren entre pacientes pediátricos y adultos, además la enfermedad es más agresiva en pacientes pediátricos (HA1p). También demostramos que los linfocitos CD4+ Th1 y NKT α 24+ están implicados en la inmunopatogénesis de la HA1p asociados con niveles elevados de TGF- β 1. El aumento de esta citocina pro-fibrótica contrastó con niveles normales de la citosina anti-fibrótica IL-10. Con el objetivo de confirmar la implicancia de estas citocinas en la HA1p, investigamos mediante la técnica SSOP (sequence-specific oligonucleotide probing) polimorfismos que afectan los niveles de expresión ubicados en la secuencia señal en el exon 1 del gen de TGF- β 1 (Leu10Pro y Arg25Pro) y en la región promotora del gen de IL-10 (positions -1082G/A, -819C/T y -592C/A). Además, mediante la misma técnica estudiamos en 58 pacientes con HA1p la presencia de los genes KIR, (receptores de las células NK), inhibidores de la citotoxicidad 2DL1-5 y 3DL1-3, y estimuladores 2DS1-5 y 3DS1, junto con los pseudogenes 2DP1 y 3DP1. Resultados: En relación a los controles, los pacientes con HA1p presentan una frecuencia disminuida del alelo 25Pro (asociado con baja producción) del TGF- β 1 ($p=0.0045$, $OR=0.1$). En contraste, no encontramos ninguna diferencia en las frecuencias del polimorfismo Leu10Pro de TGF- β 1 ni en los polimorfismos del promotor de IL-10, tampoco se observaron variaciones en las frecuencias de los genes KIR. En conclusión, estos resultados confirman a nivel genético que la capacidad de producir mayores niveles de TGF- β 1 contribuiría a la mayor agresividad observada en los pacientes con HA1p.

112. (373) IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE TNFRP55 EN LA ARTRITIS REACTIVA. ELIÇABE RICARDO JAVIER, DIEGO ESTEBAN CARGNELUTTI, MARIA SILVIA DI GENARO

Inmunología. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.

La artritis reactiva (ARe) es una sinovitis aséptica que desarrolla luego de infecciones extra-articulares. La patogénesis no es conocida. Los objetivos fueron estudiar el impacto de la deficiencia de TNFRp55 sobre la progresión a ARe luego de la infección oral con *Yersinia enterocolitica*, analizar antígenos bacterianos relevantes e investigar la respuesta inmune en articulación. Ratones C57BL/6 normales y TNFRp55^{-/-} fueron infectados por vía intragástrica con *Y. enterocolitica* O:3 (5x10⁸ UFC). Se estudiaron supervivencia, desarrollo clínico de artritis y cambios histopatológicos en articulación. Se realizaron recuentos bacterianos en ganglio mesentérico (GM), bazo (B) y articulación los días 3, 21 y 52 postinfección. La expresión de RNAm de IFN- γ , TNF- α e IL-10 fue estudiada en GM y articulación por RT-PCR. Anticuerpos a diferentes antígenos de *Yersinia* se estudiaron por ELISA, dot blot y Western blot. Se investigaron en articulación niveles de TNF- α por ELISA, de óxido nítrico (NO) por el ensayo de Griess, y expresión iNOS por Western blot. Se indujo artritis aguda por inyección intra-articular de antígenos bacterianos. La supervivencia fue 100% en ratones wild-type y 60% en ratones TNFRp55^{-/-}. Incrementos significativos en los recuentos bacterianos fueron detectados el día 3 en GM y B de ratones TNFRp55^{-/-} ($p < 0,006$ y $p < 0,04$, respectivamente), y el día 21 en B y articulación ($p < 0,03$). Se observó incremento en la expresión de RNAm de IFN- γ y TNF- α en GM. Ratones TNFRp55^{-/-} desarrollaron artritis severa con incremento intra-articular de TNF- α ($p < 0,05$) y de anticuerpos específicos para proteínas de membrana externa (ME) de *Yersinia*, con disminución en los niveles de NO ($p < 0,02$) y de iNOS. ME

indujo artritis aguda. Se concluye que TNFRp55 media mecanismos inmunes que previenen el desarrollo de ARe. Componentes de la ME son los antígenos relevantes en el desarrollo de ARe. Producción de NO mediada por TNFRp55 participa en la protección a ARe.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN I

113. (663) DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE MASA GRASA Y SU CORRELACION CON ACTIVIDAD FISICA. VIDUEIROS SILVINA MARIELA, GABRIEL TARDUCCI, GABRIELA SALAZAR, ARIEL BARDACH, GUILLERMO MOREA, NORA SLOBODIANIK, MARCELO TAVELLA, ANABEL PALLARO

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Nutrición, UBA; UNL; INTA; Universidad de Chile.

Antecedentes: La composición corporal, particularmente el componente graso, se relaciona con el nivel de actividad física (AF), lo cual no ha sido extensamente estudiado en nuestra población. Objetivo: Determinar el porcentaje de masa grasa (%G), el nivel de AF y el grado de correlación entre ambos en un grupo de alumnas universitarias. Material y métodos: Se determinó el %G por antropometría (A), bioimpedancia (BIA) y agua corporal total por dilución isotópica (DI) en estudiantes universitarias (n: 27). Se determinó la concordancia en la masa grasa obtenida por A (%GA) y por BIA (%GBIA) con respecto al obtenido por agua corporal total por DI (%GDI, método de referencia) usando el Test de Bland y Altman. Se calculó el nivel de AF y el gasto energético por cuestionario IPAQ corto asociándolo con %G. Resultados: Se encontró diferencia significativa en %G por los diferentes métodos (%GA: 28.5 ± 4.8 , %GBIA: 29.1 ± 6.4 y %GDI: 24.7 ± 6.4 , ANOVA $p < 0.05$). Las diferencias promedio en %G comparado con DI fue $4,2 \pm 5,8$ y $4,3 \pm 5,7$ para A y BIA. El gasto energético semanal promedio fue 1984 ± 1582 kcal/sem con 38% de población inactiva y 12.5% saludablemente activa. AF se correlacionó con %GDI con r: 0,67, con %GA con r: 0,2 y con %GBIA con r: 0,2. Conclusión: El %G por DI mostró diferencias respecto a %G por A y por BIA. El nivel de gasto energético semanal es bajo, con alta prevalencia de sedentarismo y se correlaciona con %GDI. La implementación de programas y estrategias de promoción de actividad física en esta población parece ser altamente necesaria. Financiado por UBACYTB120

114. (636) CONDUCTAS ALIMENTARIAS EN LA OBESIDAD Y SOBREPESO INFANTO-JUVENIL. BONZI NATALIA, PÉREZ BEATRIZ, BRAVO LUNA MARTA

Dept. Cs. Fisiológicas-Biofísica, Fac. Cs. Médicas-UNR Cát. de Medicina Preventiva y Social, Fac. Cs. Médicas, UNR CIUNR

Introducción: Obesidad y sobrepeso infanto-juvenil son problemas de salud pública mundial, coexistiendo con malnutrición. Su importancia es convertirse en factor de riesgo de enfermedades crónicas no-transmisibles en adultez. Objetivo: Determinar prevalencia de sobrepeso/obesidad en escolares de colegio privado (CP) y escuela pública (EP) (Rosario, SF), características socio-económico-culturales opuestas. Metodología: Observacional, descriptivo simple. Muestreo simple aleatorio: EP, n=79, CP, n=58, 1^o-6^o EGB, ambos sexos. Estado nutricional (Lejarraga): Peso/Talla (P/T). Peso Normal (PN): +1,-1 DE; Bajo P (BP): < -1 DE; Sobre P (SP): > +1, +2 DE, Obesidad (O): > +2 DE. Talla/Edad (T/E): Talla Normal (TN): = percentilo (P) 10; T Baja (TB): < P10; T Muy baja (TMB): < P3. Ingesta calórica (IC), macro-nutrientes, frecuencia consumo alimentos (FCA), actividad física (AF), sedentarismo (S). Resultados: Prevalencias (% PN, BP, SP, O): EP: 74,7;10,2;11,4;3,7; CP: 76,2;9,9;10,4;3,5. TN, TB, TMB: EP: 90,1;7,4;2,5 respectivamente. CP: 91,5;8,8;3,5. Diferencias significativas EP/CP: IC, Carbohidratos (CH) y Proteínas Alto Valor Biológico (PAVB). Alto consumo Proteínas Totales (PT) ambas

escuelas: 3 gr/kg P. PAVB (media %): CP, 63,7; EP 55,6. Alto consumo Hierro (Fe) ambas escuelas, mayor EP. Correlaciones significativas: P/T con IC varones CP; CH/IC, PT/IC y Grasas/IC, ambas escuelas. Difer. significativas EP-CP: FCA y AF; horas dedicados a TV y videojuegos, varones ambas escuelas. Significado admitido $p < 0,05$. Conclusiones: 1. Prevalencias SP, O y BP semejantes en ambas escuelas. 2. Consumo alto PT podría ser nocivo para la salud escolar (sobrecarga renal). Escolares EP consumen menos PAVB que CP. 3. Mayor consumo Fe en EP se debería a predominio de Fe no-hem. 4. Inadecuadas conductas alimentarias: Alto consumo CH, Grasas, snack y alto nivel sedentarismo, marcado en EP.

115. (267) INDICADORES DE SOBREPESO Y OBESIDAD EN NIÑOS DE DOS CIUDADES DE ARGENTINA. PONCE GRACIELA MABEL, FAJARDO MARÍA ANGELICA, SEBASTIAN GABRIEL, RODRIGUEZ PATRICIA, FRIEDMAN SILVIA MARIA

CRIDECIT. Fac.Cs.Naturales, Universidad Nacional de La Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB) Centro de Promoción Barrial "Isidro Quiroga". Municipalidad de Comodoro Rivadavia (MCR). Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires (UBA).

Dado el efecto negativo que tiene el sobrepeso y obesidad en la salud, el objetivo de este trabajo fue calcular el IMC, indicadores antropométricos y la composición corporal en un grupo de niños de dos ciudades de nuestro país. Fueron evaluados preescolares y escolares que concurrían a dos centros municipales de Salud de Comodoro Rivadavia (CR) $n=99$ y Gran Buenos Aires (GBA) ($n=65$) de edades entre 2 y 8 años. Se pesaron y midieron con consentimiento informado de los padres. Se calcularon los índices: masa corporal (IMC) y antropométricos (ZP/T, ZT/E, ZP/E) y se midió por bioimpedancia el % de masa grasa. Se consideró como punto de corte para el IMC percentilo (Pc) $>$ a 85 (sobrepeso) y $>$ a 95 (obesidad). Los resultados se expresaron como mediana, Q25 y Q75 en CR y GBA respectivamente: edad (años): 7 (5-7); 5 (5-6), IMC (kg/m^2) 19,12 (18,76-21,42); 18,75 (18,43-19,93), ZT/E: 0,78 (0,23-1,57); 1,64 (1,44-1,87), ZP/E 2,04 (1,63-2,89), 1,64(1,44-1,87); ZP/T 2,03 (1,92-3,39); 2,14 (1,32 y 2,38). En CR y GBA el % de niños con IMC en Pc 85 fue: 36 y 31 y para Pc 95: 64 y 69, respectivamente. En CR el IMC correlacionó con: ZP/E ($r=0,6$; $p < 0,05$), ZP/T ($r=0,9$; $p < 0,01$) y % grasa ($r=0,99$; $p < 0,01$). Además el % grasa se asoció con: ZP/E ($r=0,6$; $p < 0,01$) y ZP/T ($r=0,9$; $p < 0,01$). En GBA el ZP/T correlacionó con: IMC ($r=0,9$; $p < 0,01$) y % grasa ($r=0,5$; $p < 0,05$). El ZP/E se asoció con ZT/E ($r=0,9$; $p < 0,01$). Conclusión: el IMC resultó ser un adecuado criterio en el diagnóstico de sobrepeso y obesidad para el grupo estudiado, ya que se correlacionó con la cantidad de grasa corporal y con los indicadores antropométricos Z P/E y Z P/T en ambos grupos. Los % de niños con sobrepeso y obesidad en CR y GBA fueron semejantes y además similares a los publicados en la literatura. Actuar sobre los factores de riesgo que predisponen a sobrepeso y obesidad debe ser una prioridad sanitaria.

116. (659) PRESENCIA DE DISLIPEMIA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES DE LA CIUDAD DE BALCARCE. VERONA JULIAN (1,2), GONZALEZ CLAUDIO (3), GILLIGAN LISANDRO (4), GIMENEZ CECILIA (1), LOMBARDO SUSANA (1), BAENZ ADRIANA (1), DIVITA VIRGINIA (1), BRITES FERNANDO (2)

Hospital Subzonal de Balcarce Dr. Felipe A. Fossati (1). Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (2). Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA. (3) Subsecretaría de Deporte y Recreación de la Municipalidad de Balcarce (4).

La aterosclerosis comienza en las etapas más tempranas de la vida. No obstante, los datos sobre factores de riesgo aterogénico en población infantil son escasos. Nuestros objetivos fue-

ron evaluar la prevalencia de dislipemia en niños y adolescentes de Balcarce y analizar su asociación con factores de riesgo cardiovascular. Se estudiaron 533 varones (7-14 años). Se evaluaron peso, altura, circunferencia de cintura, presión arterial diastólica y sistólica, frecuencia cardíaca, horas de actividad física semanales, tabaquismo, e historia familiar de enfermedad cardiovascular prematura y/o diabetes. Se midieron niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos (TG), colesterol total (CT), C-HDL y C-LDL (métodos estandarizados). Los datos fueron analizados mediante test de χ^2 , correlación de Spearman, y regresión logística univariada y múltiple. Se hallaron las siguientes concentraciones de TG (Mediana/IQR) 72/49-83mg/dl, CT (Mediana \pm DE) 158 \pm 29mg/dl, C-HDL 55 \pm 11mg/dl y C-LDL 88 \pm 28mg/dl. El 23,5% de los individuos (IC95; 19,8-27,1%) presentó dislipemia (TG $>$ =150mg/dl y/o C-HDL $<$ 40mg/dl y/o C-LDL $>$ =110mg/dl). Asimismo, se observó que el 3,4% (1,8-5,0%) mostraba TG $>$ =150mg/dl, el 4,5% (2,7-6,4%) C-HDL $<$ 40mg/dl y el 18,2% (14,8-21,6%) C-LDL $>$ =110mg/dl. En el análisis univariado, la presencia de dislipemia correlacionó directamente con la edad y la frecuencia cardíaca e inversamente con las horas de deporte (excluidas las de gimnasia escolar). En el modelo logístico, persistieron asociadas significativamente con dislipemia tanto la frecuencia cardíaca (OR=1,03 por latido; $p < 0,01$), como las horas de deporte (OR=0,99 por hora; $p < 0,05$). La hipercolesterolemia fue la dislipemia más frecuente en niños y adolescentes de Balcarce, observándose asociación directa con frecuencia cardíaca e inversa con ejercicio físico. Los datos presentados destacarían, a su vez, la relevancia de la realización de actividad física extraescolar en la prevención de la dislipemia.

117. (596) ACTIVIDAD DE ADENOSINA DEAMINASA EN SUERO DE NIÑOS OBESOS. FELIU MARÍA SUSANA, PERRIS PAULA, BARBEITO SUSANA, STRASNOY IRENE, DURAN PABLO, FERRARO MABEL, RAMOS OLGA, SLOBODIANIK NORA

Cátedra de Nutrición-Fac.de Farmacia y Bioquímica,UBA; Servicio de Nutrición y Diabetes. Hospital Pedro de Elizalde

Introducción: En trabajos previos, hemos demostrado en suspensión de timocitos de rata en período de crecimiento activo, la rápida respuesta de la actividad de Adenosina Deaminasa (ADA) a los desequilibrios nutricionales. Además, se ha reportado su aumento en suero de pacientes inmunocomprometidos. Anteriormente, hemos observado que niños obesos presentan modificaciones en algunos parámetros inmunológicos. Objetivo: Determinar la actividad de ADA en suero de niños obesos. Material y Métodos: Se estudiaron 33 niños de ambos sexos entre 5 y 13 años de edad, con obesidad según IMC (grupo O) . Sobre suero se determinó la actividad de ADA(U/L) por el método de Giusti y Galanti .Como valores de referencia se utilizaron los hallados para niños del mismo grupo etario, utilizando idéntica metodología (grupo C). Resultados: Los datos obtenidos son: Grupo O: 27.1 \pm 9.1; grupo C: 23.0 \pm 5.6. Al comparar los resultados aplicando el test de Student, se observa aumento estadísticamente significativo ($p < 0,02$) en la actividad de ADA en el grupo O. Conclusiones: Este hallazgo apoyaría la hipótesis de proponer la determinación de la actividad de Adenosina Deaminasa en suero, como un indicador funcional relacionado con los mecanismos de defensa, en los estudios de nutrición. Parcialmente financiado por SECYT, UBA, B-060.

118. (464) CARACTERÍSTICAS DE VLDL CIRCULANTE EN EL SÍNDROME METABÓLICO CON ESTEATOSIS HEPÁTICA. ZAGO VALERIA (1), CACCIAGIÙ LEONARDO (1), DE LARRAÑAGA GABRIELA (2), GRAFFIGNA MABEL (3), FAINBOIM HUGO(2), PERÉS WINGESER SILVINA (2), BELLI SUSANA(3), BERG GABRIELA (1), LEVALLE OSCAR (3), SCHREIER LAURA (1)

Lab de Lípidos y Lipoproteínas, Depto de Bioquímica Clínica, FFYB, UBA (1) Lab de Hemostasia y Trombosis y Unidad de Hepatología, Hospital Muñiz (2) División de Endocrinología, Hospital Durand (3)

El síndrome metabólico (SM) se asocia frecuentemente a esteatosis hepática no-alcohólica. No está dilucidado si el perfil lipídico y las características de VLDL en el SM varían ante la presencia de esteatosis. En el SM ocurre sobreproducción de VLDL, debido en parte a la hiperinsulinemia, pero habría algún defecto en el ensamblaje o secreción de VLDL que conduce a la esteatosis, generando quizás VLDL circulantes atípicas. El objetivo fue estudiar pacientes con SM, con y sin esteatosis. Se obtuvo sangre de 26 pacientes con diagnóstico de SM y ecografía hepática. Pacientes con ecografía grado 3 de esteatosis, fueron confirmados por biopsia (E+, n=16). Los 10 restantes con ecografía normal, se consideraron controles (C). Se evaluó el grado de insulino-resistencia con HOMA (media±DS, E+: 4,6±2 y C: 3,4±2, p=0,15) y cintura (E+: 107±10 y 97±10, p=0,06). Se midió el perfil lipídico, ácidos grasos libres (FFA), y la composición química de VLDL aislada $d < 1006$ g/ml. No hubo diferencia en colesterol, triglicéridos (TG), col-HDL y col-LDL entre E+ (215±36, 190±158, 38±9, 149±34, mg%) y C (187±57, 115±43, 42±8, 122±45) respectivamente, $p > 0,10$. E+ presentó una tendencia a mayor nivel de FFA (0,77±0,36 μ M) que C (0,53±0,18), p=0,06. En ambos grupos, col/TG-VLDL fue semejante (0,32±0,16 vs 0,31±0,10, p=0,831). VLDL en E+ mostró mayor contenido de proteínas (5,0±3,0 vs 2,8±1,0, p=0,042), a expensas de apo B (3,9±3,0 vs 2,0±1,0, p=0,045). No hubo diferencias en el tamaño de VLDL, estimado por TG/proteínas (E+6,77±5,10 vs C 8,03±4,87, p=0,54). Se obtuvo una correlación positiva entre FFA y apo B-VLDL (r=0,49 p=0,016), en cambio no fue significativa la asociación entre FFA y TG-VLDL (r= 0,014). La presencia de esteatosis en los pacientes con SM no se refleja en el perfil plasmático lipídico-lipoproteico. El aumento de apo B-VLDL indica un mayor número de partículas secretadas, las cuales estarían inducidas por el incremento en el flujo de FFA al hígado.

119. (578) ACTIVIDAD DE GLUCOQUINASA HEPÁTICA EN RATAS CON INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA.
MASSA LAURA, LENZEN SIGURD, GAGLIARDINO JUAN JOSE

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada Instituto de Bioquímica Clínica, Hanover, Alemania Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada

La actividad de glucoquinasa (GK) hepática es modulada por una proteína reguladora (PR) nuclear que al unirse a la fructosa-1-P induce traslocación y activación de la enzima. En células productoras de insulina, la actividad de GK es regulada por la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK2). Se desconoce como actúan estos mecanismos in vivo en condiciones normales y patológicas. Objetivo: Evaluar el efecto de la insulino-resistencia (IR) inducida por dieta rica en fructosa (DRF) y de la PFK2 sobre la actividad de GK hepática. Metodología: Alimentamos ratas Wistar adultas con dieta comercial sin (C) o con el agregado de fructosa (F) al 10% en el agua de bebida. A los 21 días medimos glucemias (G), triglicéridemias (TG) e insulinemias (I). Posteriormente extrajimos el hígado para 1) determinar niveles de ADNc de GK y PFK2 (RT-PCR) y 2) separar las fracciones citoplasmática (FC) y nuclear (FN) (homogeneización y centrifugación a 600 g) e incubar la FN con digitonina (40 μ g/ml). En las fracciones FC y FN medimos actividad de GK (espectrofluorimetría) y expresión de GK y PFK2 (Western blot). Resultados: (F vs. C): G 148 ± 4 vs. 129 ± 5 mg%, $p < 0,05$; TG 113,9 ± 7 vs. 67,6 ± 7 mg/dl, $p < 0,001$; I 4,4 ± 0,6 vs. 2,7 ± 0,5 ng/ml, $p < 0,02$; actividad de GK citoplasmática respecto actividad total (% C/T) 85,5 ± 2,6 vs. 32,8 ± 1,7, $p < 0,001$. La expresión de GK en FC fue similar en ambos grupos, pero no se detectó GK en la fracción FN del grupo F. La expresión de PFK2 en FC fue mayor en las ratas F (500 vs.100%). La transcripción de GK y PFK2 fue similar en ambos grupos: (F vs. C), GK: 55,5 vs. 57,2%; PFK2: 45 vs. 42%. Conclusiones: La IR inducida por DRF aumenta la

actividad de GK hepática promoviendo su traslocación al citoplasma y su interacción con la PFK2 sin afectar su expresión; ésta es la primera demostración in vivo del efecto modulador de PFK2 sobre la actividad de GK hepática.

120. (207) ROL DE LA MTNOS EN UN MODELO DE SÍNDROME METABOLICO EN RATONES Ob-/-. HOLOD SILVIA(1,2), FINOCCHIETTO PAOLA (2, 3), BARREIRO FERNANDO (2), CARRERAS MARIA CECILIA (1,2), PODEROSO JUAN JOSE (2, 3)

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (1), Laboratorio Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas JSM (2), Departamento de Medicina (3), Universidad de Buenos Aires.

El síndrome metabólico se asocia a resistencia insulínica, aumento del tejido adiposo y anormalidades mitocondriales. El óxido nítrico (NO), molécula de señalización celular y mitocondrial, modula la transferencia de electrones y el consumo de oxígeno. En nuestro laboratorio demostramos que insulina aumenta y leptina disminuye la actividad de mtNOS. Objetivo: estudiar la modulación de la actividad y expresión de la mtNOS en el modelo de síndrome metabólico de ratones Ob -/- (deficientes de leptina) con y sin suplemento de leptina. Métodos: Ratones Ob -/- y C57BL/6 (6-9 meses) fueron subdivididos en 4 grupos: control, Ob-/-, control + leptina, Ob + leptina (6ug c/12hs intraperitoneal durante 4 días): Se extrajo grasa de periepidídimo, aislándose y purificándose las mitocondrias por centrifugación diferencial. El NO mitocondrial fue determinado por citometría de flujo y la expresión de mtNOS por Western Blot y RT-PCR. Las actividades de los complejos I-IV mitocondriales fueron medidos por espectrofotometría. El complejo I fue separado por un gel de poliacrilamida (BNPAGE). La nitración de tirosina se determinó por Western Blot. Resultados:1) Las mitocondrias de Ob-/- presentan el doble de actividad y expresión de mtNOS con respecto a controles. La actividad del Complejo I disminuyó 81% detectándose nitración de tirosina en sus componentes con respecto al control ($p < 0,05$); no hubo diferencias en las actividades de los complejos II-III y IV.3) Suplemento con leptina a Ob-/- normalizó las actividades de mtNOS y del complejo I reduciendo la nitración de tirosinas (2-3 veces). Conclusiones: a) Altas concentraciones de NO mitocondrial en tejido adiposo de los Ob-/- conduciría a nitración del complejo I, disminución de su actividad y reducción del consumo de oxígeno contribuyendo a la obesidad. b) En este modelo de síndrome metabólico, el hipometabolismo mitocondrial dependería del balance entre resistencia insulínica y la deficiencia de leptina.

ONCOLOGÍA II

121. (80) RESPUESTA IMMUNE HUMORAL ANTI-MUC1 EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEZA Y CUELLO. CROCE MARÍA VIRGINIA, RABASSA MARTÍN, PEREYRA ADRIÁN, SEGAL-EIRAS AMADA

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

Objetivo: estudiar la expresión de MUC1 tisular y sérica en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) y los anticuerpos libres y acoplados anti-MUC1. Se estudiaron 53 pacientes con CECC, 26 con tumores de la cavidad oral, 17 de laringe y 10 de faringe. Tres pacientes con estadio I, 5 con estadio II, 15 con estadio III y 30 con estadio IV. La expresión tumoral de MUC1 se evaluó mediante inmunohistoquímica empleando los anticuerpos CT33, contra la cola citoplasmática (CT) y C595 contra el centro proteico extracelular. Los niveles séricos de MUC1, de anticuerpos libres anti-MUC1 y complejos inmunes circulantes anti-MUC1 (MUC1-CIC) fueron detectados por ELISA. Se compararon los resultados con la edad, sexo, localización, estadio y diferenciación tumoral. Análisis estadístico: análisis de

componente principal (PCA), test de ANOVA y correlación no paramétrica (Tau de Kendall), $p < 0.05$. Resultados: La CT-MUC1 se detectó en 40/50 (80%) muestras y el centro proteico en 9/50 (18%); niveles elevados de MUC1 sérica se observaron en 8/53 (15%) pacientes. Se halló una correlación estadísticamente significativa entre los niveles séricos de MUC1 y los anticuerpos libres anti-MUC1 de tipo IgG, pero se halló correlación negativa con anti-MUC1 de tipo IgM. El análisis multivariado mostró una correlación inversa entre tumores pobremente diferenciados y la MUC1 sérica, en tanto que fue positiva respecto de la diseminación ganglionar y el tamaño del tumor. Conclusiones: La MUC1 producida y liberada a la circulación por el tumor sería capturada por anticuerpos de tipo IgG anti-MUC1 formando MUC1-CIC. Asimismo, los tumores pobremente diferenciados se correlacionan inversamente con la detección de MUC1 tumoral y sérica.

- 122. (140) EFECTO DE ω -3 Y ω -6 APORTADOS POR SALVIA HISPANICA Y CARTHAMUS TINCTORIOS, RESPECTIVAMENTE, SOBRE LA LIBERACIÓN DE EICOSANOIDES, APOPTOSIS E INFILTRACIÓN DE LINFOCITOS T EN UN ADENOCARCINOMA MURINO.** ESPADA COSTANZA ELEONORA (1), BERRA MARÍA ALEJANDRA (1), BRUNOTTO MABEL (2), EYNARD ALDO RENATO (1), PASQUALINI MARIA EUGENIA (1)

Instituto de Biología Celular. 1° Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba (1) Cátedra de Biología Celular. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba (2)

La respuesta inmune mediada por linfocitos T y la apoptosis son mecanismos antitumorales. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y los eicosanoides derivados modularían el tipo y magnitud de estos procesos. Sin embargo, los mismos no han sido aún dilucidados. Objetivo: Determinar los efectos de PUFAs aportados por aceite de Chía (ω -3)(Ch) y Cártamo (ω -6)(Ca) sobre la liberación de eicosanoides y su relación con infiltración linfocitaria (IL) y apoptosis en un tumor transplantable de mama murino. Métodos: Ratones BALB/c fueron alimentados con dietas enriquecidas con 6% de Ch y de Ca y dieta comercial (Co). Se analizó el perfil lipídico de membranas de células neoplásicas (CN) por cromatografía de gas y los eicosanoides 12-HETE y 12-HHT por HPLC. Se evaluó la apoptosis por citometría de flujo (CF) con Anexina V-FITC y por conteo de figuras apoptóticas en cortes histológicos. La IL se evaluó utilizando anti-CD3-FITC y oro coloidal a través de CF y microscopía de luz, respectivamente. Los resultados se analizaron por ANOVA y test LSD, $\alpha = 0.05$. Resultados: CN del grupo Ch presentaron un porcentaje menor de ácido araquidónico (AA) (8.79) y mayor de ácido eicosapentaenoico (2.40) respecto a Ca (20.52 y 0.85) y Co (16.61 y 0.83). Las CN de Ch liberaron menos 12-HETE y 12-HHT (11.59 y 85.91 ng/10¹⁰ cél.) que las de Ca (143.05 y 135.58) y Co (39.17 y 160.37) ($p < 0.05$). La apoptosis en Ch por CF y por conteo aumentó (16.98% y 25.88) respecto a Ca (12.77% y 12.50) y Co (6.32% y 15.75) ($p < 0.05$). El n° de mitosis disminuyó en Ch (16.88) respecto a Ca (28.25) y Co (31.38) ($p < 0.05$). La IL fue mayor en Ch en relación a Ca y Co por CF (Ch=19; Ca=3.87 y Co=0.89) y por inmunohistoquímica (Ch=35.5; Ca=23.06 y Co=4.23). Conclusión: La suplementación dietaria con aceite de Chía (ω -3) inhibe el crecimiento tumoral por disminución de los eicosanoides y el incremento de la infiltración linfocitaria tumoral promoviendo un aumento en el balance apoptosis/mitosis.

- 123. (155) DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES NEUTRALIZANTES DE LA ACCIÓN MITOGÉNICA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (bFGF) COMO AGENTE ANTI-ANGIOGÉNICO.** GÓNGORA ADRIÁN, MLADOVAN ALEJANDRO, GÓMEZ MARTÍN, UDOVÍN LUCAS, SORDELLI ALINA, BALDI ALBERTO

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)

La angiogénesis es considerada un factor limitante en el crecimiento tumoral y es regulada por el balance entre factores pro y anti-angiogénicos. El VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular) y el bFGF son considerados los principales inductores de la angiogénesis. Como parte de un proyecto de terapia combinada tendiente a controlar la angiogénesis tumoral a través del bloqueo de ambos factores, en este trabajo describimos la generación y selección de AMs neutralizantes de la capacidad mitogénica del bFGF humano sobre células endoteliales (HUVEC). El bFGF humano fue clonado, expresado en *E. coli* y purificado. Su máxima actividad biológica in vitro sobre la proliferación de HUVEC se observó a una concentración de 10 ng/ml, similar a un bFGF de origen comercial. Ratones BALB/c fueron inmunizados con el bFGF conjugado con BSA. Los esplenocitos de animales con máxima respuesta fueron fusionados con células de mieloma NS0. Los hibridomas resultantes se seleccionaron por ELISA en función del reconocimiento del bFGF y los clones positivos fueron evaluados en cuanto a su efecto inhibitorio sobre la proliferación de HUVEC estimuladas con bFGF. Aquellos que exhibieron una inhibición específica fueron seleccionados y sus AMs se purificaron. Se determinó la concentración inhibitoria (IC50) sobre la proliferación de HUVEC obteniendo los siguientes valores: DB3= 33 ± 5 ng/ml, DA2= 76 ± 7 ng/ml y CC12= 186 ± 11 ng/ml. Los dos AMs con menor IC50 fueron caracterizados según su isotipo (ambos IgG1) y afinidad por ELISA de competencia, obteniendo valores estimados de Kd de 1,2 nM y 2,5 nM para el DB3 y DA2, respectivamente. El Fab correspondiente al hibridoma DB3 fue clonado y secuenciado. En el presente, estamos evaluando los efectos anti-angiogénicos y antitumorales de DB3, solo y en combinación con otro AM contra VEGF previamente desarrollado, en un modelo de ratones atímicos inyectados con líneas derivadas de melanomas humanos.

- 124. (164) MODIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL MELANOMA B16 ASOCIADA A LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ACIDO SIÁLICO GLICOLILADO (NEUGC) EN LA SUPERFICIE CELULAR.** OTERO LAURA, GABRI MARIANO, SEGATORI VALERIA, GOMEZ DANIEL, ALONSO DANIEL

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes

Los ácidos siálicos son componentes esenciales del glicocáliz considerados antígenos tumorales, que participan en adhesión, migración y señalización celular. En este trabajo, se evaluaron en el melanoma B16 los efectos del agregado de mucina rica en NeuGc, un residuo escaso en la superficie de las células tumorales murinas. Se preincubaron células B16 en presencia de mucina (B16-mucina) en dosis de 250-500 ug/ml y se estudió su comportamiento in vitro e in vivo. El agregado de mucina incrementó durante al menos 24-48 h la presencia de NeuGc en la superficie celular detectado con el anticuerpo específico 14F7 y aumentó la adhesión celular in vitro ($p < 0.01$). Al ser inoculadas in vivo en ratones singénicos C57BL/6, las células B16-mucina tuvieron una latencia tumoral más corta luego del desafío s.c. (B16: 12.8 ± 1.6 vs B16-mucina: 8.4 ± 0.6 días; $p < 0.01$) y mostraron una mayor capacidad para formar metástasis pulmonares por vía i.v. (B16: Md 7, rango 0 a 13 vs B16-mucina: 11, 2 a 23 nódulos/ratón; $p < 0.05$). Por otra parte, se logró transferir y sobreexpresar en B16 la secuencia murina de la CMP-NeuAc hidroxilasa (B16-hidroxilasa), enzima responsable de la síntesis de NeuGc. Las células B16-hidroxilasa mostraron una mayor proliferación y un aumento de la adhesión in vitro respecto de las B16 control ($p < 0.001$). In vivo, la latencia tumoral de B16-hidroxilasa fue más corta (9.2 ± 0.5 días; $p < 0.05$), de manera similar a lo observado en las células B16-mucina. Por el contrario, la capacidad metastásica de las células B16-hidroxilasa resultó dramáticamente disminuida (0, 0 a 2 nódulos/ratón; $p < 0.001$). Se concluye que la presencia de residuos de NeuGc modificaría el comportamiento de este melanoma murino. Los resultados sugieren un efecto diferencial sobre la capacidad metastásica de las células B16 al sobreexpresar la enzima encargada de sintetizar NeuGc respec-

to de la incorporación exógena de este residuo a través de mucinas.

125. (165) ROSIGLITAZONA SE OPONE AL EFECTO INHIBITORIO QUE EJERCE BCG SOBRE EL CRECIMIENTO DE TUMORES DE VEJIGA. ROL DE LOS MACRÓFAGOS. LODILLINSKY CATALINA, CWIRENBAUM RUTH, EIJÁNA ANA MARIA

Instituto Angel H. Roffo

Se ha postulado que compuestos hipoglucemiantes entre los que se encuentra la rosiglitazona (RO) pueden inhibir el crecimiento de ciertos tumores por mecanismos dependientes de receptores activadores de la proliferación de peroxisomas subtipo gamma (PPARG). Anteriormente demostramos que estos receptores están involucrados en la inhibición del crecimiento células de cáncer de vejiga (CaV) inducido por BCG (terapia convencional del CaV). Observamos que BCG induce la expresión de PPAR g y que RO potencia in vitro la inhibición del crecimiento inducida ella. Nuestro objetivo es evaluar el efecto de RO sobre el crecimiento tumoral in vivo y estudiar su mecanismo biológico. Se evaluó el crecimiento tumoral por inoculación sc de 5×10^5 células MB49 en ratones C57BL/J6, bajo tratamiento con BCG (2mg/ml) sólo o combinado con RO (8mg/kg/ratón). Los MAC son las principales células involucradas en la terapia con BCG por eso evaluamos la activación de MAC peritoneales determinando a) producción de óxido nítrico (NO) con el reactivo de Griess expresado en nmol/106 MAC b) actividad metabólica mediante ensayo de MTS (expresado en $A492nm \times 10^3$) y c) capacidad para fagocitar BCG mediante coloración de Zielh Nielsen (expresado como nro de BCG/MAC). Los resultados se expresan como media \pm DS, $n=10$, la significación estadística entre grupos BCG y BCG+RO fue en todos los casos $p < 0.01$ mediante t de Student. Nuestros resultados indican que RO revierte la inhibición del crecimiento tumoral in vivo inducida por BCG: control 6.4 ± 2.5 ; BCG: 2.52 ± 0.3 ; RO+BCG: 3.59 ± 0.56 mm. RO inhibe significativamente la producción de NO (BCG: 31 ± 3 vs BCG+RO: 18 ± 2), la actividad metabólica (BCG: 496 ± 32 vs BCG+RO 186 ± 23) y la fagocitosis específica (BCG: 11 ± 5 vs BCG+RO: 4 ± 2). Concluimos que aunque in vitro RO potencia la inhibición del crecimiento de células de CaV inducida por BCG, in vivo tiene un efecto opuesto, relacionado con la inactivación de macrófagos efectores.

126. (305) EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE ENTEROCOCCUS FAECALIS CECT7121 SOBRE CÉLULAS DEL LINFOMA T MURINO LBC. DI SCIULLO MARÍA PAULA (1), CASTRO MARISA (2), MOLINA MATÍAS (2), SPARO MÓNICA (3), MONGINI CLAUDIA (1), MANGHI MARCELA (2)

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET-UBA) (1) Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr. R.A. Margni (CONICET-UBA)/ Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (2) Centro de Estudios Bioquímicos, Tandil (3)

En la actualidad resulta de interés evaluar a los microorganismos como fuente de agentes antitumorales así como de inhibidores de enzimas asociadas a los procesos que conllevan al desarrollo de las neoplasias. En nuestro laboratorio identificamos una cepa ambiental de *Enterococcus faecalis* CECT7121 (Ef CECT7121) que posee un plásmido codificador de una bacteriocina de amplio espectro antibacteriano. En estudios previos observamos que Ef CECT7121 tiene efectos inmunomoduladores. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de Ef CECT7121 sobre la proliferación del linfoma T murino LBC. Para esto, células LBC (5.10×10^5 cel/ml, 100 μ l) fueron incubadas con igual volumen de RPMI (control), Ef CECT7121 muerta por calor, Ef CECT7121 sin plásmido y muerta por calor (Ef CECT7121 curada) ambas en un rango de concentración de 5.10×10^2 – 5.10×10^8 UFC/ml, o con lisado de Ef CECT7121 (20 μ g/ml). La proliferación celular fue determinada por incorporación de 3H timidina luego de 24 hs de cultivo. La proliferación de las células

LBC fue inhibida por el lisado de Ef CECT7121 ($p < 0.001$, ANOVA), por Ef CECT7121 en conc. de 5.10×10^7 – 5.10×10^8 UFC/ml ($p < 0.001$) y por Ef CECT7121 curada 5.10×10^8 UFC/ml ($p < 0.001$, ANOVA). En iguales condiciones de trabajo, se observó que la pre-incubación de las cepas virgen y curada con un suero de conejo específico abolió la capacidad inhibitoria en todos los casos excepto con 5.10×10^8 UFC/ml de Ef CECT7121. Empleando geles de agarosa para la detección de la fragmentación nucleosomal del ADN y la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, se comprobó que la inhibición de la proliferación observada se correlaciona con la inducción de apoptosis. Estos resultados indican que Ef CECT7121 tiene efecto antiproliferativo sobre la línea celular LBC y que induce la apoptosis de las células tumorales. Este efecto estaría mediado no sólo por estructuras de la pared celular de Ef CECT7121 sino también en algún grado por moléculas codificadas en su plásmido.

127. (313) CITOTOXICIDAD SELECTIVA DE LAS STAPS (SOLANUM TUBEROSUM ASPARTIC PROTEASAS) SOBRE LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA (JURKAT T) Y LINFOCITOS T. MENDIETA JULIETA RENÉE (1), FIGMONARI CARMELA (2), HRELIA PATRIZIA (2), DALEO GUSTAVO RAUL (1), GUEVARA MARÍA GABRIELA (1)

Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar Del Plata (1) Facultad de Farmacia. Universidad de Bologna. Italia (2)

En las últimas dos décadas se ha reportado la citotoxicidad de varias proteínas y péptidos vegetales sobre líneas celulares cancerígenas de humanos (CPPs), postulándolas como potenciales agentes quimiopreventivos. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio nos han permitido informar la actividad bifuncional de las aspartil proteasas de papa (StAPs). Estas proteínas presentan tanto actividad proteolítica como antimicrobiana, frente a patógenos de vegetales y de humanos. Dichas actividades estarían relacionadas con: 1-la capacidad de desestabilizar la membrana plasmática de los microorganismos y 2-la presencia del un dominio con homología estructural a la familia de proteínas denominada Saposin-like proteins (SAPLIPs); las cuales presentan actividad citotóxica en líneas celulares cancerígenas de humanos in vitro. El objetivo de este trabajo fue determinar si las StAPs poseen actividad antitumoral al igual que las SAPLIPs. Para tal fin, se trataron cultivos de células leucémicas (Jurkat T) y de linfocitos T de sangre periférica con distintas concentraciones de ambas StAPs (0.25 μ M, 1.5 μ M, 1.8 μ M, 3.75 μ M) a distintos tiempos (6, 24, y 48 horas para Jurkat T y 24, 48 y 72 horas para linfocitos T). Cada tratamiento se evaluó en un citómetro de flujo y se cuantificó la cantidad de células vivas, apoptóticas y necróticas. Los resultados obtenidos muestran que ambas StAPs poseen actividad citotóxica sobre células Jurkat T a todas las concentraciones y tiempos ensayados. El 50% ($p < 0.01$) de citotoxicidad se observó a una concentración de StAPs de 2.5 μ M, valor comparable con resultados reportados para otras CPPs. La viabilidad celular de cultivos de linfocitos T sanos solo se vio afectada en un 20% a las máximas concentraciones de StAPs ensayadas (3.75 μ M). Estos resultados muestran que ambas StAPs poseen actividad citotóxica selectiva sobre células leucémicas y no sobre células sanas, por lo que podrían ser consideradas como potenciales agentes quimiopreventivos.

128. (469) ACCION ANTITUMORAL LIBRE DE TOXICIDAD MEDIADA POR TERAPIA METRONOMICA COMBINADA CON CICLOFOSFAMIDA (CY) Y CELECOXIB EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO (M-234P). MAINETTI LEANDRO E.(1) (*), ROZADOS VIVIANA R. (1) (*), GERVASONI SILVIA I. (1), ROSSA ANA (1), BONFIL R. DANIEL (2), SCHAROVSKY O. GRACIELA (1)

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

Previamente demostramos que la administración crónica de dosis bajas igualmente espaciadas (Terapia Metronómica) de Cy tiene acción antitumoral. Con el objeto de evaluar la eficacia y toxicidad de una terapia metronómica combinada con Cy y el inhibidor de COX-2 Celecoxib (CEL), ratones Balb/c fueron desafiados con M-234p s.c. (Día 0) y se distribuyeron en grupos que recibieron desde el día 5: I) Testigos (sólo vehículo); II) Cy (25-30 mg/kg peso/día p.o.); III) CEL (30 mg/kg p.o., 3 veces/semana); IV) Tratamiento II + III. El volumen tumoral (día 26) fue menor y la supervivencia (día 32) mayor en el grupo IV que en el I ($p < 0.05$). En los tumores surgidos en cada grupo se detectó por inmunohistoquímica el marcador vascular CD34, se evaluó apoptosis por TUNEL, proliferación celular con el marcador Ki-67 y, en suero de los animales, se determinó por ELISA el nivel de VEGF. Se observó una menor vascularización intratumoral en el grupo IV con respecto a los otros grupos. El nivel de VEGF en animales del grupo I aumentó en el día 26 con respecto al día 0 ($p < 0.05$), mientras que el de ratones del grupo IV no mostró variaciones durante el crecimiento tumoral. Los niveles de apoptosis no variaron entre los grupos. Por el contrario, se observó una disminución en el porcentaje de células Ki-67+ en el grupo IV con respecto al grupo I. Se evaluó el peso corporal y se extrajo sangre los días 0 y 26 para determinar urea, creatinina, GOT, GPT, glóbulos blancos y fórmula leucocitaria. Los datos obtenidos indican ausencia de toxicidad. Se concluye que: 1) la terapia metronómica combinada con Cy + CEL en animales portadores del tumor M-234p posee un efecto antitumoral que sería debido, al menos en parte, a la inhibición de la angiogénesis tumoral y la proliferación celular; 2) El esquema terapéutico empleado carece de toxicidad general, renal, hepática y hematológica, hecho que aumenta las probabilidades de su utilización a nivel clínico.

129. (333) ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTITUMORAL DE LAS STAPS (SOLANUM TUBEROSUM ASPARTIC PROTEASES). MENDIETA JULIETA RENÉE (1), TAROZZI ANDREA (2), HRELIA PATRIZIA (2), DALEO GUSTAVO RAÚL (1), GUEVARA MARÍA GABRIELA (1)

Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata (1) Facultad de Farmacia. Universidad de Bologna (2)

La aparición de cepas bacterianas con resistencia múltiple a los antibióticos sintéticos, ocasionó la necesidad de buscar alternativas a los mismos. El descubrimiento de nuevas proteínas y péptidos antimicrobianos (APPs) plantea la posibilidad de utilizarlos como "antibióticos naturales". Adicionalmente, el amplio espectro de las actividades antimicrobianas reportadas para estas moléculas sugiere su potencial beneficio en el tratamiento del cáncer e infecciones virales o parasitarias. En nuestro laboratorio hemos purificado y caracterizado dos Aspartil Proteasas de papa (StAPs), las cuales poseen actividad antimicrobiana frente a patógenos vegetales y actividad citotóxica selectiva sobre células Jurkat T pero no sobre linfocitos sanos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible utilización de las StAPs como agentes antibióticos/antitumorales. Para esto, se analizó la actividad citotóxica de las StAPs sobre dos líneas celulares humanas: A431 (adenocarcinoma de la epidermis) y CaCo-2 (adenocarcinoma de colon), sobre dos cepas bacterianas enteropatógenas de humanos: *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* y sobre una cepa patógena de la epidermis: *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos mostraron que ambas StAPs poseen actividad citotóxica frente a las líneas celulares utilizadas. Las concentraciones de StAPs utilizadas para disminuir al 50% ($p < 0.01$) la viabilidad celular fueron para A431, 2.74 μM de StAP1 y 1.4 μM de StAP3 y para CaCo-2, 2.8 μM de StAP1 y 3.2 mM de StAP3. Ambas proteínas presentaron actividad bactericida obteniéndose valores de IC50 para *S. aureus*, *B. cereus* y *E. coli* de 1.01 μM , 4.2 μM y 4.25 μM para StAP1 y de 3.85 μM , 1.73 μM y 2.87 μM para StAP3 respectivamente. La actividad antimicrobiana/antitumoral in vitro de las StAPs determinada en este trabajo, nos permite sugerir su potencial utilización en el tratamiento de enfermedades tanto infecciosas como tumorales.

130. (441) RELACION ENTRE CELULAS EFECTORAS DE LA RESPUESTA INMUNE INTRATUMORALES Y FACTORES REGULADORES DE SU RECLUTAMIENTO EN CANCER DE MAMA. LAGUENS GRACIELA, CORONATO SILVIA, BENENCIA FABIÁN, DI GIROLAMO VANDA

Cátedra de Patología B. Facultad de Ciencias Médicas UNLP; University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.

La presencia de un infiltrado inflamatorio mononuclear en los tumores malignos es un hecho frecuente. Sin embargo, aún no ha sido aclarado el mecanismo del reclutamiento de las células inmunes hacia el tumor. El objetivo del presente trabajo fue investigar si existe una relación entre el reclutamiento de células efectoras de la respuesta inmune y factores que regulan la vasculogénesis y la adhesión celular. Sobre cortes de criostato de carcinomas mamarios infiltrantes provenientes de 20 pacientes, se determinó por inmunohistoquímica, la presencia y distribución de células CD4+, CD8+ y NK CD57+. Con la misma metodología, se investigó la presencia y distribución de ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) y la quemoquina CC RANTES, moléculas relacionadas respectivamente con la migración, la angiogénesis y la quimiotaxis, entre otras funciones. En este estudio se demostró que la presencia de linfocitos T CD4+ (helper) intratumorales está correlacionada con la expresión de VEGF y de ALCAM ($p < 0.01$ y $p < 0.0004$ respectivamente). Sin embargo el número de linfocitos T CD8+ (citotóxicos) en el infiltrado intratumoral que supera ampliamente al de CD4+ (2:1), no se correlaciona con dichas moléculas ($p < 0.4$ y $p < 0.8$ respectivamente). Tampoco hubo correlación entre RANTES y la presencia de linfocitos T helper y T citotóxicos ($p < 0.6$, $p < 0.2$). En pocos tumores ($< 13\%$) se detectó la presencia de escasas células NK CD57+ intratumorales. Conclusiones: La correlación entre la expresión de moléculas de adhesión y de factores angiogénicos con la infiltración de linfocitos T helper, sugieren que estas moléculas podrían estar implicadas en su reclutamiento intratumoral. En cambio, el aflujo de linfocitos T citotóxicos no parece estar vinculado con estas moléculas, hecho que sugiere la existencia de otros mecanismos de reclutamiento.

131. (495) VARIACIONES EN LAS POBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LINFOCITOS T DURANTE EL DESARROLLO DE UN FIBROSARCOMA MURINO. MAGLIOCO ANDREA FLORENCIA, CAMERANO GABRIELA VERÓNICA, MUNDIÑANO JULIANA, CHIARELLA PAULA, RUGGIERO RAÚL ALEJANDRO, DRAN GRACIELA ISABEL

ILEX-Academia Nacional de Medicina

El fibrosarcoma MCC es un tumor inmunogénico que genera respuesta inmune específica en etapas tempranas de su desarrollo; a medida que éste progresa el huésped se torna tolerante. La tolerancia frente a un tumor establecido es también habitual en pacientes; a ella se le atribuye la falta de eficacia de las inmunoterapias contra el cáncer. Con el objetivo de analizar temporal y espacialmente los cambios inmunológicos durante el desarrollo del MCC, se estudió el fenotipo de células dendríticas (CDs) y linfocitos T (LT) en las siguientes etapas: I: 72hs post-inóculo tumoral, INM: volumen tumoral ~300-600 mm³ cuando se detecta respuesta inmune antitumoral y TOL: ~800-1500 mm³, cuando se encuentra establecida la tolerancia. Dichas poblaciones celulares se analizaron en ganglios drenantes del sitio del inóculo tumoral (como medida de la respuesta local) y en distales (respuesta en periferia), mediante citometría de flujo. Localmente se detectó una disminución del porcentaje de LTCD4+ en todas las etapas (% Control: 55; I: 42,8**; INM: 36,7**; TOL: 44,4*, n=8-12). El porcentaje de LTCD8+ presentó una tendencia similar, con disminución significativa en INM (21,8; 17,5; 12,8*; 21,0, para C, I, INM y TOL respectivamente, n=8). En el porcentaje de células CD11c+ no detectamos variaciones. Dentro de ellas, las células CD11c/CD40 y CD11c/CD80 aumentaron su porcentaje y

cantidad de moléculas coestimuladoras en superficie en la fase I. El porcentaje de LTCD4+/CD25+ aumentó en I y posteriormente disminuyó (2,7; 4,2**; 1,6*; 1,1**, para C, I, INM y TOL, n=6-10). En periferia las poblaciones analizadas no difirieron de los controles en el punto I; durante INM se produjo un incremento en el porcentaje de LTCD4+, CD8+ y células CD11c+, seguido por una reducción de los mismos en la fase TOL. (*p< 0,05; **p< 0,01). El tumor MCC iniciaría su desarrollo en un entorno supresor que le permitiría implantarse y progresar a pesar de las evidencias de inmunoestimulación.

132. (499) EXPRESIÓN DE GALECTINAS -1 Y -3 EN FIBROBLASTOS DEL CARCINOMA DE MAMA: POSIBLE ROL EN LA TRANSFORMACIÓN Y PROGRESIÓN NEOPLÁSICAS. BARRIONUEVO VAGO SOLEDAD, RODRIGUEZ ZUBIETA MARIANA, BRAVO ALICIA INES, MORA GABRIELA, MORDOH JOSE

Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires Hospital Eva Perón, San Martín, Buenos Aires Hospital Militar Central, Buenos Aires

Las galectinas -1 (gal-1) y -3 (gal-3) se han visto implicadas en la transformación, diferenciación y progresión tumorales posiblemente al alterar las interacciones adhesivas normales entre las células tumorales y la matriz extracelular; su expresión constituiría un mecanismo de escape a la vigilancia inmunológica al inducir la apoptosis de los linfocitos asociados al tumor. La interacción entre la célula tumoral y los diferentes componentes del estroma genera la necesidad de elaborar un modelo integrativo que explique el desarrollo y progresión del cáncer de mama como algo más que una propiedad exclusiva de la célula neoplásica. El carcinoma de mama se caracteriza por poseer abundante estroma y fibroblastos que expresan alfa-actina de músculo liso (miofibroblastos). Mediante inmunohistoquímica se analizaron 26 biopsias de carcinoma de mama humano incluidas en parafina. Se evaluó la expresión de alfa-actina, gal-1 y gal-3 en fibroblastos, y el marcador de apoptosis cPARP en linfocitos asociados al tumor (TAL). Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de gal-1 en fibroblastos con la expresión de alfa-actina (p=0.000001), con el índice mitótico del tumor (p=0.02), con el grado histológico (p=0.003) y con apoptosis de TAL (p=0.01). No se halló correlación con el nivel de expresión de receptores de estrógenos y progesterona. No hubo correlación entre la expresión de gal-3 y las demás variables estudiadas. Estos resultados sugerirían una asociación entre la presencia de fibroblastos que expresan gal-1 y el grado de progresión tumoral. En el microambiente tumoral desmoplásico del carcinoma de mama, investigar el rol activo o reactivo de los fibroblastos en la transformación y/o progresión tumorales parece esencial.

133. (591) RESISTENCIA DE HEPATOCITOS AISLADOS DE HEHÍGADOS PRENEOPLÁSICOS DE RATA ANTE LOS EFECTOS TÓXICOS DEL ÁCIDO ETACRÍNICO (EA) PARODY JUAN PABLO, ALVAREZ MARIA DE LUJAN, QUIROGA ARIEL, RONCO MARIA TERESA, FRANCES DANIEL, MONTI JUAN, OCHOA ELENA, CARNOVALE CRISTINA, CARRILLO MARIA CRISTINA

IFISE-CONICET

Glutathion S-transferasas (GSTs) participan en la detoxificación de xenobióticos, incluyendo drogas empleadas en terapias anticancer. Catalizan la conjugación de sustancias electrofílicas con GSH, favoreciendo su excreción vía la proteína de membrana canalicular Mrp2. El EA es una droga que causa hepatotoxicidad debido a su metabolismo oxidativo. EA y su GSH-conjugado (EA-SG), son inhibidores de las GSTs. Ratas sometidas al modelo de carcinogénesis química (iniciación-promoción, IP) presentan inducción de la isoenzima GST-P hepática, ausente en ratas control (C). Analizamos el rol del sistema GST/GSH en hepatocitos aislados de ratas IP ante el EA. Los hepatocitos se incubaron durante distintos tiempos (30, 60 y 120 min): a) en

ausencia de EA y b) con distintas concentraciones de EA (0,1; 0,5 y 1,0 mM). Observamos una disminución significativa de la viabilidad en hepatocitos C a 60 min y a 120 min con 0,5 y 1,0 mM EA (p< 0,05). En hepatocitos IP sólo disminuyó a 120 min y con 1,0 mM de EA (p< 0,05). Como medida de integridad celular, la liberación de LDH y GPT al medio de incubación fue menor en hepatocitos IP que en C. Los niveles iniciales de tGSH intracelulares en hepatocitos IP fueron significativamente más elevados que los de C. Por inmunoblotting observamos una inducción de GST-P, ausente en animales C y una disminución significativa de GST alfa y mu en hepatocitos IP. La expresión de Mrp2 fue significativamente menor en hepatocitos IP (15% de C) tanto en fracción membrana plasmática como intracelular. Además, observamos un proceso de internalización más abrupto frente a concentraciones crecientes de EA con respecto a C, con lo cual se favorecería la conservación del tGSH intracelular y su conjugado con EA. Así, mayores niveles de tGSH, menor expresión de Mrp2 y presencia de GST-P y su capacidad de catalizar la conjugación de EA con GSH, serían factores responsables de conferir a los hepatocitos IP un mecanismo de resistencia frente al EA.

134. (630) EFECTO DE LA GLIBENCLAMIDA SOBRE LA INDUCCIÓN DE TUMORES MAMARIOS EXPERIMENTALES. NÚÑEZ MARIEL (1), MARTÍN GABRIELA (1), GUTIÉRREZ ALICIA (1), MOHAMAD NORA (1), CRICCO GRACIELA (1), SAMBUCCO LORENA (1), MEDINA VANINA (1), GENE FERNANDA (1), CROCI MÁXIMO (2), RIVERA ELENA (1), BERGOC ROSA (3)

Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA; Instituto de Inmunooncología “Dr. J.V. Crescenti” IUCS, Fundación Barceló.

La Glibenclamida (Gli) es una droga hipoglucemiante oral empleada en el tratamiento de la diabetes. Recientemente ha cobrado especial interés en oncología, ya que se ha demostrado su 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 intraperitoneal del carcinógeno N-Nitroso-N-metilurea (NMU) a los 50, 80 y 110 días de vida de los animales. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la Gli sobre la inducción de estos tumores, sola o en combinación con el antiestrógeno tamoxifeno (Tam). Las drogas se administraron desde 10 días previos a la inducción tumoral y durante 100 días consecutivos, en los siguientes lotes (n=10): A Control/NMU (vehículo); B-Gli/NMU (Gli: 0,2mg/Kg/día-vo); C-Tam/NMU (Tam: 1mg/Kg/día-sc) y D-Gli+Tam/NMU (ambos tratamientos combinados). Los resultados obtenidos fueron: 1) Período de Latencia (días): 82,5±8,7; 112,7±10,1; 90,6±10,2; 123,6±7,2; respectivamente (p< 0,05 B vs A; p< 0,0001 D vs. A; p< 0,05 D vs B). 2) Incidencia tumoral (%): 100, 100, 50, 50 respectivamente (p< 0,0001 D vs. A y D vs. B). 3) n° de tumores/rata: 5,2±1,8; 2,4±0,6; 1,0±0,6 y 0,7±0,6; respectivamente (p< 0,001 D vs. A, p< 0,01 D vs. B). 4) Velocidad de crecimiento tumoral: Los tumores del lote D crecieron con una velocidad menor que el resto de los tumores (p< 0,05 D vs A; p< 0,05 D vs C). En la progresión de la carcinogénesis (85 y 115 días) las glándulas mamarias del lote A evidenciaron una expresión significativamente más alta del antígeno PCNA respecto de B, C y D. El tratamiento con Gli no modificó parámetros fisiológicos estudiados, como peso corporal, ingesta de agua y alimento de los animales. Los resultados muestran una clara acción inhibitoria de la Gli sobre la promoción tumoral, sola o combinada con Tam, en el modelo de carcinogénesis ensayado.

REPRODUCCIÓN II

135. (106) EL PARTO DEL COBAYO TRASCURRE CON UNA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE RECEPTOR DE PROGESTERONA (RP) EN DISTINTAS REGIONES DEL TRACTO

GENITAL. RODRIGUEZ HORACIO A. (1), RAMOS GUILLERMO (1), ORTEGA HUGO (2), MUÑOZ-DE-TORO MÓNICA (1), LUQUE ENRIQUE H (1)

LETH: Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac de Bioqca y Cs Biológicas, UNL (1) Depto de Anatomía e Histología, Fac de Cs Veterinarias, UNL (2)

En la mujer y el cobayo se sugiere que el inicio del parto estaría mediado por cambios temporales-espaciales en la susceptibilidad del tracto genital a la acción de progesterona (Pg) y estrógenos (Eg) circulantes. Nuestro objetivo fue investigar la expresión de ARNm y proteína de $RE\alpha$ y RP en el tracto genital de cobayo alrededor del parto y su relación con el ARNm de conexina 43 (Cx-43) como marcador de la acción de Pg sobre tejidos blanco. Se tomaron muestras de ligamento interpúbico, cérvix y segmento uterino alto (SUA) y bajo (SUB) de cobayos en cuatro momentos de la preñez: sin dilatación (SD) de la sínfisis púbica, con 5 y 10 mm de dilatación púbica e intraparto (IP). La expresión de ARNm de RP, $RE\alpha$ y Cx-43 fue evaluada por RT-PCR en tiempo real. Los resultados se normalizaron con β -actina y se expresaron como cambios relativos de la expresión génica respecto a SD. Para comparar la expresión de RP de SUB vs SUA se tomaron los valores de SUA como referencia. La expresión de proteína de RP y $RE\alpha$ fue evaluada por inmunohistoquímica. En el SUA el parto ocurre con altos niveles de ARNm de RP y con baja expresión de proteína en el miometrio, mientras que en el SUB hay una máxima expresión de ARNm de RP y altos niveles de proteína en las células musculares. No hay cambios significativos de $RE\alpha$ (ARNm y proteína) en SUA y SUB. En el IP la expresión de ARNm de RP en SUB es 4.18 veces más alta que en SUA. En cérvix y sínfisis los niveles de ARNm y proteína de RP disminuyen al acercarse el parto, coincidiendo con un incremento en el ARNm de Cx-43. En cérvix y sínfisis el $RE\alpha$ (ARNm y proteína) no presenta cambios. Estos resultados demuestran que la sensibilidad a la Pg circulante se modifica diferencialmente entre las distintas regiones del canal de parto y sugieren que este mecanismo podría explicar los cambios funcionales particulares de cada región durante el parto.

136. (171) PARTICIPACION DE SEÑALES DE TRANSDUCCION DEPENDIENTES DE ERK1/2 Y P70S6K EN LA REGULACION POR INTERLEUKINA 1 BETA DE LA FUNCIONALIDAD DE LA CELULA DE SERTOLI (CS). RIERA MARÍA FERNANDA, GALARDO MARÍA NOEL LUJÁN, PELLIZZARI ELIANA H, MERONI SILVINA B, CIGORRAGA SELVA B.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET

Previamente demostramos que interleuquina 1 beta ($IL1\beta$) regula la producción de lactato (L) y la actividad de γ -glutamiltanspeptidasa en CS, al menos en parte, por vías dependientes de PI3K/PKB y de NO respectivamente. Sin embargo, la activación de las vías mencionadas no explica totalmente las diversas respuestas biológicas a la citoquina sugiriendo la participación de otras señales. El objetivo de este trabajo fue analizar si las vías de ERK1/2 y de P70S6K que también son estimuladas por $IL1\beta$ participan en la regulación de la producción de L y de transferrina (T) en CS. Se utilizaron cultivos de CS de ratas de 20 días de edad. Por Western Blot se observó que el estímulo con $IL1\beta$ (50 ng/ml) aumenta los niveles de ERK1/2 y P70S6K fosforiladas y que PD98059 (PD, 10 μ M) y rapamicina (R, 1nM) inhiben respectivamente el estímulo de estas vías. Por otro lado, se observó que la producción de L estimulada por $IL1\beta$ se inhibe en presencia de PD y no de R (B: $5\pm 0.6a$; $IL1\beta$: $11.5\pm 1.1b$; $IL1\beta$ +PD: $6.6\pm 0.3c$; $IL1\beta$ +R: $11.7\pm 1.0b$, μ g/ μ gADN). La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y la entrada de glucosa participan en la producción de L. Por Northern Blot se observó que el aumento por $IL1\beta$ en los niveles de ARNm de subunidad A de LDH se inhibe por PD y no por R. PD y R no modificaron el aumento por $IL1\beta$ de la entrada de glucosa a la célula. Finalmente, la se-

creción de T estimulada por $IL1\beta$ se inhibió en presencia de R y no de PD (B: $101\pm 13a$; $IL1\beta$: $277\pm 20b$; $IL1\beta$ +PD: $266\pm 28b$; $IL1\beta$ +R: $166\pm 19c$, pg/ μ gADN). Los resultados se expresan como $X\pm DS$, n=3. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Estos resultados demuestran que $IL1\beta$ utiliza vías dependientes de ERK1/2 y de P70S6K para regular respectivamente la producción de L y de T (nutrientes para las células germinales) y en su conjunto señalan la importancia de considerar en forma individual las distintas respuestas biológicas y los sistemas de señales involucrados. (PIP 5479, CONICET; PICT 01790, ANPCYT)

137. (192) PARTICIPACIÓN DE LA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK) EN LA REGULACIÓN FUNCIONAL DE 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 CONICET

La AMPK es una enzima clave en el control del nivel energético celular. Es activada por un incremento en la relación AMP:ATP como consecuencia de procesos que disminuyen los niveles de ATP. Anteriormente hemos demostrado que esta enzima participa en la regulación de la producción de lactato y de la entrada de glucosa a la CS. En este trabajo evaluamos la participación de la AMPK en: 1) la expresión de genes relacionados con las respuestas biológicas observadas y 2) la regulación de señales de transducción relacionadas con supervivencia y proliferación celular. Cultivos de CS de rata de 20 días de edad fueron estimulados con adenina 5-amino-imidazol-4-carboxamida 1-beta-D-ribofuranósido (AICAR 1mM, activador de AMPK) por 12, 24 ó 48 hs. Se analizaron por Northern-Blot los niveles de los ARNm de lactato deshidrogenasa A (LDHA), transportadores de monocarboxilatos tipo 1 y 4 (MCT1 y MCT4) y el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1). Los resultados se expresan como veces de estímulo con respecto al basal ($X\pm DS$, n=3). Hemos observado que AICAR (48hs) produce una disminución en la expresión de LDHA (0.5 ± 0.1) y de MCT1 (0.5 ± 0.2) y un aumento en la expresión de MCT4 (2.1 ± 0.2) y GLUT1 (2.2 ± 0.1). En cultivos estimulados por 1, 2 o 4 horas se analizaron por Western-Blot los niveles de proteínas fosforiladas pertenecientes a distintas vías de señales. Se observó que AICAR (2hs) aumenta los niveles de PKB-P (3.2 ± 0.8) y disminuye los niveles de p42/p44-MAPK-P (0.5 ± 0.1) y de p70S6K-P (0.6 ± 0.1). Los resultados observados sugieren que ante un estrés metabólico la CS responde: 1) regulando la expresión de genes para aumentar la entrada de glucosa (sustrato indispensable para la producción de lactato) y la exportación de lactato a la célula germinal (sustrato energético indispensable para mantener la espermatogénesis) y 2) aumentando la actividad de una vía relacionada con la supervivencia celular y disminuyendo las señales mitogénicas. (PIP 5479, CONICET; PICT 01790, ANPCYT)

138. (203) PRIMEROS INDICIOS DE LA PRESENCIA DE HEPARAN SULFATO, POSIBLE AGENTE DESCONDENSANTE DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO IN VIVO, EN EL OVOCITO. ROMANATO MARINA (1), REGUEIRA ELEONORA (1), ZAPPI MARIANA (1), DE DIOS CECILIA (1), CALVO LUCRECIA (1), CALVO JUAN CARLOS (1,2)

(1) *IByME* (2) *FCEYN*

Los espermatozoides humanos se descondensan in vitro con heparina (Hep) y glutatión (GSH). Estudios previos de nuestro laboratorio indican que in vitro, el heparán sulfato (HS), análogo estructural de Hep, pero no así otros glicosaminoglicanos (GAGs) presenta actividad descondensante similar a Hep y hemos propuesto que HS actuaría in vivo como aceptor de protaminas. El objetivo de este trabajo fue investigar mediante 2 estrategias distintas la presencia de HS en el ovocito. Se utilizaron muestras de donantes normospermicos (OMS) y ovocitos frescos de ratonas

CF1 de 8 semanas estimuladas hormonalmente con PMSG (5 UI) y hCG (5 UI). Se recuperaron los ovocitos del oviducto y se eliminaron células del cúmulus (hialuronidasa 0,1% en PBS) y zona pelúcida (Tyrodes ácido, pH 2,5). 1) Ovocitos fijados con metanol se marcaron con Rubipy (Cloruro de Tris (2,2'-bipiridina) Rutenio (II)) 0,1 y 1 mg/ml en agua destilada a pH 1,5 (marcación específica de grupos sulfato). 2) Se descondensaron espermatozoides in vitro entre porta y cubreobjetos en presencia de Hep 46 μ M + GSH 10 mM u ovocitos rotos por presión mecánica con cubreobjetos + GSH 10 mM, durante 3,5 h. Como control, se descondensaron espermatozoides en tubo en las condiciones habituales (Hep/GSH). 1) El análisis por microscopia confocal reveló localización citoplasmática de HS en el 100% de los ovocitos observados. 2) No se encontraron diferencias significativas entre la descondensación de espermatozoides en presencia de ovocitos (38 \pm 8%) vs. Hep + GSH (41 \pm 6%) (n=7, Paired Student, p=0.25). Resultados preliminares indican que el agregado de condroitinasa ABC (100 mU/ml) a los ovocitos, que hidroliza condroitín sulfato A, B y C pero no HS, no afecta la capacidad descondensante de los mismos (40% con enzima vs. 46% sin). Estos resultados constituyen las primeras evidencias en la literatura acerca de la presencia de HS dentro del ovocito y apoyan la hipótesis de que podría funcionar como aceptor de protaminas in vivo.

139. (230) EL INHIBIDOR SELECTIVO DE CICLO-OXIGENASA-2 (COX-2) CELECOXIB INDUCE LA APOPTOSIS E INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS (EDT) Y CONTROLES. MERESMAN GABRIELA, OLIVARES CARLA, BILOTAS MARIELA, BUQUET RICARDO, SUELDO CARLOS, TESONE MARTA.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET) Hospital de Clínicas José de San Martín Centro de Ginecología y Reproducción (CEGYR)

Los tratamientos que se les propone actualmente a las pacientes con EDT no son del todo efectivos tanto por los efectos colaterales que provocan como por la alta frecuencia de recidivas. Siendo así, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para tratar la EDT, es constante. Basándonos en trabajos previos que advierten sobre los efectos de Celecoxib anti-angiogénicos, anti-proliferativos y pro-apoptóticos en células tumorales, propusimos estudiar su efecto sobre el crecimiento endometrial in-vitro. Partiendo de biopsias de endometrio eutópico de 14 pacientes con EDT y 10 controles (C) se realizaron cultivos de células epiteliales endometriales (CEE) y luego de 48 hs, se agregaron distintas dosis de Celecoxib. Al cabo de 24 hs de cultivo, se evaluó apoptosis por el método de naranja de acridina-Br de etidio y el porcentaje de proliferación celular con respecto al basal (%Pc) por incorporación de 3 H-timidina. Por otro lado, se evaluaron los niveles del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en los sobrenadantes de los CEE tratados con Celecoxib por la técnica ELISA y la expresión de COX-2 en los mismos cultivos, por Western Blot. Los resultados mostraron que el Celecoxib en dosis de 10, 20, 25 y 40 μ M no produjo efecto significativo sobre %Pc ni sobre la apoptosis en CEE de pacientes con EDT y C. Concentraciones más elevadas de Celecoxib inhibieron el %Pc en CEE provenientes de C: 58 \pm 5, 43 \pm 11, 36 \pm 8 y de pacientes con EDT: 55 \pm 4, 37 \pm 4, 34 \pm 3 (para 50, 75 y 100 μ M, p< 0.05, p< 0.01, p< 0.001 respectivamente vs. basal). Asimismo Celecoxib en concentraciones de 50, 75 y 100 μ M incrementó la apoptosis tanto en CEE de C: 2.5 \pm 0.4, 2.7 \pm 0.3, 3.1 \pm 0.5 como de pacientes con EDT: 2.8 \pm 0.4, 3.3 \pm 0.6, 3.1 \pm 0.8 (expresado como veces de aumento, p< 0.05, p< 0.001, p< 0.01 respectivamente vs. basal). Nuestros resultados preliminares muestran una inducción de la expresión de COX-2 por parte de Celecoxib que podría explicarse por una inhibición del feedback negativo que regula la expresión de la enzima. Asimismo Celecoxib indujo una disminución significativa de la producción de VEGF en CEE (p< 0.05), hecho que se relacionaría con la inhibición de la angiogénesis. Estos datos sugieren que Celecoxib favorecería la regresión de la lesión inhibiendo la proliferación celular, induciendo la apoptosis y dis-

minuyendo la angiogénesis. Nuestros resultados avalan a esta droga para continuar siendo evaluada como nueva alternativa terapéutica para la EDT.

140. (310) INMUNOEXPRESIÓN DE IGF2 Y DE RECEPTOR DE INSULINA EN CÉLULAS DE LEYDIG Y CÉLULAS GERMINALES EN TESTICULO HUMANO PREPUBERAL. BERENZSTEIN ESPERANZA, GONZALEZ CANDELA, PONZIO ROBERTO, SARACO NORA, RIVAROLA MARCO A., BELGOROSKY ALICIA.

Hospital de Pediatría Garrahan, Laboratorio de Investigación Centro de Investigaciones en Reproducción, Universidad de Buenos Aires

En la deficiencia de insensibilidad a GH los testículos son pequeños. Se ha demostrado que los IGFs estimulan la proliferación y función de las células de Leydig (LC) y células germinales (GC) en roedores. La hipótesis del presente trabajo es que el sistema GH/IGFs participaría en la diferenciación del testículo humano postnatal. Se definen tres grupos etarios (Gr): Gr1 (n=11), neonatal (1-21 días), Gr2 (n=11), activación testicular postnatal (1-7 meses) y Gr3 (n=10), prepubertad temprana (12-36 meses). En testículos de necropsia se estudió la inmunexpresión (ie) de IGF1, IGF2, IGFR, receptor de insulina (IR) y receptor de GH (GHR). Se observó: en células intersticiales (IC), moderada ie de IR (5-15%) en los tres Gr, mayor ie de IGF2 en Gr1 que en Gr3 (7.0 \pm 1.3 vs. 2.8 \pm 2.5 %, p=0.02), y mayor ie de IGFR en Gr1 y Gr2 que en Gr3 (11.7 \pm 4.5, 7.2 \pm 2.9 y 2.8 \pm 0.8%, p=0.046). En LC, no se detectó IGF1, se observó alta ie de IGF2 (36 y 44.8%), moderada de IGFR (8.6 y 4.4%) y de IR (8.0 y 36.7%) en Gr1 y Gr2, resp. Solo se encontró ie de GHR en LC del Gr2 (13.7%). En GC de los tres Grs, se encontró moderada ie de IGF1 y fuerte ie de IGF2, IGFR e IR. En células peritubulares y de Sertoli, en todas las edades, toda ie fue muy baja En cultivo primario de células testiculares, la secreción de testosterona (T) se incrementó significativamente bajo rhGH sólo en Gr2 mientras que bajo IGF1 en los tres Grs. Se concluye que, en LC del Gr1, IGF2 local, actuando a través del IGFR o del IR, modularía la esteroidogénesis antes del pico de LH. En el Gr2, la GH serica, vía GHR, podría estimular la producción de IGF2 en LC. Puesto que el IR esta elevado en LC en Gr2, el IGF2, actuando a través del IR tipo A, podría potenciar el efecto de LH. Por otro lado, la producción local de IGFs y la expresión de IGFR en GC sugiere que los IGFs tendrían un rol autocrino en la preservación del pool de espermatogonias en el testículo prepupal.

141. (454) EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) Y LA INTERLEUKINA-1B (IL-1B) SOBRE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES (CEE) PROVENIENTES DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS (EDT). BILOTAS MARIELA (1), MERESMAN GABRIELA (1), BUQUET RICARDO (2), SUELDO CARLOS (3), BARAÑO ROSA INÉS (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET (1) Hospital de Clínicas José de San Martín (2) Centro de Ginecología y Reproducción (3)

En estudios previos observamos que el tratamiento in-vitro con un agonista de GnRH, el acetato de leuprolide (LA), aumenta la apoptosis en las CEE y produce una disminución en la producción de VEGF e IL-1 β . Además sabemos que tanto VEGF como IL-1 β están aumentados en el ambiente peritoneal de pacientes con EDT y que en otros sistemas ambos factores poseen efectos antiapoptóticos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del agregado de VEGF e IL-1 β sobre la apoptosis inducida por el LA en las CEE in-vitro. Se realizaron cultivos primarios de CEE partiendo de biopsias de endometrio de pacientes con EDT y controles (sin EDT). Se estimularon con LA 1000 ng/ml y a las 3 horas se agregaron VEGF e IL-1 β en concentraciones de 0.1, 1 y 10 ng/ml. El porcentaje de células apoptóticas (%CA) se evaluó utilizando la técnica de naranja de acridina-bromuro de etidio. El

análisis estadístico se hizo por el test de Anova y el test de Tukey. El tratamiento con LA 1000 ng/ml aumentó el %CA de 25±2% a 49±3% en las CEE de mujeres controles y de 20±2% a 43±5% en las de pacientes con EDT ($p < 0.001$ vs. basal). El agregado de VEGF 0.1, 1 y 10 ng/ml luego del LA restauró los niveles basales de apoptosis en los cultivos de CEE de mujeres controles: 29±3%, 23±2% y 22±2% respectivamente ($p < 0.001$ vs LA, $p > 0.05$ vs basal); y en los de pacientes con EDT: 20±3%, 18±2% y 24±5% respectivamente ($p < 0.01$ vs LA, $p > 0.05$ vs basal). De manera similar el tratamiento con IL-1 β 0.1, 1 y 10 ng/ml luego del agregado de LA disminuyó la apoptosis a los niveles basales en los cultivos de CEE de mujeres controles: 31±3%, 25±2% y 23±36% respectivamente ($p < 0.001$ vs LA, $p > 0.05$ vs basal); y en los provenientes de pacientes con EDT: 21±4%, 16±2% y 19±3% respectivamente ($p < 0.01$ vs LA, $p > 0.05$ vs basal). El VEGF y la IL-1 β rescatan a las células epiteliales endometriales de la apoptosis inducida por el LA. Ambos favorecerían la sobrevida del endometrio ectópico en las pacientes con EDT.

142. (648) ESTUDIOS FUNCIONALES EN RATONES KNOCK OUT PARA LA PROTEÍNA EPIDIDIMARIA "DE/CRISP-1" INVOLUCRADA EN EL PROCESO DE FERTILIZACIÓN.
DA ROS VANINA G., MALDERA JULIETA A., COHEN DÉBORA J., CUASNICÚ PATRICIA S.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

La proteína epididimaria DE y la proteína testicular Tpx-1 son miembros altamente homólogos de la familia CRISP (Cysteine Rich Secretory Protein) denominados CRISP-1 y CRISP-2 respectivamente. Estudios de nuestro laboratorio indican que ambas proteínas participan en el proceso de fusión de gametas a través de sitios de unión en el ovocito. Con el fin de investigar más profundamente la participación de las proteínas CRISP en la fertilización, nuestro laboratorio generó recientemente una línea de ratones "knock out" (ko) para CRISP-1 en los cuales la expresión de CRISP-2 no está afectada. Estudios funcionales en estos animales indicaron que los ratones ko no presentaron diferencias en su fertilidad respecto a los ratones "wild type" (wt) o heterocigotas (het) (número de crías promedio: ko 6.5, wt 7.3, het 6.3). Estudios in vitro en los cuales ovocitos con cúmulus fueron inseminados con espermatozoides capacitados tampoco mostraron diferencias en los porcentajes de fertilización (ko: 79% vs wt/het: 75%, n=10). Sin embargo, el análisis específico de la capacidad de fusión de los espermatozoides mediante ensayos de fertilización con ovocitos sin zona pelúcida, mostró una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fusionados (ko: 46% vs wt/het: 64%, n=10, $p < 0.0001$). Posteriores estudios indicaron que los espermatozoides de animales ko no presentaban diferencias significativas respecto a los controles en el número, viabilidad, motilidad, fosforilación de proteínas en tirosina (indicativo de capacitación) o habilidad de sufrir la reacción acrosomal, confirmando que la inhibición observada se debería a un efecto específico a nivel de la interacción espermatozoide-oolema. En conjunto, estos resultados apoyan la participación de CRISP-1 en el proceso de fusión de gametas, sugiriendo que el homólogo funcional CRISP-2 podría actuar compensando la ausencia de CRISP-1 como un mecanismo para garantizar el éxito de la fertilización.

SISTEMA CARDIOVASCULAR II

143. (112) MODULACION DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN MIOCARDIO DE RATAS UNINEFRECTOMIZADAS SHR Y WKY MEDIANTE VALSARTAN.
ANGEL ROSA MARGARITA, CAO GABRIEL, TOBLLI JORGE

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán

Introducción: La enfermedad CV es frecuente en pacientes con insuficiencia renal (IR). El SRA es genera respuesta inflamatoria tisular en IR. La IR se asocia con mayor sensibilidad a la sal y

proteinuria contribuyendo a mayor respuesta inflamatoria tisular. El SRA mediante Ang II ejerce efectos proinflamatorios y genera fibrosis. El inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) es inducido por Ang II y es importante mediador del turnover de matriz extracelular (MEC). Los agentes antiSRA han probado ser efectivos en reducir el daño tisular. Objetivo: Evaluar respuesta terapéutica del bloqueo AT1 con Valsartan (VAL) en relación con expresión de PAI-1; actina de músculo liso (a-SMA) y depósito de colágeno III (Col III) en corazón de rata con severa hipertensión arterial y daño renal progresivo. Métodos: Se practicó uninefrectomía (UNX) a SHR macho y control Wistar Kyoto (WKY). Durante seis meses: [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 corazón por inmunohistoquímica: PAI-1; a-SMA y Col III. Resultados: Al sexto mes: Presión Arterial (mmHg): G1= 218 ± 17, G2= 154 ± 7; G3= 147 ± 8, G4= 121 ± 3**. ClCr μ l/min/g PC: G1=1.2 ± 0.1*, G2= 2.9 ± 0.1; G3= 2.6 ± 0.3, G4=3.9 ± 0.2**. PAI-1 (% / area): G1= 23.1 ± 2.7*, G2= 9.3 ± 2.3; G3= 15.3 ± 2.2**, G4= 4.3 ± 1.1**. a-SMA (% / area): G1= 20.7 ± 2.5*, G2= 7.9 ± 1.4; G3= 8.7 ± 1.6, G4= 3.9 ± 1.2**. Col III (% / area): G1= 25.3 ± 3.1*, G2= 14.6 ± 2.5; G3= 16.5 ± 2.3, G4= 8.9 ± 1.9**. ($p < 0.01$ * vs. todos G; $p < 0.01$ ** vs. G2 & G3; $p < 0.01$ ** vs. G2). Conclusiones: El control del SRA mediante el bloqueo del Receptor AT1 de la Angiotensina II con Valsartan, reduce la inmunoespresión tanto de PAI-1 como de a-SMA y COL III, controlando de esta manera la respuesta inflamatoria y la expansión de MEC en miocardio tanto de UNX-SHR como de UNX-WKY.

144. (326) EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 Y HEMOXIGENASA-1 EN TEJIDO CAVERNOSO DE RATAS HIPERTENSAS ESPONTÁNEAS: INFLUENCIA DEL CITRATO DE SILDENAFIL.
CASTRONUOVO CYNTHIA, SACCA PAULA, MAZZA OSVALDO, GROSMAN HALINA, TOBLLI JORGE, BECHER EDGARDO, VAZQUEZ ELBA

Laboratorio de Investigación. Cátedra de Urología. Hospital de Clínicas "José de San Martín"; IBYME; Hospital Alemán Cátedra de Urología Dpto. de Química Biológica, FCEN, UBA, CONICET

Las caveolas son invaginaciones especializadas de la membrana plasmática en la superficie de la mayoría de las células. La caveolina-1 (Cav-1), proteína de membrana asociada con las caveolas y vesículas derivadas del Golgi, está presente en el músculo liso (ML) del tejido eréctil. Cav-1 interactúa y modula a la enzima hemo oxigenasa 1 (HO-1), la cual se localiza en la membrana plasmática de dichas caveolas. En ratas adultas se comprobó que el envejecimiento disminuye la relación trabéculas de ML/colágeno y reduce la expresión de Cav-1, contribuyendo a la disfunción eréctil. Las ratas hipertensas espontáneas (SHR) presentan cambios morfológicos en el tejido eréctil. Este remodelamiento en las estructuras eréctiles se observa en el intersticio y en el ML de vasos y espacios cavernosos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el patrón de expresión de Cav-1 y HO-1, en las ratas SHR debido al remodelamiento patológico inducido por hipertensión arterial en el lecho vascular y en el espacio cavernoso. También se evaluó el rol protector del Citrato de Sildenafil (CS) en dichas estructuras. Se utilizaron ratas macho SHR y WKY (control) de 12 semanas. A un grupo de animales (8 SHR y 8 WKY) se les administró CS (10 mg/kg/día) en el agua de bebida. Los controles (8 SHR y 8 WKY) no recibieron tratamiento. Los animales fueron sacrificados luego de 4 meses. Se analizó la expresión de Cav-1 y HO-1 por Western Blot en tejido peneano. Los resultados fueron analizados por Turkey-Kramer Multiple Comparison Test y se muestran en la tabla (WKY vs. SHR, SHR+CS vs. WKY+CS ($p < 0,001$) y SHR vs. SHR+CS ($p < 0,05$)). Las expresiones de Cav-1 y de HO-1 aumentaron significativamente en las ratas WKY respecto de las SHR. Estas alteraciones en Cav-1 y HO-1, observadas en las SHR, pueden ser una expresión temprana del proceso de envejecimiento causado por la hipertensión. El CS no modificó la disminución de la expresión de estas dos proteínas.

Expresión de caveolina-1 y hemo oxigenasa 1

Grupo	N	Cav-1	HO-1
SHR	8	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,3
SHR + CS	8	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,2
WKY	8	6,1 ± 0,7	4,5 ± 0,4
WKY + CS	8	2,4 ± 0,4	1,6 ± 0,3

145. (134) ROL DE LA BILIRRUBINA NO CONJUGADA EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL: EFECTO SOBRE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO Y LA EXPRESIÓN DE ESELECTINA, VCAM E ICAM EN CÉLULAS H5V. MAZZONE GRACIELA LUJAN, RIGATO IGINO, TIRIBELLI CLAUDIO

Centro Studi Fegato, AREA Science Park - Università di Trieste -Italia

Estudios clínicos demostraron una correlación entre el nivel plasmático de bilirrubina y el riesgo de aterosclerosis. La disfunción endotelial, evento asociado a dicha patología, está caracterizada por modificaciones en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) y la expresión de moléculas de adhesión. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de UCB en células endoteliales H5V tratadas con TNF como modelo de disfunción endotelial. Se trataron cultivos de H5V con UCB sola (15 y 30 nM, grupos A y B), TNF (20 ng/ml, grupo F) o cotratamiento (TNF+UCB grupos C y D, respectivamente). Se evaluó el contenido extracelular de NO y los niveles de expresión de iNOS, eNOS y las moléculas de adhesión eSelectina, VCAM e ICAM por real time PCR. Se analizó la viabilidad celular por MTT. La concentración de NO disminuyó significativamente bajo tratamiento con TNF solo por 24 y 48h respecto al control (E) (24h E: 3.4±0.2, F: 2.6±0.3*; 48h E: 6.8±1.4, F: 4.7±1.3* nmol NO²/mg proteína, n=3, X±SD, ANOVA *p< 0.05 vs. E). Para el grupo C se observó un aumento vs. F a 48h (C: 99%±1.4#, F: 66%±9.0, #p< 0.05 vs. F). El tratamiento con TNF provocó un incremento significativo en la expresión de todos los genes estudiados (excepto eNOS) a 2, 6 y 24h (2h: iNOS 1.8±0.2*; eSelectina 15.5±7.0*; 6h: VCAM 197.6±34.4*, ICAM 4.4±0.8*, veces de expresión vs. E). Los cotratamientos disminuyeron la expresión vs. F: 2h iNOS (C: 74%±7.7#), eSelectina (C: 69%±10.5#, D: 57%±15.0#) y 6h VCAM (C: 72%±9.3#, D: 75%±15.0#). Se observó un efecto sinérgico TNF+UCB en la expresión de iNOS a 24h (C: 7.6±1.7#, F: 4.3±0.8*). La UCB disminuyó la viabilidad de forma dosis dependiente luego de 24h (E: 100%±2.5, A: 76%±4.1*, B: 53%±4.9*). En nuestro sistema UCB regularía la síntesis de NO, mediante un efecto sobre iNOS, y la expresión de las moléculas de adhesión. La UCB intervendría en la homeostasis endotelial, esto podría tener implicancia en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis.

146. (301) FOSFOLIPASA A2, PCR-HS Y LDL OXIDADAS EN LA POSTMENOPAUSIA. MUZZIO MARÍA LUZ (1), BRITES FERNANDO (1), BERG GABRIELA (1), BASILIO FRANCISCO (2), PANDOLFO MARCELA (1), WIKINSKI REGINA (1), SCHREIER LAURA (1)

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA (1) Servicio de Ginecología, Hospital Durand, Bs As (2)

La PAF-acetilhidrolasa, actualmente conocida como fosfolipasa A2 (Lp-PLA2) circula principalmente unida a LDL y en menor proporción a HDL. Su función es hidrolizar fosfolípidos oxidados, pudiendo ejercer una acción protectora; sin embargo, los ácidos grasos oxidados que genera tendrían actividad proinflamatoria e injuriantes, por lo tanto su papel es controvertido. En la postmenopausia, condición caracterizada por aumento del riesgo cardiovascular, la Lp-PLA2 no ha sido suficientemente estudiada. Nuestros objetivos fueron evaluar la actividad de Lp-PLA2 en mujeres postmenopáusicas (MPM), su asociación con la oxida-

bilidad de LDL y LDL pequeña y densa, y compararla con PCR-hs como marcador de inflamación. Se estudiaron 25 MPM (43-60 años) y 20 premenopáusicas (MpreM) (23-44 años) sin tratamiento hormonal ni antioxidante. En suero, se midió la actividad de Lp-PLA2 (método radiométrico), PCR-hs, el perfil lipídico y la proporción de LDL densa (LDLd; 1048-1063 g/ml). En LDL total aislada, se provocó la oxidación in vitro con Cu²⁺ midiendo TBARS-LDL (LDLox). MPM presentaron mayor: Lp-PLA2 (11,8±2,1 vs 9,8±2,1 μmol/ml.h; p< 0,01), PCR-hs (3,3±3,3 vs 1,1±1,3 mg/dl; p< 0,01), LDLd (23±8 vs 18±5%; p< 0,02), sin diferencias en LDLox. Lp-PLA2 solo correlacionó con LDLd (r=0,36; p< 0,05) que es el subtipo que predominó en MPM, mientras que el aumento de PCR-hs se asoció con LDLox (r=-0,65; p< 0,001) y LDLd (r=0,38; p< 0,05). No se observó correlación significativa entre PCR y Lp-PLA2 (r=0,13, p=0,5). El aumento de Lp-PLA2 evidenciaría la presencia de un factor de riesgo aterogénico adicional en las MPM, el cual se asoció, en este estudio, con la elevación del subtipo de LDL densas y no con un marcador de inflamación como la PCR-hs.

147. (701) LA HIPERTROFIA CARDIACA ES INDEPENDIENTE DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN EL MODELO DE COARTACIÓN AÓRTICA. POLIZIO ARIEL, BALESTRASSE KARINA, GORZALCZANY SUSANA, TAIRA CARLOS, TOMARO MARIA LUJÁN

Universidad de Buenos Aires

La coartación aórtica es un modelo de hipertensión renovascular. En este modelo, en la primera semana, los niveles de Ang II están aumentados. En trabajos previos, hemos demostrado que tanto la hipertrofia cardíaca como el daño oxidativo en corazón es revertida por losartan (antagonista de los receptores a la Ang II AT1). Para determinar si la hipertrofia es originada por un aumento en la presión arterial o por la Ang II, utilizamos minoxidil, un antihipertensivo independiente de Ang II. Ratas Wistar (250-300 g) fueron sometidas a ligadura de la arteria aorta abdominal durante 7 días sin administración de minoxidil (Coa) y con minoxidil 120 mg/kg vía oral (Coa-minox). Otro grupo de animales se sometió a una operación simulada con y sin minoxidil (Sham-minox; Sham, respectivamente). Se determinaron los siguientes parámetros de estrés oxidativo en homogenatos cardíacos: peroxidación lipídica (TBARS), glutatión reducido (GSH) y las actividades de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX). La relación peso del corazón (g)/peso animal (kg) aumentó en las coartadas un 50% con respecto a Sham, no revertiéndose con minoxidil. La peroxidación lipídica aumentó 84% en Coa con respecto a Sham, mientras que no se modificó en Coa-minox con respecto a Coa. El GSH aumentó en las Coa (22%) y Coa-minox (24%) con respecto al grupo Sham. La actividad de la SOD aumentó 44% y 40% en Coa y Coa-minox, respectivamente, comparadas con Sham. En cambio, las actividades de CAT y GPX aumentaron 25% y 45%, respectivamente en Coa mientras que Coa-minox mantuvo valores similares al grupo Sham. Como conclusión podemos afirmar que los cambios de las actividades de las enzimas antioxidantes son reguladas por la presión arterial. Por otro lado, la hipertrofia cardíaca, es medida por la Ang II independientemente del comportamiento de las actividades de las enzimas antioxidantes.

148. (135) METABOLISMO MITOCONDRIAL DE O2 Y NO EN ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL: EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO. CIMOLAI MARÍA CECILIA, BOVERIS ALBERTO, ALVAREZ SILVIA

Laboratorio de Biología de Radicales Libres (PRALIB-CORNICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

La endotoxemia tiene su origen en una exacerbada respuesta inflamatoria, con aumentos masivos de NO, daño sistémico al endotelio vascular y respiración mitocondrial inadecuada. Existe evidencia que implica al estrés oxidativo con el daño en tejido producido por LPS (lipopolisacárido bacteriano), y que una tera-

plia antioxidante sería beneficiosa en el tratamiento de este síndrome. El objetivo general de este trabajo es evaluar el metabolismo mitocondrial del óxido nítrico y su relación con el metabolismo oxidativo en endotoxemia. Se evalúa asimismo el efecto de distintas dosis (1-3 mM) de ácido lipoico (como antioxidante). Las mitocondrias de corazón y diafragma producen 0.69 ± 0.05 y 0.77 ± 0.08 nmol NO/min. mg proteína; velocidades que corresponden a un 45 y 24% de la máxima producción de NO a nivel celular, respectivamente. Un marcado aumento en la actividad de mtNOS se observa en ratas endotóxicas (10 mg LPS/kg peso, 6 h de tratamiento): 90% en diafragma y 30% en corazón. Cuando se suplementó in vitro con ácido lipoico en concentraciones de 1, 2 y 3 mM, se observó que solo la concentración de 3 mM produjo una inhibición de la producción de NO, que fue del 20%. El consumo de oxígeno en cortes de tejido se encuentra aumentado: 1,5 veces (valor control: 983 ± 80 nagO/min. g tejido) en corazón y 1,3 veces (valor control: 543 ± 55 nagO/min. g tejido) en diafragma. Esto indicaría una población mitocondrial en estado 3, aumentada. Cuando se suplementó in vitro con ácido lipoico en concentraciones de 1, 2 y 3 mM, se observó que solo las concentraciones de 2 y 3 mM produjeron una inhibición de 17% y 23% sobre el consumo de oxígeno. En base a los resultados obtenidos, se observa que la mitocondria tiene un rol preponderante en los eventos intracelulares asociados al proceso endotóxico. La utilización del ácido lipoico sería una herramienta útil en el tratamiento de este síndrome.

149. (177) NO Y OXIDO NITRICO SINTASA MITOCONDRIAL EN CORAZÓN DE RATA. BOMBICINO SILVINA SONIA, VALDÉZ LAURA B., ZAORBORNJY TAMARA, BOVERIS ALBERTO

Laboratorio de Biología de Radicales Libres (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

El NO ejerce dos efectos principales sobre la cadena respiratoria: inhibe la citocromo oxidasa, competitivamente con el O_2 ; e inhibe la transferencia de electrones entre los cit. b y c, incrementando la producción de O_2^- y H_2O_2 . El objetivo de este trabajo es caracterizar la producción mitocondrial de NO en cardiomiocitos y también la actividad y expresión de la mtNOS. Se determinó la producción de NO espectrofotométricamente, en cortes de corazón, en mitocondrias y en membranas mitocondriales. La expresión de mtNOS se analizó por Western blot y la actividad funcional a través del consumo de O_2 (electrodo de Clark) y de la producción de H_2O_2 (fluorométricamente). Mitocondrias de corazón de rata liberan NO a velocidades que dependen del estado metabólico: en estado 3 es 50% menor que en estado 4. Membranas mitocondriales de corazón producen NO a una velocidad 0.04 nmol/min.mg prot. La actividad de mtNOS depende exponencialmente \pm de 2.19 del potencial de membrana mitocondrial, siendo mas importante a valores. La mtNOS de cardiomiocitos fue detectada utilizando Dfisiológicos de anticuerpos anti-iNOS, mientras que la fracción post-mitocondrial reaccionó con anticuerpos anti-eNOS. Mitocondrias de corazón suplementadas con L-arg disminuyen 15% el consumo de O_2 , mientras que el agregado de L-NAME lo incrementa (10%). La preincubación de cortes de corazón con L-arg disminuyó 35% el consumo de O_2 , mientras que el agregado de L-NAME lo aumentó (20%). El agregado de L-arg aumentó la producción de H_2O_2 (30%) y la suplementación con L-NAME la disminuyó (10%). Estos efectos son explicados por la acción del NO sobre las actividades de citocromo oxidasa y ubiquinol-succinato-citocromo c reductasa. La producción de NO por mitocondrias de corazón corresponde al 60% de la producción total de NO por el cardiomiocito, indicando un papel relevante del NO mitocondrial y de la mtNOS en procesos fisiopatológicos cardíacos.

150. (686) EL TRATAMIENTO COMBINADO CON PIOGLITAZONA Y LOSARTAN MODIFICA PARÁMETROS METABÓLICOS Y HEMODINÁMICOS Y LOS PROSTANOIDES VASCULARES EN RATAS CON SOBRECARGA ORAL

DE FRUCTOSA. GIORGI SALVADOR, MAYER MARCOS, DONOSO ADRIANA, ZERBETTO GERARDO, FAYA ILEANA, PUJO ANA, PEREDO HORACIO

Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA

La sobrecarga oral de fructosa provoca en la rata hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina y aumenta la presión arterial (PA), produciendo un cuadro similar al síndrome metabólico humano. En trabajos previos hallamos que los tratamientos con pioglitazona (PIO, agonista PPAR γ) y losartan (LOS, bloqueante AT1 de angiotensina II) por separado modificaban la producción de prostanoideos (PR) en la aorta (A) y el lecho mesentérico (LM) en este modelo. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del tratamiento combinado con ambas drogas sobre la PA, triglicéridos plasmáticos (TG) y producción vascular de PR en ratas con sobrecarga de fructosa y control. Se utilizaron 4 grupos de ratas Sprague-Dawley: C: dieta normal; F: fructosa al 10% P/V para beber; C-LOS+PIO: LOS 30 mg/kg/día y PIO 10 mg/kg/día, en el agua; y F-LOS+PIO, por 9 semanas. La PA sistólica se midió mediante el método indirecto. A las 9 semanas los animales se sacrificaron y los LM y A se incubaron 60 min a 37 °C en Krebs; los PR liberados se midieron por HPLC. En F los TG aumentaron (g/l; F: 2.06 ± 0.26 vs C: 1.04 ± 0.07 , $p < 0.01$); PIO+LOS los disminuyeron en los grupos F (F-PIO+LOS: 1.53 ± 0.08 vs. F, $p < 0.05$). En F aumento la PA (mmHg; F: 131 ± 2 vs. C: 118 ± 3 , $p < 0.01$), ese aumento no se observó en F-PIO+LOS (107 ± 5 vs. F). Se detectaron prostaglandinas (PG) F2 α y E2, así como PG 6-ceto F1 α y tromboxano (TX) B2, metabolitos de prostaciclina (PGI2) y TXA2. En A, F disminuyó PGI2 (ng/mg tejido; 67 ± 13 vs. C 160 ± 18 , $p < 0.01$), mientras que PIO+LOS la normalizó ($p < 0.05$). PIO+LOS redujo TX en F (F-PIO+LOS: 41 ± 8 vs. F: 97 ± 9 , $p < 0.01$). En LM, F disminuyó PGI2 (F: 52 ± 6 vs. C: 101 ± 9 , $p < 0.005$) y PGE2 (F: 34 ± 5 vs. C: 99 ± 11 , $p < 0.005$). PIO+LOS redujo TX en F (F-PIO+LOS: 32 ± 5 vs. F: 52 ± 7 , $p < 0.05$). PIO+LOS normalizó PGI2 y PGE2 ($p < 0.05$ vs F). Concluyendo, el tratamiento combinado mejora el estado metabólico y la PA, en mayor medida que la utilización aislada de cada droga, en los animales con síndrome metabólico experimental.

151. (229) CONCENTRACIÓN SÉRICA DE ÁCIDO HIALURÓNICO (AH) Y DEFORMABILIDAD ERITROCITARIA (DE): SU CORRELACIÓN CON EL ÍNDICE DE ACTIVIDAD DE ARTRITIS REUMATOIDEA DAS 28-4. GIORGETTI MARÍA EDITH, LUQUITA ALEJANDRA, URLI LEDA, GENNARO ANA MARÍA, SVETAZ MARÍA JOSÉ, VOLTINTESTA RICARDO, PALATNIK SIMÓN, RASIA MARTA

Facultad Ciencias Médicas, Cátedra de Biofísica, UNR INTEC-CONICET, UNL; Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR Clínica Médica, Área Reumatología,

Objetivos: Encontrar asociación entre DAS 28-4, ácido Hialurónico (AH) sérico y deformabilidad eritrocitaria (DE) en pacientes con Artritis Reumatoidea (AR). Demostrar que AH se adsorbe sobre la membrana y modifica sus propiedades reológicas. Métodos: En sangre de 100 pacientes artríticos con diferentes DAS 28-4 y sus controles se midió concentración sérica de AH (por ELISA) y DE (por filtración). Para estudiar el efecto de AH sobre la membrana, se trabajó in-vitro con sangre de dadores normales (n:10) adicionada de AH, se determinó DE y agregabilidad eritrocitaria (por densitometría óptica) y se estimó la movilidad de proteínas de membrana por resonancia paramagnética electrónica (EPR). El análisis estadístico de agregabilidad eritrocitaria y EPR se realizó por t de student y DE por test de Wilcoxon, ambos para datos apareados. Resultados: Se calculó la correlación (coeficiente de Spearman) en pacientes vs. controles: entre DE y el [AH] sérico: 0.83 ($p < 0.0000$) y entre DAS 28-4 y [AH] sérico: 0.87 ($p < 0.0000$). In vitro se observó que los eritrocitos incubados con AH tenían menor DE que los controles [(mediana y rango): 16.55 (15.09-19.75)] vs. [8.79 (5.59-10.21) $p < 0,01$] y menor velocidad de agregación [(media \pm ES): $1,98 \pm 0,14$ vs. $1,29 \pm 0,21$ ($p < 0,01$)], ambos relacionados a la con-

centración de AH. Los espectros de EPR (W/S) sugieren que AH produce rigidización del citoesqueleto de la membrana [(media \pm ES): W/S con AH: $3,20 \pm 0,10$, sin AH [$2,65 \pm 0,05$, $p < 0,05$] que justifica la disminución DE y la pérdida de agregabilidad eritrocitaria. Conclusión: Las experiencias in vitro corroboran que en AR activa (DAS 28-4 > 2,6) el AH sérico se adsorbe sobre la membrana del eritrocito modificando sus propiedades. Siendo AH considerado un indicador de actividad de AR más fidedigno que las pruebas de laboratorio usuales, éstos resultados avalan el hallazgo de que la DE está asociada al DAS 28-4, resultando también un indicador fidedigno y más accesible de ese estado.

- 152. (517) ESTUDIO DEL SISTEMA CD44/HIALURONATO SOLUBLE EN PACIENTES HIPERTENSOS.** LEBENSOHN NATALIA, D ARRIGO MABEL, FILIPPINI FERNANDO, BARBERENA LILIANA, GALLO ROBERTO, VALVERDE JUANA, FORESTO PATRICIA

Lab. Inmunoheorreología - Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Facultad de Ciencias Médicas UNR

El CD44 es una glicoproteína de membrana involucrada en la adhesión celular, es similar al receptor de hialuronato con respecto a su peso molecular, punto isoeléctrico, presencia de grupos fosfatos, distribución tisular y asociación con filamentos de actinas. El objetivo de este trabajo fue estudiar CD44 soluble en pacientes hipertensos (HTA) y controles normales (CN), por una técnica inmunoematológica simple. Se trabajó con sangre de 18 pacientes HTA y 20 CN con valores de presión arterial $156 \pm 3 / 101 \pm 2$ vs $120 \pm 2 / 78 \pm 2$ respectivamente. Se desarrolló una técnica basada en el test de inhibición de la adhesión del CD44 soluble. Este test se desarrolla en dos etapas en la que en la primera se neutraliza el CD44 soluble por su ligando (ácido hialurónico), reacción que se revela en una segunda etapa por la disminución de adhesión (agregación) por parte de los eritrocitos portadores del mismo receptor CD44 en membrana, como consecuencia del consumo del ligando en la primera etapa. La agregación se evalúa en base al escor que es una medida del grado de adhesión eritrocitaria que combinado con la dilución del suero, permite determinar el Parámetro de Sensibilidad (PS). Los resultados de PS obtenidos (HTA: $1,50 \pm 0,11$ y CN: $1,07 \pm 0,09$) muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos. Este aumento de CD44 sérico podría resultar de la liberación del mismo a partir de membranas celulares en estados alterados. El desarrollo de esta nueva técnica simple, podría contribuir al estudio de marcadores involucrados en el mecanismo de adhesión celular a través del sistema CD44-hialuronato, el cual se encontraría alterado en pacientes hipertensos.

- 153. (136) ACCIONES GENÓMICAS Y NO GENÓMICAS DE LA ESTRONA EN TEJIDO CARDIOVASCULAR.** RAUSCHEMBERGER MARÍA BELÉN (1,2), SELLÉS JUANA (1), MASSHEIMER VIRGINIA (1,2)

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

Las hormonas esteroideas actúan mediante un mecanismo de acción de dos pasos convergentes, activación de sistemas de transducción de señales y posterior regulación de la expresión génica. La producción de óxido nítrico (NO) y la regulación de la proliferación celular son eventos bioquímicos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis vascular. Hemos demostrado que, en aorta de rata, la estrona (E1) estimula la síntesis de NO mediante un mecanismo de acción no genómico. El objetivo de este estudio fue investigar la regulación de las acciones genómicas (proliferación celular) y no genómicas (producción de NO) de E1 en aorta de rata. Confirmamos que la E1 estimula la actividad MAPK con efecto máximo a 10 nM. La producción de NO depende de la actividad MAPK. La presencia de 10 μ M PD 98059 (inhibidor de MAPK) disminuye la actividad NOS inducida por 10 nM E1 (214% vs 15%, 136% vs 10%, 72% vs 16% s/c; E1

vs E1 + PD 98059, a 30 seg., 5 y 20 min. resp, $p < 0,01$). En presencia de ICI 182780 (antagonista del receptor de estradiol) se anula el estímulo sobre la producción de NO inducido por 5 min de tratamiento con E1 10 nM, ($1,23 \pm 0,04$ vs $0,52 \pm 0,09$; $0,52 \pm 0,09$ vs $0,54 \pm 0,007$ pmol NO/ mg prot; E1 vs Control, en ausencia o presencia de ICI 182780 1 μ M). En cultivos primarios de células endoteliales (CE) obtenidas de explante de aorta de rata investigamos los efectos de la E1 sobre la síntesis de ADN. La cinética de incorporación de 3 H-timidina (4-48 hrs) mostró máxima incorporación a 24 hrs, seleccionando este tiempo para el tratamiento hormonal. Luego de 24 hrs de exposición con E1, esta incorporación disminuye en un 57% ($p < 0,01$), efecto que sería dependiente de la vía de MAPK. En conclusión, demostramos que en tejido vascular, la E1 inhibe la proliferación celular de CE y estimula la síntesis de NO mediante un mecanismo que comprende la participación del RE y la vía de kinasas activadas por mitógenos.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES I

- 154. (211) LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE NF-KAPPAB POR EL TNF ALFA REQUIERE DE LAS VÍAS PI3K/AKT Y JNK Y DEL RECEPTOR DE TIPO 1 DE TNF (TNFR1) PARA INDUCIR LA PROLIFERACIÓN DE CARCINOMAS MAMARIOS.** RIVAS MARTIN A., CARNEVALE ROMINA P., ROSEMBLIT CINTHIA, PROIETTI CECILIA J., BEGUELIN WENDY, CHARREAU EDUARDO H., ELIZALDE PATRICIA V., SCHILLACI ROXANA

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) - CONICET

Previamente demostramos que el TNF induce la proliferación de células de cáncer de mama murino C4HD y humano T47D a través de la activación de las vías Erk1/2, JNK y PI-3K/Akt. En este trabajo investigamos la participación del TNFR1 y TNFR2 en la activación de las vías, en la inducción de NF κ B y en la proliferación celular. Utilizamos tres mutantes de TNF, con capacidad de unirse selectivamente al TNFR1 (R1-TNF), TNFR2 (R2-TNF) murinos o a ambos receptores (R1R2-TNF), y determinamos la activación de cada vía en células C4HD por Western blot (WB). El R1-TNF indujo la estimulación de Erk1/2, JNK y Akt, similar a la obtenida con R1R2-TNF y TNF. El R2-TNF activó a Erk1/2 y débilmente a JNK y Akt. En ensayos de proliferación, el R1-TNF aumentó la proliferación un 49,3 \pm 0,1%, el R2-TNF un 14,2 \pm 0,1% y el R1R2-TNF indujo un efecto similar al del TNF. Para evaluar la actividad transcripcional de NF κ B, transfectamos de manera transiente a las células C4HD y T47D con una construcción α -luc. Al tratarlas con TNF, la actividad aumentó 3,29 \pm 0,30 y 3,94 \pm 0,29 veces, respectivamente. El TNF indujo la fosforilación en Ser 32/36 de I κ B y la translocación al núcleo de la subunidad p65 de NF κ B (WB). El R1-TNF y el R1R2-TNF activaron a NF κ B de forma similar al TNF y el R2-TNF lo hizo 1,6 \pm 0,2 veces. El bloqueo de JNK (SP600125) y Akt (Ly294002), inhibió por completo la activación de NF κ B y el bloqueo de Erk1/2 (PD98059) la inhibió en forma parcial en ambos tipos celulares. El TNF indujo un aumento de ciclina D1 y de BclXL (WB), genes blancos del NF κ B. El tratamiento con Bay11-7012, inhibidor de I κ B, bloqueó la expresión de estas proteínas y la proliferación inducidas por TNF en células C4HD y T47D. Estos hallazgos demuestran que la proliferación de carcinomas mamarios inducida por TNF procede principalmente a través del TNFR1 que señala por las vías Akt y JNK activando a NF κ B, siendo éste esencial para el aumento de la expresión de BclXL y ciclina D1.

- 155. (363) CAVEOLINA-1 FAVORECE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN CÉLULAS DE 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

Previamente identificamos a caveolina-1 (cav-1) como un gen cuya expresión es regulada positivamente por el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) mediante un mecanismo que involucra al receptor de progesterona (PR) clásico. Estos hallazgos fueron realizados en el tumor mamario murino C4HD, de origen ductal, progestágeno-dependiente, requiere MPA para su crecimiento y expresa altos niveles de PR. Demostramos que al suprimir la expresión de cav-1 disminuye la proliferación de células epiteliales C4HD inducida por MPA. A partir de estos antecedentes, evaluamos si el bloqueo de la expresión de cav-1, utilizando oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNAS), interfiere con la actividad transcripcional del PR. Para ello se realizaron transfecciones transientes con una construcción PRE-luciferasa en células C4HD y en las líneas de tumor mamario T47D y LM3, esta última cotransfectada con PR. La actividad transcripcional del PR inducida por MPA se redujo significativamente al bloquear la expresión de cav-1 con ODNAs en las células C4HD y LM3. La sobreexpresión de cav-1 en células T47D incrementó fuertemente la actividad transcripcional del PR. Por otro lado, ensayos de coimmunoprecipitación y microscopía confocal mostraron que el tratamiento de células C4HD con MPA por 5 y 10 minutos induce la asociación de cav-1 con PR. Por último, en el 16% de los carcinomas mamarios humanos se ha identificado una mutación puntual en el codón 132 del gen de cav-1. Por lo tanto, evaluamos la posibilidad de que cav-1 esté mutada en la prolina 132 en el tumor C4HD, contribuyendo así a su rol transformante. Mediante un screening mutacional con PCR-RFLP y análisis de secuencia, comprobamos que el gen de cav-1 del tumor C4HD no está mutado en el codón 132. Nuestros resultados muestran que cav-1 favorece la activación transcripcional del PR y que el efecto de cav-1 sobre la proliferación de células C4HD no puede ser atribuido a la mutación del codón 132.

- 156. (443) EL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA REGULA LA CAPACIDAD METASTÁSICA DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO MEDIANTE EFECTOS NO GENÓMICOS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (RP).** CARNEVALE ROMINA P. (1), SCHILLACI ROXANA (1), URTREGER ALEJANDRO (2), PROIETTI CECILIA (1), RIVAS MARTÍN (1), ROSEMBLI CINTHIA (1), BEGUELÍN WENDY (1), PELUFFO GUILLERMO (2), CHARREAU EDUARDO H. (1), BAL DE KIER JOFFÉ ELISA (2), ELIZALDE PATRICIA V. (1)

Instituto de Biología y Medicina Experimental (1) Instituto De Oncología Angel H. Roffo (2)

La progesterona regula diversos efectos biológicos en forma independiente de la actividad transcripcional de su receptor. En el presente trabajo se estudió la capacidad del MPA de regular la proliferación celular, la actividad de proteasas y el fenotipo metastásico de las células de carcinoma mamario murino LM3 en forma independiente de la actividad transcripcional del RP. Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con el RP (LM3-RP), con una mutante transcripcionalmente inactiva (LM3-RPi) o con una mutante que es incapaz de activar vías de transducción de señales (LM3-RPs). El tratamiento con MPA (10nM) por 24hs aumentó la proliferación celular un 43±3% en las LM3-RP y en las LM3-RPi, mientras que no se observaron diferencias en la proliferación de las LM3-RPs. Además, se analizó la regulación de la actividad del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) por MPA mediante zimografías de caseína y plasminógeno. El tratamiento con MPA por 24hs disminuyó la actividad de uPA en las LM3-RP (35±4%), en las LM3-RPi (37±5%) y en las LM3-RPs (26±5%). La regulación de la actividad de proteasas y la proliferación celular por MPA fue revertida por la presencia del antiprogestágeno RU486 y por inhibidores específicos de las vías de Erk1/2 y PI3K/Akt en las LM3-RP y RPi.

Finalmente, se evaluó la capacidad de las células LM3-RP, RPi y RPs de formar metástasis experimentales in vivo mediante inyección e.v. y recuento de metástasis pulmonares a los 28 días. La expresión del RP disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el número de metástasis de las LM3-RP, de las LM3-RPi y de las LM3-RPs respecto a las LM3 wt. La administración de MPA aumentó ($p < 0.05$) el número de metástasis de las LM3-RP y las LM3-RPi mientras que no modificó el de las de LM3-RPs. Estos resultados demuestran por primera vez que los progestágenos regulan la capacidad metastásica de células de carcinoma mamario en forma independiente de la actividad transcripcional del RP.

- 157. (257) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR P75 DE TNF α Y DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1 EN LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIAS DESENCADENADA POR TNF α EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS.** SCHERE LEVY CAROLINA (1), SLOMIANSKY VICTORIA (1), FERRAMOLA MARIANA L. (2), DI GENARO MARIA S. (2), COSO OMAR A. (1), KORDON EDITH (1)

IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (1) Dpto de Bioquímica y Cs Biológicas, Universidad Nacional de San Luis (2)

Se ha demostrado que el Factor Inhibidor de Leucemias (LIF) induce la apoptosis del epitelio mamario al finalizar el amamantamiento. Previamente habíamos reportado que TNF α presenta un patrón de expresión similar al LIF en tejido mamario in vivo y que TNF α induce la expresión de LIF a través de la activación de la quinasa Erk1/2 en células epiteliales mamarias SCp2. El objetivo del presente trabajo fue determinar la participación del factor de transcripción AP-1 y de ambos receptores de TNF α : p55 y p75 en la expresión del LIF inducida por TNF α . Mediante el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA), hallamos que el tratamiento de células SCp2 con TNF α induce la activación de AP-1, la cual es bloqueada por el inhibidor farmacológico de la fosforilación de Erk1/2, PD98059. Además mediante EMSA supershift encontramos que c-Jun formaría parte del complejo AP-1 activado. Dado que la proteína c-Fos también puede formar parte de este complejo, evaluamos la inducción de la expresión y activación de esta proteína. Resultados obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real y por ensayo de Western blot, mostraron que TNF α induce la transcripción de c-fos y la traslocación de la proteína c-Fos en el núcleo. Por otro lado, con el objeto de determinar el tipo de receptor de TNF α involucrado en la inducción de la expresión de LIF, las células fueron tratadas con anticuerpos antagonistas específicos para ambos receptores. Mediante ensayos de RT-PCR encontramos que únicamente el uso del anticuerpo anti p75 inhibió la expresión del LIF inducida por TNF α . Además, observaciones realizadas en ratones p55 $^{-/-}$ a 48hs de iniciada la involución no mostraron una significativa inhibición de la expresión de LIF cuando se comparó con animales salvajes. En conjunto, estos resultados sugieren que en células epiteliales mamarias el TNF α induce la expresión de LIF a través de su interacción con p75, la fosforilación de Erk1/2 y la sucesiva activación del factor de transcripción AP-1.

- 158. (684) EXPRESIÓN DE LA ACIL-COA SINTETASA 4 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA DE DISTINTA AGRESIVIDAD, MDA-MB-231 Y MCF7.** MALO BERTI PAULA, TOLEDO MARIA FERNANDA, CASTILLO ANA FERNANDA, PAPADOPOULOS VASSILIOS, PODESTÁ ERNESTO J.

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA Department of Biochemistry and Molecular Biology, Georgetown University School of Medicine, Washington, USA

En células adrenales y de Leydig, el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), la proteína STAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein), la acil-CoA tioesterasa mitocondrial 1 (Acot2)

y la acil-CoA sintetasa 4 (ACS4) están involucradas en el transporte de colesterol a la mitocondria. Hemos descripto que ACS4 y Acot2 actúan en forma concertada en una nueva vía de regulación de los niveles intracelulares de ácido araquidónico (AA), evento obligatorio para la inducción de StAR y la esteroidogénesis. El transporte de colesterol y la expresión de PBR han sido involucrados en la progresión tumoral, existiendo una fuerte correlación positiva entre estos parámetros y la malignidad del cáncer de mama. También se conoce que el AA juega un papel importante en la carcinogénesis de colon y que en este tipo de cáncer se incrementa la expresión de ACS4. Dada la importancia de ACS4 en la regulación de los niveles de AA y en el transporte de colesterol, nuestro objetivo fue estudiar la expresión de ACS4 en dos líneas celulares de cáncer de mama humano de distinta agresividad, MDA-MB-231 y MCF7. En experimentos de Western Blot el anticuerpo anti-ACS4 reveló dos bandas específicas en MDA-MB-231 y una única banda en MCF7. La cuantificación de la señal de ACS4 demostró que la expresión es mayor en MDA-MB-231 (4 veces) que en la línea menos agresiva MCF7. Resultados similares fueron observados por inmunocitoquímica. El análisis de las distintas fracciones subcelulares reveló que ACS4 se localiza principalmente en núcleo y mitocondria. Los niveles del ARNm de ACS4 fueron cuantificados por Real Time PCR y relativizados contra el ARNr 18S, resultando ser mayores en la línea MDA-MB-231 ($0,9457 \pm 0,0584$, media \pm DS) comparados con la línea MCF7 ($0,0042 \pm 0,0005$). Estos resultados demuestran una mayor expresión de ACS4 en la línea celular tumoral más agresiva, sugiriendo un rol de ACS4 y PBR en la regulación de los niveles de AA y transporte de colesterol en estos tipos celulares.

- 159. (627) LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 MITOCONDRIAL ES ESTRUCTIVAMENTE REQUERIDA PARA LA ESTEROIDOGÉNESIS DEPENDIENTE DE PKA EN CÉLULAS MA-10. PODEROSO CECILIA (1), CONVERSO DANIELA (2), GALLI SOLEDAD (2), RODRÍGUEZ VICTORIA (1), PAZ CRISTINA (1), CARRERAS MARÍA CECILIA (2), PODEROSO JUAN JOSÉ (2), PODESTÁ ERNESTO J. (1)**

Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA Laboratorio del Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas. UBA

La etapa temprana de la esteroidogénesis ocurre en mitocondria e involucra la activación de la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) que participa en el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna, paso limitante en la síntesis de esteroides. Nuestro grupo y otros han descripto que ERK1/2 (extracelular signal-regulated kinases, una MAP quinasa) se activa por fosforilación en mitocondria. Con el objetivo de investigar efectos de ERK1/2 mitocondrial en la esteroidogénesis, células MA-10 (línea de células de Leydig murinas) se estimularon con hCG (Gonadotropina Coriónica humana) u 8Br-AMPC (análogo permeable del AMPc) en presencia o ausencia de inhibidores de MEK1/2 (ERK1/2 quinasa), PD98059 (PD) y U0126 (U0). Ambos compuestos inhibieron la esteroidogénesis estimulada hormonalmente sin afectar los valores basales de esteroides, a los 15 minutos: control= $0,14 \pm 0,06$; 8Br-AMPC= $0,7 \pm 0,14$; 8Br-AMPC + PD= $0,21 \pm 0,07$; 8Br-AMPC + U0= $0,18 \pm 0,03$ y a los 60 min.: control= $0,17 \pm 0,03$; hCG= $5,28 \pm 1,70$; hCG + PD= $0,82 \pm 0,26$; hCG + U0= $0,47 \pm 0,15$; 8Br-AMPC= $3,16 \pm 0,80$; 8Br-AMPC + PD= $0,21 \pm 0,06$; 8Br-AMPC + U0= $0,21 \pm 0,05$ ng de progesterona/ml ($p < 0,05$). Se observó la fosforilación de ERK1/2 siendo máxima a los 5 minutos de estimulación disminuyendo a niveles basales a 1 hora sin afectar la cantidad de ERK1/2 total. Una curva de activación similar se encontró en fracciones mitocondriales puras, detectada por inmunoblot o por inmunohistoquímica. La activación de MEK1/2 también fue observada en mitocondrias de MA-10 estimuladas con 8Br-AMPC, consecuente con el perfil de activación de ERK1/2 mitocondrial. La fosforilación en mitocondria tanto para MEK1/2 como ERK1/2 por AMPc fue inhibida por H-89, inhibidor permeable de PKA. En base a estos resultados, se infiere que la activación sostenida de MEK1/2 y ERK1/2 en la mitocondria vía PKA se requiere para el transporte de colesterol

dependiente de StAR y esteroidogénesis estimulada hormonalmente en células MA-10.

- 160. (304) EFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LA TRADUCCIÓN DE LA SEÑAL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN GH. SOTELO ANA ISABEL, MIQUET JOHANNA GABRIELA, GONZÁLEZ LORENA, TURYN DANIEL**

Facultad de Farmacia y Bioquímica

La hormona de crecimiento (GH) es una hormona anabólica que promueve el crecimiento corporal. Por unión a su receptor de membrana activa a la tirosina-quinasa JAK2 y, a través de ésta, a distintos mediadores celulares entre los que se encuentra el transductor de señal y activador de transcripción 5 (STAT5). La señal finaliza, entre otros mecanismos, por la aparición de supresores de señal de citoquinas (SOCS/CIS). Ratones que sobreexpresan GH presentan desensibilizada la principal vía de traducción de la hormona –la vía JAK2/STAT5–; este hecho se relaciona con una mayor expresión constitutiva del supresor inducido por citoquinas CIS. La vitamina D inhibe la síntesis de la proteína CIS y, por esta razón, podría ser importante como coadyuvante en el tratamiento crónico con GH. El objetivo de este trabajo fue, entonces, evaluar si por tratamiento previo con vitamina D se puede disminuir la expresión de CIS en los ratones transgénicos que sobreexpresan GH de modo de permitir la traducción de la señal de la GH en este modelo. Para ello se evaluó la abundancia de los supresores SOCS/CIS en dos tejidos blanco, hígado y músculo, y la fosforilación en tirosinas de STAT5 luego de un estímulo con GH en los mismos tejidos. Sin embargo, el tratamiento con vitamina D no provocó una disminución del contenido de CIS en hígado o músculo como tampoco causó variación en el contenido de SOCS-2 y -3 en hígado de los ratones que sobreexpresan GH. En consecuencia, tampoco pudo observarse activación de STAT5 frente a un estímulo con GH en estos ratones. Se concluye que el tratamiento con vitamina D no fue efectivo para inhibir la síntesis de CIS in vivo y, por lo tanto, para permitir la resensibilización a la hormona de crecimiento en hígado o músculo de ratones que sobreexpresan GH, por lo que no sería un coadyuvante adecuado para la terapia con GH.

HEMATOLOGÍA I

- 161. (115) LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LIGANDOS DE GALECTINA-1 EN PLAQUETAS HUMANAS. GONZÁLEZ MARIANA MARTA, FINK NILDA E**

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

Las galectinas son una familia de proteínas con secuencias características y con afinidad por azúcares β -galactosídicos. La galectina-1 es un homodímero, con subunidades de 14.5 kDa. Con el fin de estudiar la localización de ligandos de gal-1 en plaquetas humanas (PltH), se prepararon anticuerpos anti-gal-1 de bazo porcino y humano en conejo, con los que se efectuó la inmunohistoquímica. Las PltH se separaron de plasma rico en Plts, de tres dadores sanos. Se hicieron experimentos por triplicado, con sus dadores de PltH (500x106/ml) en reposo o activadas con trombina (Tr) (0.2 U/ml, entre 0 a 3 min). Posteriormente, las PltH se incubaron con gal-1 esplenica, en concentraciones subagregantes entre 0-0.5 μ M, determinadas en ensayos previos. La suspensión de Plts (50 ml), controles, tratadas con Tr y con gal-1, se fijaron en portaobjetos, se incubó con antisuero anti-Gal-1 o con suero preinmune (SPI) de conejo (1/100). Luego, se reveló con anti-IgG de conejo-FITC (1/400) y se observó con microscopio de epifluorescencia. Los controles con SPI y de pegado inespecífico de anti-IgG-FITC fueron negativos. Se observó fluorescencia en Plts en reposo y con mas intensidad en PltH activadas, con anticuerpo anti-gal-1 de bazo porcino o humano. En las Plts incubadas con gal-1 inhibida con lactosa 100mM, se observó fluorescencia de menor intensidad que con la lectina sin inhi-

bir, lo que indica, al igual que en numerosos hallazgos en otras células, que la interacción con el ligando puede ser carbohidrato-proteína y proteína-proteína. Se observó que la fluorescencia en la membrana de Plts se distribuye con patrones variados (uniforme, en grumos, en casquete). Se concluye que, en las Plts hay ligando/receptores para gal-1 y que su presencia podría indicar que moléculas del tipo integrinas u otras diferentes podrían ser potenciales receptores relacionados con funciones como adhesión o agregación plaquetaria.

162. (169) ASOCIACIÓN DE VON WILLEBRAND TIPO 2M VICENZA Y TIPO 2N. KELLER LETICIA, WOODS ADRIANA INES, FARIAS CRISTINA ELENA, SANCHEZ LUCEROS ANALIA, GROSSO SILVIA HAYDÉE, KEMPFER ANA CATALINA, POWAZNIAK YANINA PAOLA, CALDERAZZO JULIO CESAR, LAZZARI MARIA ANGELA

Instituto de Investigaciones Hematológicas Academia Nacional de Medicina y CONICET

Introducción: La enfermedad de Von Willebrand (VWD) 2M Vicenza se caracteriza por herencia autosómica dominante con tendencia hemorrágica leve a moderada y presencia de multímeros extragrandes en plasma, bajos FVIII/VWF, asociada a la presencia de la mutación R1205H (exón 27) del gen del VWF. Algunos pacientes tienen la mutación M740I (exón 17) y otros, ambas. La VWD 2N es resultado de mutaciones que causan disminución de la capacidad de unión del FVIII al VWF (exones 17-21, 24 y 25) lo que origina FVIII bajo y puede confundirse con hemofilia A leve. Pacientes heterocigotas son generalmente asintomáticos, mientras que homocigotas y heterocigotas compuestas tienen fenotipo con FVIII muy disminuido. **Paciente, Material y métodos:** Paciente de 18 años, con hematomas, hemorragia post-traumática bucal a los 9 años. FVIII=14 U/dL (vn=50-150 U/dL); VWF:RCo < 10 U/dL (vn=50-150 U/dL); VWF:Ag=9 U/dL (vn=50-150 U/dL); VWF:FVIII/VWF:Ag=0,4 (vn > 0.8); multímeros extragrandes: 52% (vn=5-15%). Madre con epistaxis, hematomas, menorragia (score 248; vn < 185) y hemorragia post aborto. FVIII=40 U/dL; VWF:RCo=66 U/dL; VWF:Ag=75 U/dL; VWF:FVIII/VWF:Ag=1; no presenta multímeros extragrandes. **Respuesta al DDAVP (60min):** adecuada. Se amplificaron los exones 17-24 y 27 del gen del VWF por PCR y se analizaron por heterodúplex mediante CSGE. Los que dieron doble banda se secuenciaron. **Resultados:** Paciente: heterocigota para las mutaciones R924Q (exón 21) y R1205H. Madre: heterocigota para R924Q. **Discusión:** La presencia de VWF:Ag y VWF:RCo bajos, multímeros extragrandes y la mutación R1205H, son compatibles con VWD 2M Vicenza. El VWF:FVIII/VWF:Ag bajo sólo parece estar asociado a la mutación R924Q, aunque en la madre sólo afecta los niveles de FVIII. **Conclusión:** Reportamos asociación de VWD 2M Vicenza y 2N en una mujer con sangrado, niveles bajos de VWF, VWF:RCo, FVIII y VWF:FVIII/VWF:Ag y presencia de multímeros extragrandes del VWF con mutaciones R924Q y R1205H.

163. (598) RECEPTOR DE IL-6 EN MONOCITOS DURANTE SU DIFERENCIACIÓN A MACRÓFAGOS EN SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS GOETTE NORA, LEV PAOLA, SALIM JUAN PABLO, MARTA ROSANA, MOLINAS FELISA CONCEPCIÓN

IDIM

La interleuquina 6 participa en la respuesta inflamatoria y en la proliferación y diferenciación megacariocítica, por ello es interesante estudiar anomalías en la expresión de sus receptores en los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMC). La respuesta celular ocurre por unión a su receptor de membrana (IL-6Ra) o a su forma soluble (IL-6sR). Previamente demostramos que los monocitos (Mo) de los pacientes con trombocitemia esencial liberan más IL-6sR que los normales. En este trabajo se investigó la expresión de IL-6Ra en Mo de pacientes con SMC durante su diferenciación a macrófago. Se estudiaron 4 pacientes y 4 controles normales purificándose los Mo por método inmunomag-

nético. Las células se cultivaron 9 días en IMDM con suero fetal bovino. Se extrajo el RNA al día 0 (condiciones basales) y 1 y se evaluó la expresión de IL-6Ra por RT-PCR semicuantitativa, usando como gen constitutivo el GAPDH. Se estudió la expresión de IL-6Ra en membrana (CD126) el día 0, 1, y 9 por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como cociente de marcación específica/isotipo control en la citometría y de la densidad de los productos IL-6Ra/GAPDH en la PCR. Se observó una mayor expresión de IL-6Ra en membrana en los pacientes en todos los momentos evaluados, aunque sin significación estadística; día 0: normales 1.58 (1.17-1.96) mediana y rango, pacientes 1.94 (1.1-6), día 1: 1.09 (1.08-1.43) y 1.55 (1.18-2.87), día 9: 1.34 (0.9-1.41) y 1.46 (0.86-2.03) respectivamente. En cambio, el nivel de expresión del RNAm de IL-6Ra por PCR fue menor en los pacientes, 1.35 (0.6-3.73) que en los controles 3.37 (1.56-3.37) a tiempo 0, p=NS. Aunque en el día 1 sólo se pudo evaluar 2 normales y 2 pacientes, la disminución del RNAm de IL-6Ra observada en condiciones basales se revirtió. Los datos de citometría muestran un aumento de la expresión del IL-6Ra en Mo-macrófagos de SMC. Sin embargo los resultados del RNA son discordantes posiblemente por el bajo número de casos evaluados.

164. (660) EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA SOBRE LA ANTITROMBINA LATENTE. OBERHOLZER MARÍA VICTORIA, LAURICELLA ANA MARÍA, CASTAÑON MARÍA MERCEDES, ZANARO NOEMÍ, SASSETTI BEATRIZ, QUINTANA IRENE

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, FCEyN, UBA

La antitrombina (AT) es el principal inhibidor fisiológico de proteasas del sistema de coagulación. La molécula de AT puede adoptar tres conformaciones: activa, clivada y latente; esta última de menor afinidad por heparina, sin actividad inhibitoria de proteasas pero con potente rol anti-angiogénico. **Objetivo:** evaluar el efecto de la homocisteína (Hcy) sobre la estructura y función de la AT. **Materiales y métodos:** se incubó AT purificada en presencia de diferentes concentraciones de Hcy (25, 100, 250 y 500 µM) o solución fisiológica (control). Se realizaron: inmunoelectroforesis cruzadas (CIE, con heparina en la primera dimensión y el anticuerpo policlonal anti-ATIII en la segunda), electroforesis en poliacrilamida (PAGE nativa) y western blot (WB). Se determinó la capacidad inhibitoria de AT, cuantificando la actividad amidolítica de la trombina residual con sustrato cromogénico S-2238. **Resultados:** por CIE, se observó una disminución notable, Hcy dosis dependiente, en las áreas correspondientes a la zona de menor afinidad por heparina (AT latente), cuyas áreas relativas resultaron 44, 28, 26 y 15 % para el tratamiento con SF, Hcy 25, 250 y 500 µM respectivamente. Las bandas proteicas observadas en PAGE no mostraron diferencias respecto del control, en cambio el WB mostró la desaparición de la banda rápida en las muestras incubadas con Hcy. La actividad biológica anticoagulante (%) fue semejante a la del control en todas las muestras analizadas (n=3): ATSF = 87 ± 3; ATHcy 25 µM = 82 ± 4; ATHcy 100 µM = 91 ± 5; ATHcy 250 µM = 90 ± 4; ATHcy 500 µM = 85 ± 3. **Conclusión:** los resultados muestran que la Hcy afectaría la biodisponibilidad de la forma latente, sugiriendo otra acción perjudicial relacionada con la hiperhomocisteinemia.

165. (678) RESPUESTA HEMATOLÓGICA A LA ANEMIA EN RATONES ESPLENECTOMIZADOS. VEUTHEY TANIA, SÁNCHEZ MARIANELA, D'ANNA MARÍA CECILIA, GATTI CHRISTIAN, ROQUE MARTA ELENA

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

En estudios previos demostramos que la restauración eritropoyética en la anemia murina depende en gran medida del bazo por su capacidad de anidar células madres eritropoyéticas medulares. El objetivo fue estudiar la respuesta hematológica a la crisis hemolítica en ratones esplenectomizados. Ratones hembras CF1 (30±3g) se agruparon en: Grupo Control (GC) (n=18): dosis intraperitoneal (i.p.) de Solución Salina (SF) (300µl; días:

0,2), postcirugía simulada; Grupo anémico (GA)(n=18): inducción de anemia con Fenilhidrazina (FHZ) (i.p., 60mg/Kg/300mL; días: 0,2) postcirugía simulada; Grupo esplenectomizado no anémico (GENA) (n=18): SF i.p. (300 mL; días: 0,2) postesplenectomía; Grupo esplenectomizado anémico (GEA) (n=18): FHZ i.p (60mg/Kg/300mL; días: 0,2) post esplenectomía. Sangre venosa: cada 2 días hasta día 10 (n=3). Evolución y recuperación de la anemia: Hb, HCT, reticulocitos y Cuerpos de Heinz. Tanto el GA como el GEA mostraron hemólisis franca el día 4 (HCT:32%±0,71; Hb:8,8g/dL±0,18; HCT:30%±0,71; Hb:8,5g/dL±0,03, respectivamente), mientras que el GC y GENA no presentaron variaciones durante la experiencia. Día 6: se observó recuperación en el GA (HCT:42%±1,41; Hb:12g/dL±1,37). El GEA se recuperó de la anemia en forma tardía (día 10), respecto al GA cuya recuperación mostró el comportamiento habitual (día 6). El mayor aumento de Reticulocitos observado en el día 8 (57%±10) fue consistente con la respuesta eritropoyética tardía del GEA, mientras que en GA se observó el día 6 (58%±15). En el grupo anémico sin bazo, los Cuerpos de Heinz continuaron elevados hasta el día 8 (30%±5) a diferencia del grupo con bazo (día 6). En el GEA se observó acentuada celularidad atípica. La recuperación tardía de la volemia celular frente a la hemólisis en ausencia de bazo, evidenció que este órgano compensa con mayor eficiencia la anemia que el tejido medular. La médula, principal tejido hemopoyético en condiciones fisiológicas, no es preponderante en el estrés hematológico de estos mamíferos. Palabras clave: eritropoyesis, anemia, esplenectomía.

166. (685) SOBRECARGA DE HIERRO EN UN MODELO MURINO. VEUTHEY TANIA VANESA, PENNACCHIOTTI GRACIELA, DANNA MARIA CECILIA, SANCHEZ MARIANELA, GATTI CHRISTIAN JORGE, ROQUE MARTA ELENA

Universidad Nacional del Sur

En las patologías que cursan con exceso de Fe de depósito, las células del sistema reticuloendotelial y los hepatocitos lo almacenan mediante mecanismos modulados por Hcpidina, un regulador negativo del metabolismo de este nutriente. Para reproducir esta condición se indujo sobrecarga de Fe en ratones y el estado del Fe hepático se evaluó por métodos cuantitativos y semicuantitativos. Ratones hembras CF1(30±3g) se agruparon en: Lote control (LC)(n=3): dosis de solución salina 300 µl intraperitoneal (i.p.)(días:0,10); Lote experimental (LE) (n=18) desarrollado por administración de 2 dosis i.p. de Fe-Dextrán (Días:0,10): a)Dosis 0,5g/kgpeso; b)Dosis 1g/kgpeso. Se determinaron HCT, Hb y Ferremia (días:0,10,20; n=3). El Hígado se perfundió con NaCl 0.9% y Heparina. El Fe tisular se evaluó por colorimetría previa digestión ácida. Los depósitos de Fe en el tejido hepático se valoraron por Tinción de Perls y se semicuantificaron por un score que estima la presencia de Fe en hepatocitos y células de Kupffer y expresa su contenido por porcentaje de estas células. Fe en Hepatocitos: a)No detectado: 0; b)Escaso %: 1; c)5-10%: 2; d)> de 40%: 3; e)100%: 4. Fe en células de Kupffer: a)No Detectado: 0; b)33%: 1; c)66%: 2; d)> de 66%: 3. Durante la experiencia no variaron HCT, Hb y Ferremia. El estudio cuantitativo mostró que los depósitos de Fe hepático aumentaron hacia el día 20 en el lote de dosis 0,5gFe/kgpeso (25,4µmol/ghíg±4,8), con cambios similares en lote de dosis 1gFe/kgpeso (38,2µmol/ghíg±12) con respecto al lote control (1,4µmol/ghíg±0,8). El análisis semicuantitativo del depósito de Fe hepático no mostró dependencia de las dosis estudiadas. Tanto en la dosis de 0,5gFe/Kgpeso como en la de 1gFe/Kgpeso, los depósitos de hierro no mostraron diferencias significativas. Demostramos que sólo la cuantificación de Fe hepático discrimina el nivel de sobrecarga de las dosis estudiadas. Se determinó la dosis que induce la sobrecarga sin provocar daños estructurales severos.

167. (321) EFECTO IN VITRO DE PROANTOCIANIDINA EXTRAÍDA DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC) SOBRE LA DEFORMABILIDAD, RESISTENCIA OSMÓTICA Y FORMA ERITROCITARIA. CROSETTI¹ DIEGO, FERRERO¹

MARIANA, DOMINIGHINI¹ ALICIA, GONZALVES¹ JOSÉ, ALVAREZ³ MARÍA DEL LUJÁN, RONCO³ MARÍA TERESA, WAGNER² MARCELO, GURNI² ALBERTO, CARNOVALE³ CRISTINA, LUQUITA¹ ALEJANDRA

¹Cátedra De Biofísica, Facultad De Ciencias Médicas. UNR; ²Cát. Fisiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR-CONICET; ³Cát. Farmacobotánica, Fac. Farmacia y Bioquímica-UBA

Lc o "muérdago criollo", es una planta hemiparásita Argentina. Anteriormente demostramos que el tratamiento de ratas con Lc in vivo e in vitro, incrementa la viscosidad sanguínea y disminuye la deformabilidad eritrocitaria. Del extracto crudo de Lc se purificó Proantocianidina (PLC). Objetivo: analizar el efecto directo de PLC sobre la deformabilidad, resistencia osmótica y forma eritrocitaria. Método: A ratas Wistar machos adultas se les extrajo sangre anticoagulada por punción cardíaca. La sangre obtenida se fraccionó en Control (C) (n=5) y Tratada (T). A T (n=6) se le agregó PLC a una concentración de 12 mg%, incubándose ambas fracciones 30 minutos a 37°C. Resultados: Forma eritrocitaria (distinción de las formas por microscopía y cálculo del Índice Morfológico (IM): C:- 0,49 ± 0,03 ; T: -1,26 ± 0,10* (*p< 0,01 vs. C). Los estomatocitos se incrementaron significativamente en T respecto de C (p < 0,001). Índice de rigidez (IR) (filtración a través de membranas nucleopore): C: 5,81 ± 1,42; T: 31,51 ± 1,53* (*p< 0,001 vs. C). Resistencia osmótica (RO) en soluciones de ClNa a distintas osmolaridades, obteniéndose: X 50: concentración de ClNa que produce 50% de hemólisis (mM) y Beta: parámetro de homogeneidad de la población globular. X50: C: 0,45 ± 0,01; T: 0,54 ± 0,02*(*p< 0,05). Parámetro Beta: C:11,41 ± 0,69 T: 7,72 ± 0,54*(*p< 0,05 vs. C). Conclusión: El efecto de PLC sobre el eritrocito produce un cambio de forma de discocito a estomatocito (IM más negativo). En base a estudios realizados por otros autores, el cambio de forma que estudiamos estaría indicando una interacción de PLC con la hemicapa interna de la bicapa lipídica de la membrana eritrocitaria modificando su curvatura. Este cambio explicaría la disminución observada en la deformabilidad eritrocitaria (aumento de IR), la pérdida de homogeneidad de la muestra (disminución de Beta) y la disminución de la resistencia osmótica (incremento de X50).

168. (364) EFECTOS DEL ALUMINIO SOBRE ERITROCITOS HUMANOS: ALTERACIONES EN LA LIPOPEROXIDACIÓN Y EN LA MICROVISCOSIDAD INTERNA. HUARTE MÓNICA, PIEHL LIDIA, BAZZONI GRACIELA, HERNÁNDEZ GLADIS, BOLLINI ADRIANA, RASIA MARTA, RUBÍN DE CELIS EMILIO

Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA; Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

En estudios previos hemos demostrado cambios en las propiedades dinámicas de la membrana del glóbulo rojo (GR) luego del tratamiento con Al(III), observándose una disminución en la fluidez midiendo el parámetro de orden (S) por marcación con ácido 5-doxil esteárico (5-DE). Los objetivos del presente trabajo fueron: (1) determinar si dicho cambio está relacionado con lipoperoxidación (LPO) del GR, (2) estudiar los posibles efectos del Al(III) en la microviscosidad interna del GR y en los índices hematimétricos. GR de individuos sanos, previamente lavados con PBS, fueron incubados 30 minutos a 37 °C en ausencia y en presencia de soluciones de AlCl₃ (1 y 10 µM). Se determinó: 1) fluidez de membrana (parte interna) midiendo el tiempo de correlación (T) del ácido 16-esteárico (16-DE) por resonancia de spin electrónico (ESR), 2) grado de LPO midiendo la concentración de TBARS, 3) microviscosidad interna midiendo el T del marcador 4-maleimida TEMPO (4-MAL) por ESR y 4) VCM, HCM y CHCM. En presencia de Al (III) 1 y 10 µM habíamos observado un aumento en S (0,754±0,005* y 0,755±0,006* respectivamente) respecto al control (0,734±0,005). Los resultados indican que a concentración 10 µM se produjeron alteraciones tanto en la parte externa (5-DE) como interna (16-DE) de la membrana, mientras

que el Al 1 μ M solo alteró su parte externa. Dado que el Al(III) es un metal sin actividad redox, se propone que la interacción del Al(III) con la membrana eritrocitaria produciría alteraciones en el orden de la misma, lo cual favorecería la LPO inducida por el hierro presente en el GR. A nivel intra-citoplasmático, el Al(III) produjo una disminución en la CHCM debida a un aumento en el VCM lo cual explicaría la disminución en la microviscosidad interna. * $p < 0,05$ test de Student-Newman-Keule

Resultados

Tratamiento	T (16-DE) (ns)	TBARS (nM MDA)	T (4-MAL) (ns)	CHCM (g/dl)
Control	5,30 \pm 0,03	4,2 \pm 0,2	1,79 \pm 0,02	35,5 \pm 0,5
Al (III) 1 μ M	5,33 \pm 0,02	4,9 \pm 0,6	1,78 \pm 0,02	33,9 \pm 0,6
Al (III) 10 μ M	5,49 \pm 0,07*	5,8 \pm 0,6*	1,73 \pm 0,01	32,9 \pm 0,8*

INFECTOLOGÍA II

169. (563) LA BACTERIOFERRITINA DE BRUCELLA ABORTUS ES UNA PROTEÍNA INDUCIDA EN FASE ESTACIONARIA QUE FUNCIONA COMO UNA VERDADERA FERRITINA. MARTINEZ MARCELA, UGALDE RODOLFO A., ALMIRON MARTA

IIB-INTECH / UNSAM-CONICET

Las bacterioferritinas (Bfr) son proteínas semejantes a ferritinas con el agregado de grupos hemos en su estructura. Su rol biológico aún no está definido para Bfr homopoliméricas del tipo de la que posee *Brucella abortus*. Este patógeno intracelular es el causante de la zoonosis denominada brucelosis. Anteriormente habíamos descrito que un mutante bfr presentaba un patrón de transcripción alterado en genes regulados por Fe. Dado que *B. abortus* no posee ferritina nos propusimos demostrar en el presente trabajo su rol como proteína de almacenamiento de Fe, estudiar su regulación y la sensibilidad al H_2O_2 . Los estudios se realizaron con la cepa virulenta 2308, el mutante bfr y éste complementado con el gen salvaje bfr. Los cultivos se hicieron con y sin limitaciones de Fe. Por espectrometría de absorción atómica se determinó la concentración intracelular de Fe. Por métodos químicos se determinó la concentración del hemo. Para los ensayos de transcripción se construyó una cepa bfr-lacZ y la actividad beta galactosidasa se ensayó por el método de Miller. La sensibilidad al H_2O_2 se determinó midiendo el halo de inhibición del crecimiento en placa. Los resultados obtenidos indican que la transcripción del gen es inducida por deficiencia de Fe (634 \pm 23 vs 984 \pm 37U) y durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano (1420 \pm 129 U). El contenido de Fe es significativamente más elevado en la cepa salvaje que en el mutante (2,3x10⁻⁴ vs. 0,9x10⁻⁴ g/g peso seco bacteriano), hecho que se revierte por complementación (2,3x10⁻⁴g/g). La sensibilidad al H_2O_2 fue similar para la cepa salvaje y el mutante, pero aumentó 1,5 veces su valor para la cepa complementada aunque la concentración de hemo fue similar entre ellas (14-16 nM). Estos resultados indican que en *B. abortus*, Bfr almacena Fe resguardando a la célula de su participación en reacciones tóxicas. El gen se induce cuando la concentración de Fe disminuye y durante la fase estacionaria.

170. (736) ESTUDIO DE LA PREVALENCIA GENOTÍPICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B ENTRE USUARIOS DE DROGAS INYECTABLES (UDIS) DE LA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES. TRINKS JULIETA (1), CUESTAS MARÍA LUJÁN (1), MATHET VERÓNICA LIDIA (1), MINASSIAN MARÍA LAURA (1), RIVERO CINTIA WANDA (1), RUIZ VANESA (1), ROSSI DIANA (2), REY JORGE (3), WEISSBACHER MERCEDES (4), MARTÍNEZ PERALTA LILIANA (4), OUBIÑA JOSÉ RAÚL (1)

Centro para e Estudio de las Hepatitis Virales, Dto. de Microbiología, Fac. de Medicina - UBA (1) Intercambios, Asociación Civil (2) Dto. de Hemoterapia e Inmuno-

hematología, Htal. de Clínicas José de San Martín - UBA (3) Centro Nacional de Referencia para el Sida, Dto. de Microbiología, Fac. de Medicina - UBA(4)

Introducción: El HBV comprende 8 genotipos (A-H), siendo el F (64%) y el A (17,3%) los de mayor prevalencia en hemodonantes de Argentina. Ciertos genotipos del HBV se asocian con el curso evolutivo de la infección, relacionándose al A con una enfermedad crónica más leve y con menor mortalidad que F. Sin embargo, se desconoce asociación alguna entre genotipo y vía de infección. El objetivo del presente estudio fue investigar la prevalencia genotípica del HBV entre usuarios de drogas inyectables (UDIs) de Buenos Aires. Materiales y Métodos: Se extrajo el ADN del HBV de 78 sueros de UDIs obtenidos en el período 2000-2001. El gen S fue amplificado mediante dos protocolos de PCR y PCR anidada, realizándose su tipificación mediante dos técnicas de RFLP. Se determinó la presencia de antígeno de superficie del HBV (HBsAg) e IgG anti-core (IgG anti-HBc) mediante ELISA. Resultados: Los UDIs fueron divididos en 3 grupos de acuerdo a su patrón serológico. El primer grupo incluyó a 6 individuos que presentaron HBsAg detectable e IgG anti-HBc negativo. El segundo grupo incluyó a 10 UDIs que mostraron positividad para HBsAg y para IgG anti-HBc. Finalmente, un tercer grupo reunió a 62 UDIs que exhibían la presencia aislada de IgG anti-HBc. Veinte muestras (25,6%) resultaron positivas para el ADN de HBV: 3 UDIs del primer grupo (50%), 8 muestras del segundo (80%) y 9 del tercero (14,5%). Debido a la baja carga viral, sólo 14 de 20 muestras pudieron ser genotipificadas por RFLP: dos (14, 3%) se asignaron al genotipo C y el resto (85,7%) al genotipo A. Conclusiones: Este es el primer estudio de nuestro país en reportar la prevalencia de HBV ADN en UDIs. El predominio del genotipo A entre UDIs (85,7%) contrasta con la actual prevalencia de este genotipo entre hemodonantes de Argentina ($p < 0,0011$). Se deberá evaluar si la infección por el genotipo A de HBV se asocia a un curso evolutivo diferente en UDIs solo o frente a la eventual co-infección con HIV.

171. (204) CÉLULAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON HIV-1: INTERACCIÓN DE ANTIRRETROVIRALES CON INMUNOMODULADORES. RIVA DIEGO ARIEL, FERNÁNDEZ LARROSA NICOLÁS PABLO, DOLCINI GUILLERMINA LAURA, MARTÍNEZ PERALTA LILIANA, COULOMBIÉ FÉLIX CARLOS, MERSICH SUSANA ESTHER

Lab Virología. Depto Química Biológica. FCEyN. UBA; CNRS. Depto Microbiología. F. Medicina. UBA.

La existencia de reservorios de células infectadas con el virus HIV-1 es uno de los mayores inconvenientes que existen para lograr la erradicación de la infección. Dentro de los tratamientos antirretrovirales existentes, tanto los inhibidores de la transcriptasa reversa (Zidovudina: AZT) como los inhibidores de proteasa (Indinavir: IDV) se asocian a distintos efectos adversos. El uso de sustancias que regulen la activación de los factores de transcripción podría afectar tanto la infección viral, como las reacciones colaterales presentes en las células infectadas y no infectadas. El objetivo de este trabajo es caracterizar la acción de dos agentes inmunomoduladores que actúan a nivel de NFkappa-B: Curcumina (Cur) y Sulfasalazina (Sul), en combinación con dos compuestos antirretrovirales. En las células tratadas con diversos compuestos, en concentraciones no citotóxicas (analizadas por el método de MTT) y en células control se determinó: (a) liberación del antígeno viral p24, mediante ELISA; (b) infectividad viral por titulación en células MAGI; (c) infectividad relativa calculada como (b)/(a). El tratamiento con AZT sobre las células persistentemente infectadas con HIV-1 (células H9+) redujo (b) de manera dosis dependiente, mientras no afectó (a). En cambio IDV redujo tanto (b) como (a) de forma dosis dependiente. La combinación de AZT+Cur disminuyó (c) en un 70% y AZT+Sul disminuyó (c) en un 75% frente al tratamiento con AZT individual (0,06 y 0,05 frente a 0,20). Tanto la combinación de IDV+Cur como IDV+Sul redujeron (c) un máximo de 68% y 64%, con respecto al tratamiento con

IDV (0,07 y 0,08 frente a 0,22 respectivamente). Se concluye que el uso de sustancias inmunomoduladoras en combinación con el tratamiento antirretroviral actual, podría favorecer la disminución en la infectividad de la progenie viral, generada por células persistentemente infectadas con el virus HIV-1.

172. (358) LACTOFERRINA BOVINA Y MASTITIS EN GANADO DE TAMBO. CHANETON LUCIANO, PÉREZ SÁEZ JUAN MANUEL, TIRANTE LILIANA, JAVIER CHAVES, BUSSMANN LEONARDO

IByME, CONICET; J. Chaves y Asociados. Control de Mastitis y Calidad de Leche

La mastitis bovina es la enfermedad de mayor costo y prevalencia en el ganado bovino de tambó. La lactoferrina bovina (LFB) es una proteína que está presente en la secreción láctea y juega un importante papel en la respuesta innata a la infección bacteriana. El objetivo de este trabajo es evaluar los niveles de LFB en leche de vacas de tambó como respuesta a la infección por distintos patógenos y su posible utilización como indicador diagnóstico de mastitis subclínica. Para esto se realizaron determinaciones microbiológicas de muestras de leche y se desarrolló un ensayo para cuantificar LFB por ELISA competitivo utilizando LFB acoplada a biotina como trazador y anticuerpos anti LFB en la fase sólida. Se observó heterogeneidad en los niveles de LFB de los cuartos sanos de animales de distintos establecimientos. La concentración de LFB en cuartos infectados subclínicamente resultó superior a la de cuartos sanos ($p < 0.05$) observándose mayores niveles de esta proteína en aquellos donde se aisló *Streptococcus uberis* comparado con los positivos para *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* y otras especies de *Staphylococcus* ($p < 0.05$). Patrones similares se verificaron también para casos de mastitis clínica. En función de estos datos se evaluó la susceptibilidad in vitro de aislamientos de *S. aureus* y *S. uberis* a LFB demostrándose que esta proteína es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* pero no tiene efectos sobre el desarrollo de *S. uberis*. Se observó además una correlación significativa entre los niveles de LFB y el recuento de células somáticas. Estos resultados sugieren que, en términos de secreción de LFB, el tejido mamario es capaz de reaccionar en forma diferente en respuesta a patógenos distintos, aun en infecciones subclínicas. La correlación positiva entre LFB y recuento de células somáticas muestra el posible valor diagnóstico de esta proteína para la detección de infecciones de la glándula mamaria.

173. (557) EXISTENCIA DE BARRERAS BIOLÓGICAS QUE DETERMINAN EL TROPISMO DE DOS CEPAS DEL VIRUS POLIOMA MURINO QUE DIFIEREN EN UN SOLO AMINOÁCIDO DE LA CÁPSIDE. APRILE ANA, LUCILLI SILVINA, SANJUAN NORBERTO

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, UBA

Luego de su inoculación en el ratón, algunas cepas del virus polioma tienen una amplia diseminación en diferentes tejidos, mientras que otras no lo hacen. Se ha postulado para ello la existencia de receptores específicos, entre otras explicaciones. No obstante, los receptores descritos son muy similares entre sí como para justificar esta distribución del virus. El propósito de este trabajo fue investigar la existencia de barreras biológicas que discriminen el pasaje de virus de distintas cepas. Se inocularon ratones neonatos con las cepas PTA o RA, que sólo difieren en un aminoácido de la proteína mayor de la cápside del virus (VP-1). Las vías de inoculación fueron intranasal (in) o intraperitoneal (ip), y a los 15 días post-infección (pi) se practicaron necropsias completas de los ratones. La presencia del virus fue detectada por inmunomarcación de VP-1 en cortes de tejidos. En otro experimento se realizaron cultivos organotípicos de parótida, que es un órgano al que PTA infecta pero RA no, y se detectó la presencia del virus por inmunoperoxidasa y por western blot a los 7 y a los 15 días pi. Se observó que en los ratones inoculados con PTA por vía in ó ip el virus podía migrar indistintamente desde el pulmón a la periferia o a la inversa, mientras que RA replicaba sólo

en el sitio de inoculación. En cambio, en los cultivos organotípicos de parótidas ambas cepas pudieron replicar indistintamente. Se concluye que existen barreras tanto a nivel pulmonar como periférico que pueden discriminar el pasaje de estas dos cepas de virus, y, por su distribución, probablemente radiquen en las láminas basales de los capilares sanguíneos.

174. (448) EVIDENCIA DE GENOTIPOS ADICIONALES DE HCV EN INDIVIDUOS HEMOFÍLICOS CON INFECCIONES MIXTAS INAPARENTES. BARÉ PATRICIA (1), PARODI CECILIA (1), ALOISI NATALIA (1), CULASSO ANDRÉS (1) (2), GARCÍA GABRIEL (2), BELMONTE LILIANA (1), CORTI MARCELO (3), DE TEZANOS PINTO MIGUEL (1, 3), PÉREZ BIANCO RAÚL (1, 3), CAMPOS RODOLFO (2), BRACCO MARÍA MARTA (1), RUIBAL ARES BEATRIZ (1)

Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina (1) Virología. Facultad de Farmacia y Bioquímica (2) Fundación de la Hemofilia (3)

La ausencia de inmunidad protectora tras la exposición inicial al virus de hepatitis C (HCV) posibilita las reinfecciones con otras cepas y la presencia de infecciones con múltiples genotipos. En el plasma de 289 hemofílicos se observaron infecciones mixtas en el 5.5% al 10% de los casos. Debido a la posibilidad de que las células mononucleares periféricas (CMP) puedan albergar variantes virales distintas a las observadas en plasma, se investigaron los genotipos emergentes durante el cultivo de CMP en un subgrupo de 18 pacientes. Se compararon los genotipos de HCV presentes en plasma con aquellos que surgieron luego del cultivo de CMP. Los genotipos se estudiaron mediante cortes con enzimas de restricción. En 13 individuos el genotipo plasmático coincidió con el genotipo hallado en cultivo pero en 5 casos se detectaron genotipos distintos. En 4/5 se observaron los genotipos del plasma junto con nuevos genotipos surgidos en el cultivo. En el restante (C: subtipo 1a plasmático) sólo el subtipo 1b se detectó en cultivo. El plasma de estos 5 pacientes fue genotipificado a distintos tiempos y a lo largo de varios años no se manifestaron aquellos genotipos surgidos en cultivo. El suero de 3 de estos pacientes fue utilizado para realizar infecciones experimentales en líneas celulares linfoblastoideas B. Se observaron resultados similares y los mismos genotipos adicionales surgieron en el cultivo en 2/3 experimentos. En el caso C, solo el genotipo 1a pudo detectarse en el cultivo infectado indicando el confinamiento del 1b en CMP. El 28% de los pacientes estudiados presentó infecciones mixtas por HCV que resultó significativamente mayor ($p=0.03$) a la frecuencia observada por genotipificación del plasma sin realizar el cultivo. La detección de infecciones mixtas ocultas puede ser importante en el momento de elegir un régimen terapéutico ya que la presencia de cepas minoritarias puede influir en la respuesta al mismo.

175. (534) RESERVORIO INTESTINAL DE HIV EN PACIENTES BAJO TERAPIA ANTIRRETROVIRAL DE ALTA EFICACIA (ART). BELMONTE LILIANA, OLMOS MARTIN, FANIN ANA, PARODI CECILIA, CAHN PEDRO, DE ELIZALDE DE BRACCO MARIA MARTA

Academia Nacional de Medicina; Hospital Juan A Fernández

La mucosa intestinal actúa como reservorio viral y principal sitio de interacción durante la infección primaria por HIV. El uso de ART inhibe la replicación viral y logra reducir la carga viral plasmática (CV) a niveles no detectables (ND), pero no es capaz de erradicar los reservorios celulares de larga vida. La CV no provee información acerca de los reservorios virales o la actividad viral residual en los pacientes que responden bien al ART. Hay pocos reportes acerca de los efectos del ART sobre la mucosa intestinal. Objetivo: Determinar la presencia de HIV-RNA intestinal en pacientes con ART exitoso y sin ART, y su relación con la CV. Métodos: Se seleccionaron biopsias endoscópicas de duodeno distal de 43 pacientes HIV+. La vía de contagio: heterosexual (n=19), homosexual (n=19), adicción endovenosa (n=7) y

parenteral (n=1). El nº de linfocitos T CD4 fue 265±222 cél./ml (M±DS). Las muestras se agruparon de la siguiente manera: Grupo 1: pacientes bajo ART, 18 con CV ND US (< 50 copias/ml), 6 con CV alta (> 100.000 copias/ml). Grupo 2: pacientes sin ART (n=19), todos con CV alta (> 100.000 copias/ml). Se determinó la presencia de RNA-HIV en las biopsias de tejido duodenal, por hibridación in situ. Como control negativo de la técnica se estudiaron paralelamente, 10 biopsias duodenales de pacientes HIV negativos. Resultados: De las 43 biopsias duodenales estudiadas, en 20 se detectó HIV-RNA Grupo 1: n=10 (41.6%), grupo 2: n=10 (52.6%), p=0.29, ns. De los pacientes con HIV-RNA detectable en mucosa intestinal, 8 tenían CV ND US y 12 tenían CV > 100.000 copias/ml (p=0.97). Conclusiones: Detectamos la presencia de HIV-RNA en la mucosa duodenal de pacientes sin tratamiento con elevada CV, pero también en pacientes bajo ART con CV ND US. Por lo tanto, la mucosa duodenal actúa como reservorio pobremente influenciado por los niveles de CV o ART. Conocer el status de la infección residual por HIV en estos tejidos, podría ayudar al desarrollo de tratamientos más efectivos.

176. (683) DETECCIÓN DE GENOVARIANTE DEL GEN OMPA DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS EN CEPAS AISLADAS DE CONJUNTIVITIS NEONATAL. RODRIGUEZ FERMEPIN MARCELO, GALLO VAULET MARÍA LUCÍA, ENTROCASSI ANDREA CAROLINA

Unidad de Estudios de Chlamydias y Otras Infecciones del Tracto Genital, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA

Chlamydia trachomatis (CT) es la causa de Infección de Transmisión Sexual bacteriana más prevalente en el mundo, los hijos de madres portadoras pueden desarrollar conjuntivitis neonatal (CN) y neumonía. CT ha sido clasificada en serotipos, que correlacionan con el sitio de infección y la patología desarrollada. Esta clasificación coincide con la de genotipos, basada en la variabilidad del gen ompA. En un protocolo anual de estudio de CN realizado en conjunto con el Htal Posadas, se detectó infección por CT en el 10.4% de los niños nacidos por parto natural, lo que confirma una elevada prevalencia de CT en esta patología. La genotipificación de las muestras positivas mediante RFLP coincidió con datos previos de nuestro equipo en cuanto a la mayor frecuencia del genotipo E (7/12, 58.3%). En este protocolo se hallaron además 3 cepas del genotipo G (25.0%) y 2 del K (16.7%). El objetivo de este trabajo fue confirmar los genotipos obtenidos con RFLP, mediante secuenciación del gen ompA y determinar la presencia y distribución de genovariantes circulantes en el área en estudio. Se secuenció el 85% del gen ompA (conteniendo sus 4 regiones variables), utilizando cebadores específicos. Todas las muestras fueron estudiadas dos veces a partir de la muestra original. Las secuencias fueron analizadas mediante el uso del software ChromasPro 1.32 y ClustalX 1.81. Se confirmaron los resultados obtenidos mediante RFLP. Se detectaron dos genovariantes: una del genotipo E y otra del genotipo G. Los cambios observados fueron: E: S> 332> N y G: G> 163> S. Se observó una buena correlación entre las técnicas de RFLP y la secuenciación del gen ompA para la determinación de los genotipos de CT. Se detectó una genovariante del genotipo E sobre 7 analizadas (14.3%) y una del genotipo G sobre 3 estudiadas, no descritas previamente. Estos resultados coinciden con los datos internacionales en cuanto a la estabilidad del genotipo E y la mayor variabilidad de G.

177. (708) BORDETELLA PERTUSSIS ES CAPAZ DE SOBREVIVIR A LA INTERACCIÓN CON NEUTRÓFILOS HUMANOS ASOCIÁNDOSE AL COLESTEROL DE MEMBRANA LAMBERTI YANINA ANDREA, PÉREZ VIDAKOVICS MARÍA LAURA, RODRIGUEZ MARÍA EUGENIA

CINDEFI-Fac.de Cs. Exactas-UNLP

Bordetella pertussis (Bp) es el agente causal de tos convulsa, una enfermedad que no ha podido ser erradicada. Estudios previos sugieren que, a diferencia de lo que ocurre en presencia de anticuerpos específicos, en huéspedes no inmunes este patógeno

no podría evadir la actividad celular bactericida. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la interacción bacteria-célula fagocítica en condiciones no opsonizantes. Se emplearon sondas fluorescentes y bacterias marcadas con GFP para evaluar la adhesión y fagocitosis bacterianas por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. La sobrevida intracelular se determinó por ensayos de protección a polimixina B, y el tráfico a lisosomas se evaluó por microscopía confocal. La comparación de medias se llevó a cabo mediante ANOVA o t-Student (p< 0.05), según el caso. La extracción de colesterol de neutrófilos humanos (PMN) mediante metil-β-ciclodextrina (cd-PMN) determinó una disminución media del 70±5 % en la adhesión y del 30±3% en la fagocitosis de Bp, respecto al control sin tratar. Sin embargo no afectó el nivel de adhesión o fagocitosis de bacterias opsonizadas, indicando no solo distinta vía de interacción en presencia de anticuerpos, sino también que el tratamiento no afecta la funcionalidad de los PMN. Bp no opsonizada, fagocitada por PMN, presentó una viabilidad intracelular 10 veces mayor que Bp opsonizada. Sin embargo esta sobrevida se vio significativamente disminuida (70±10%) en los casos de fagocitosis por cd-PMN. Paralelamente, ensayos de colocalización bacteriana con LAMP-1 demostraron que en ausencia de anticuerpos Bp inhibe su tráfico a lisosomas, a diferencia de lo observado en bacterias opsonizadas o en bacterias no opsonizadas fagocitadas por cd-PMN. Estos resultados indican que en condiciones no inmunes Bp es capaz de sobrevivir a la interacción con PMN y que dominios ricos en colesterol estarían implicados en esta sobrevida.

INMUNOLOGÍA III

178. (329) MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS EXPUESTAS A VALORES ACÍDICOS DE pH EXTRACELULAR. MARTÍNEZ DIEGO ALEJANDRO, VERMEULEN MONICA, NAHMOD KAREN, SALAMONE GABRIELA, GEFFNER JORGE

IIHEMA. Academia Nacional de Medicina

Previamente demostramos que la exposición de células dendríticas humanas (CD) a valores acídicos de pH extracelular (pH 6.5), resulta en la activación de PI3K y las MAPKs ERK 1/2 y p38. Aquí demostramos que la exposición de CD a pH 6.5 resulta en la maduración de las mismas. Las CD fueron obtenidas a partir de monocitos cultivados por 5 días con GM-CSF e IL-4. Las CD fueron incubadas por 5-180 min a pH 6.5 y luego por 48h a pH neutro. Se analizó la expresión por citometría de flujo de: HLA-DR, CD83, CD86, CD80, CD40 y CCR7. Observamos que las CD expuestas por 5 min a pH 6.5 no sufrieron modificaciones en su fenotipo, mientras que aquellas expuestas por 90 y 180 min a pH 6.5 sufrieron un incremento significativo (p< 0.05 respecto de las CD cultivadas a pH neutro) en todos los marcadores analizados. Consistente con la maduración fenotípica observada en CD expuestas por 90 min a pH 6.5, encontramos que las mismas mediaron una reacción de cultivo mixto linfocitario (CML), al enfrentarse con linfocitos alogeneicos, significativamente mayor (p< 0.05) respecto de las CD controles. Por último se determinó la participación de PI3K y las MAPKs ERK1/2 y p38 en la maduración de las CD inducida por pH 6.5. Empleando los inhibidores específicos de cada vía; Wortmanina, PD98059 y SB202190, respectivamente, encontramos que sólo el SB202190 (50 µM) previno la maduración fenotípica de las CD expuestas a pH 6.5 por 90 min: % supresión > 85% para todos los marcadores analizados, p< 0.05 vs controles en todos los casos, n= 6. Esto indica que la activación de la MAPK p38 es crucial en la inducción de la maduración de las CD por valores acídicos de pH extracelular. Nuestros resultados sugieren que la acidosis intersticial es percibida por las CD como una señal de alarma o estrés.

179. (459) EXPRESION DEL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS EN CELULAS DENDRITICAS MURINAS: EFECTO DE T3 SOBRE LA MADURACION Y FUNCION DE CD. MASCANFRONI IVAN DARÍO (1), SUSPERREGUY

SEBASTIÁN (1), MONTESINOS MARÍA DEL MAR (1), CERVI LAURA (1), MASINI DE REPISO ANA MARÍA (1), RABINOVICH GABRIEL ALEJANDRO (2), PELLIZAS CLAUDIA GABRIELA (1)

CIBICI-CONICET (1); Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas José de San Martín. Fac. Med. Universidad de Buenos Aires (2)

La regulación homeostática de la respuesta inmune implica la participación de factores hormonales. Sin embargo existe escasa información sobre el impacto de hormonas tiroideas (HT) en la inmunidad. Las HT ejercen la mayoría de sus efectos a través de su receptor nuclear (TR). Hasta el momento el rol de las HT sobre la funcionalidad de las CD, principales células presentadoras de antígeno, es desconocido. El objetivo del presente estudio fue investigar la presencia de TR en CD y examinar posibles efectos de las HT sobre la maduración y fisiología de estas células, y vías de señalización involucradas. CD se obtuvieron de células de médula ósea de ratón cultivadas en presencia de GM-CSF y posteriormente expuestas a la acción de LPS y triiodotironina (T3). La expresión de TR fue evaluada por Western Blot (WB) y RT-PCR. El fenotipo de las DC se determinó por citometría de flujo y la activación fue evaluada mediante la expresión de CD40 y la producción de óxido nítrico. Se estudió la capacidad de CD expuestas a la acción de TH de estimular una respuesta alógena in vitro. Los resultados indicaron que TR se expresa en CD a nivel de proteína y mRNA, principalmente en citoplasma. En ensayos funcionales se observó un incremento de marcadores de maduración en CD tratadas con T3 (Δ MFI, media \pm SD; MHC-II:6 \pm 2; CD80:12 \pm 7; CD86:12 \pm 5), sin embargo no se modificó la expresión de CD40 ni la producción de óxido nítrico. La capacidad de estimular una respuesta alógena T se vio incrementada en comparación con células cultivadas en ausencia de T3 (índice de proliferación: 12) luego del tratamiento con T3 ($p < 0.01$). Además una mayor expresión de factor nuclear kappa B (NF κ B) fue observada a nivel nuclear en estas células por ensayos de WB. Estos resultados sugieren la capacidad de HT de regular la maduración e inmunogenicidad de las CD, en la que podría estar implicada la vía del NF κ B. Estudios posteriores aportarán nuevas evidencias sobre el efecto de las TH en la funcionalidad de CD.

180. (479) ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE PRESENTACIÓN EXÓGENA DE ANTÍGENOS POR HISTAMINA. AMARAL MARIA MARTA (1), DAVIO CARLOS (2), MARTÍNEZ DIEGO (1), GEFFNER JORGE (1), VERMEULEN MÓNICA (1)

Lab. Inmunología, Academia Nac. Medicina (1); Lab. de Radioisótopos. Facultad de Farmacia y Bioquímica de Bs. As. (2)

La histamina (HIS) es liberada por los mastocitos durante la génesis de los procesos inflamatorios e infecciosos y en la vecindad de las células dendríticas (CD). Previamente, demostramos que la HIS favorece la captación de diferentes antígenos como la OVA y la peroxidasa de rábano. El objetivo del presente estudio fué evaluar la acción de la HIS sobre la presentación cruzada de antígenos llevada a cabo por las CD inmaduras. Las CD se obtuvieron de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 cultivados con GM-CSF. Las CD se incubaron con medio (Ct) o HIS (1 μ M) durante 30 min. a 37 °C. Posteriormente, luego de ser pulsadas con diferentes concentraciones (cc) de OVA, se incubaron con la línea de células TCD8+ específicas para un epítipo de la OVA (B3Z). La presentación se evaluó por ensayo colorimétrico. Encontramos que La HIS incrementó la presentación cruzada de antígenos exógenos, en todas las cc de OVA evaluadas, siendo mayor el incremento cuando las CD fueron pulsadas con 20 μ M (media \pm ES, Ct: 0.53 \pm 0.05; HIS: 1.100 \pm 0.09, * $p < 0,05$ n=4). Este efecto, fué mediado a través de la unión de la HIS a los receptores H1 y H3/4, ya que el bloqueo de los mismos con sus respectivos antagonistas disminuyó entre un 50-70% la presentación. Por último, cuando analizamos la inducción de una respuesta citotóxica (CTL) por las CD, encontramos que los esplenocitos de ratones inmunizados con CD pulsadas con Ova y esti-

muladas con HIS presentaron una mayor CTL que los respectivos Ct no tratados con HIS (media del % de lisis \pm ES, Ct: 24 \pm 2.50; HIS: 35.0 \pm 3, * $p < 0,05$ n=4). Nuestros resultados sugieren que la HIS, actuando sobre las CD inmaduras, promueve la presentación cruzada estimulando la activación de los linfocitos T citotóxicos.

181. (527) LOS MONOCITOS TRATADOS CON SLPI LIBERAN FACTORES QUE INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS. GUERRIERI DIEGO, REITERI MACARENA, COSTA MARÍA JULIETA, MAFFIA PAULO, CHULUYAN EDUARDO

Laboratorio Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA

En trabajos previos en nuestro laboratorio demostramos que el SLPI disminuye la proliferación de linfocitos alógenos en un cultivo mixto linfocitario. El objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo de acción del SLPI. Para lo cual en primer lugar estudiamos la población celular sobre la cual el SLPI ejerce su efecto. Para ello se obtuvieron células mononucleares y linfocitos de sangre periférica humana. Cada una de estas poblaciones celulares fueron tratadas con IL-2 (8 ng/ml) y concentraciones variables de rhSLPI (4-4000 ng/ml). En el quinto día se determinó la proliferación por incorporación de timidina tritiada, mostrando que el SLPI disminuía la proliferación celular en las células mononucleares (50 \pm 10%) pero no en los linfocitos. Para establecer si el efecto estaba mediado por factores liberados por los monocitos, se aislaron monocitos los cuales fueron tratados con SLPI (4 ug/ml). Luego de 24 horas se lavaron y las células fueron incubadas por otras 24 horas en ausencia de SLPI. Posteriormente se evaluó la capacidad de este medio derivado de monocitos (MDM) de inhibir la proliferación de linfocitos inducida por IL-2 (8 ng/ml). El tratamiento de los linfocitos con MDM durante 3 días inhibió la proliferación inducida por IL-2 en una magnitud similar (47 \pm 8) a la inhibición observada en las células mononucleares. En conjunto estos resultados indican que la inhibición de la proliferación linfocitaria inducida por SLPI en el CML se debe a factores liberados por los monocitos.

182. (584) EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATORIAS CD80 Y CD86 Y DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE II (CMH II) EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD) DEL TESTÍCULO NORMAL Y DURANTE UN ESTADO INFLAMATORIO. CLAUDIA RIVAL (1),(2) MONIKA FIJAK,(3) VANESA ANABELLA GUAZZONE, (4) EVA SCHNEIDER,(5) ANDREAS MEINHARDT, (6) LIVIA LUSTIG

(1) Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA, (2) Universidad Justus-Liebig, Giessen, Alemania, (3) Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA, (4) Universidad Justus-Liebig, Giessen, Alemania, (5) Universidad Justus-Liebig, Giessen, Alemania, (6) Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA

Las CD son las células presentadoras de antígeno por excelencia. Previamente identificamos CD en el intersticio del testículo normal de la rata y demostramos un incremento en el número de estas células durante el desarrollo de la orquitis autoinmune experimental (OAE). La OAE se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfomonocitario intersticial y lesión de los túbulos seminíferos con apoptosis de las células germinales. Nuestro objetivo fue estudiar, por citometría de flujo, la expresión de las moléculas del CMH II, CD80 y CD86 en las CD del testículo normal y durante el desarrollo de dicho cuadro inflamatorio. Ratas del grupo experimental (E) fueron inmunizadas con homogenado testicular y adyuvantes, mientras que ratas del grupo control (C) se inyectaron sólo con adyuvantes. También se estudiaron ratas normales (N) no tratadas. No se encontraron diferencias en el porcentaje de CD testiculares que expresaron las moléculas CMH

II, CD80 y CD86 entre las ratas N, C y E (CMH II: N: 98.9±0.5; C: 94.0±3.0, E: 97.2±1.6; CD80: N: 97.8±0.9, C: 97.7±1.2, E: 99.5±0.4; CD86: N: 92.2±2.5, C: 91.9±3.2, E: 97.2±1.6). La intensidad de fluorescencia media (IFM) de estas moléculas en las CD testiculares fueron similares entre los grupos de ratas (índice IFM: CMH II: N: 27.4±9.9, C: 24.9±10.5, E: 30.4±11.4; CD80: N: 31.0±8.7, C: 30.1±3.1, E: 31.8±5.2; CD86: N: 17.8±5.8, C: 17.9±4.6, E: 19.9±5.4). Las CD testiculares presentaron una menor expresión de estas moléculas en relación a la detectada previamente en macrófagos testiculares obtenidos de ratas de los mismos grupos y a CD de ganglios linfáticos. Estos resultados mas el incremento en el número de CD en el testículo de ratas con OAE observado previamente, sugieren que estas células están involucradas en el desarrollo de este cuadro inflamatorio y presentan un fenotipo inmaduro.

183. (634) EL ARNSH AUMENTA EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS. CRESPO MARÍA INÉS, PISTORESÍ MARÍA CRISTINA, MORÓN GABRIEL

CIBICI-Universidad Nacional de Córdoba

Recientemente se ha encontrado que el ARN, en una disposición de simple hebra (ARNsh), interactúa con las células dendríticas (DCs) murinas a través de TLR7, activándolas. Se ignora si tal interacción estimula el procesamiento y presentación de antígenos y en particular, la presentación cruzada de antígenos y la generación de CTLs. En este trabajo se analizó si el ARNsh puede estimular la presentación cruzada de antígenos exógenos. Se utilizó Poly U como modelo de ARNsh y se usaron DCs derivadas de médula ósea (BMDCs) generadas en presencia de Flt3-L. Como antígeno exógeno se usó la proteína ovoalbúmina (OVA) en su forma soluble y en complejos inmunes de OVA (IC-OVA). Se midió por citometría de flujo la variación en la expresión de CD40, CD86 y MHC II por las BMDCs. Luego de incubar 12 horas con Poly U a 10 ug/ml, las células tratadas mostraron un aumento en la expresión de las moléculas estudiadas con respecto al nivel basal (Δ MF1, media±SD, MHCII 6±2, CD40 20±7 y CD86 12±7). Por ELISA, se observó que las BMDCs estimuladas con Poly U secretaron IL-12 (más de 1250 pg/ml). Para ver el efecto del Poly U sobre la presentación cruzada de antígenos, se realizó un estudio de presentación in vitro utilizando el híbrido de células T CD8+ B3Z, específico para OVA257-264. Poly U produjo un aumento en la presentación de OVA (hasta un máximo de 7,7 veces) y de IC-OVA (hasta un máximo de 2,6 veces) con respecto a las BMDCs sin estímulo. Para estudiar si este aumento estaba relacionado con un aumento en la captura y endocitosis de antígenos por las BMDCs, se evaluó la captura de OVA marcada con FITC por citometría de flujo. No se observó un aumento en la captura por la estimulación de las BMDCs con Poly U. Estos resultados preliminares muestran que el ARNsh activa y aumenta los niveles de presentación antigénica mediada por MHC I y en consecuencia muestran un potencial efecto adyuvante sobre la generación de respuesta citotóxica.

184. (639) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL FCGAMARI INDUCIDA POR IFN-GAMA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS. LABORDE EVANGELINA, ISTURIZ MARTIN, VULCANO MARISA

Lab. de Inmunología. IHEMA. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

El IFN- γ es una citoquina que ejerce efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmune. Una de sus funciones inmunoregulatorias es la de inducir la expresión del Fc γ RI. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la modulación de la expresión del Fc γ RI inducida por IFN- γ en células dendríticas humanas (DC). Las DC, obtenidas a partir de la diferenciación de monocitos, cultivados durante 6 días en presencia de IL-4 y GM-CSF, presentan bajos niveles de Fc γ RI (0.3±0.1), altos niveles de Fc γ RII (86.6±10.6) y valores variables, dependiendo del dador, de Fc γ RIII (56.5±24.5), (media±SD porcentaje de DC positivas; n=6). La maduración de

las DC con LPS no produce cambios significativos en el perfil de expresión de los Fc γ Rs. El tratamiento de las DC con IFN- γ durante 18h induce la expresión del Fc γ RI (70.2±11.0; p< 0.001; n=12) y no modifica la expresión basal de los Fc γ RII y Fc γ RIII. Cuando las DC se preincubaron con IFN- γ durante 2h y luego se estimularon con LPS por 18h, se observó una inhibición significativa en la capacidad del IFN- γ de inducir la expresión del Fc γ RI. (% inhibición: 81.2±9.4; n=12). Resultados similares se obtuvieron usando *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) o CD40L, en lugar de LPS, mientras que otros estímulos, como TNF- α e IL-1 β no tuvieron efecto. El efecto de LPS es específico sobre la expresión de Fc γ RI ya que la inducción de la expresión de otros marcadores inducida por IFN, como por ejemplo, la de MHCII no se ve alterada. Por otro lado, la inducción de la expresión del Fc γ RI se ve incrementada cuando las DC se tratan simultáneamente con IFN+Dexametasona (DEX). Se observó que en DC tratadas con IFN+DEX el efecto inhibitorio del LPS sobre la expresión del Fc γ RI fue revertido significativamente (26.3±3.5; p< 0.001; n=10). Estos resultados sugieren la existencia de distintos mecanismos de regulación de la expresión del Fc γ RI, durante los procesos inflamatorios capaces de modular la actividad fagocítica de las DC.

185. (644) GALECTINA-1 (GAL-1) PROMUEVE LA GENERACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD) CON CAPACIDAD TOLEROGÉNICA IN VIVO. ILARREGUI JUAN MARTÍN (1), VERMEULEN MÓNICA (2), TOSCANO MARTA ALICIA (1), BIANCO GERMAN ARIEL (1), CROCI DIEGO OMAR (1), GEFFNER JORGE (2), RABINOVICH GABRIEL ADRIÁN

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, UBA (1) IHEMA, Academia Nacional de Medicina (2)

Recientemente demostramos que Gal-1 modula la diferenciación de CD humanas y de ratón. El objetivo del presente trabajo fue explorar los efectos de Gal-1 en CD en modelos in vitro e in vivo así como estudiar el efecto de la ausencia de esta proteína en la fisiología de CD. A tal fin, se obtuvieron CD humanas a partir de monocitos de sangre periférica y CD de ratón a partir de precursores de médula ósea. En todos los casos las células se cultivaron en ausencia o presencia de 40 ug/ml de Gal-1 (CDgal). CD humanas maduradas en presencia de Gal-1 fueron capaces de inhibir cultivos alogénicos T estimulados con CD competentes en forma dosis dependiente, efecto que fue acompañado por inhibición en la producción de IFN- γ y aumento en IL-10 (p< 0.01). Por otro lado, CD de ratón diferenciadas en presencia de Gal-1 mostraron una disminución en el marcador CD11c (p< 0.01) y aumento del marcador CD45RB, característico de CD regulatorias (p< 0.05). En este sentido, Gal-1 indujo una disminución en la producción de IL-12 (p< 0.05) y aumento de IL-10 (p< 0.05) en CD de ratón, así como inhibición de la capacidad aloestimuladora, efecto que se refleja también con aumento de IL-10 y disminución de IFN- γ (p< 0.05). El fenotipo regulatorio fue confirmado por la incapacidad de CDgal de generar una respuesta Ag-específica in vivo. El rol fisiopatológico de este efecto fue evaluado por la menor capacidad de CDgal de proteger a ratones singénicos frente al desafío con células de melanoma B16 (p< 0.05 vs CD control). Finalmente, se observaron mayores niveles de MHC-II y mayor capacidad aloestimuladora en CD provenientes de ratones gal-1/- (p< 0.05 vs. wt). Concluimos que Gal-1 instruye CD hacia un fenotipo regulatorio con posibles implicancias en autoinmunidad y escape tumoral, efecto que se verifica en CD provenientes de ratones gal-1/- que poseen mayor capacidad aloestimuladora.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN II

186. (99) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTOR DE VLDL Y DE LA PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS LINFOCITARIAS POR DROGAS HIPOLIPEMIANTE (ATORVASTATINA Y GEMFIBROZIL). SAMPEDRO MA-

RIA CECILIA, FORCATO DIEGO, MARY VERONICA, KIVATINITZ SILVIA

CIQUIBIC-Dpto de Química Biológica-UNC

Nuestros estudios previos con cultivos primarios de linfocitos de ratón han contribuido a entender como las lipoproteínas regulan la expresión de distintos receptores de membrana del linfocito involucrados en la activación y proliferación de los mismos. Nuestros resultados mostraron que VLDL, una lipoproteína aterogénica, aumenta la producción de citocinas inflamatorias en linfocitos de ratón y que algunos linfocitos expresan receptor de VLDL, sugiriendo que estos efectos de VLDL serían mediados por interacción de VLDL con VLDLR. Hemos estudiado la expresión de VLDLR con VLDL marcada fluorescentemente con Alexa 488 y empleado citometría de flujo para cuantificar la unión de VLDL a VLDLR. Con estas mismas técnicas hemos cuantificado los marcadores linfocitarios CD25 (IL-2R) y CD4 simultáneamente con los parámetros de morfología (tamaño y complejidad). Las pruebas se realizaron siguiendo un diseño experimental de arreglo factorial completo de 4x3 cultivando las células en condiciones: control, Atorvastatina y Gemfibrozil, y estas mismas condiciones en la presencia simultánea de VLDL y Con A. Se observó que atorvastatina aumentó el porcentaje de células que expresan VLDLR en aquellos cultivos no estimulados con el mitógeno inespecífico (ConA) estuviese o no presente VLDL en el medio. Gemfibrozil aumentó el porcentaje de células VLDLR+ en las 4 condiciones. Ambas drogas disminuyeron el porcentaje de células CD4+/CD25+ en los cultivos estimulados. Además atorvastatina inhibió la respuesta blastogénica. Estos resultados muestran que drogas hipolipemiantes que tienen distintos mecanismos de acción son capaces de regular la expresión de VLDLR y de células CD4+/CD25+ en un modelo de inflamación in vitro.

- 187. (175) SCORE DE SÍNDROME METABOLICO Y LIPOPROTEÍNAS MODIFICADAS.** MIKSZTOWICZ VERÓNICA (1), SCHREIER LAURA (1), ROYER MONIQUE (2), PRADA MARIELA (2), MUZZIO MARÍA LUZ (1), LÓPEZ GRACIELA (1), WIKINSKI REGINA (1), BERG GABRIELA (1)

Lab. Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires(1) Sección Climatología, División Ginecología, Hospital de Clínicas "José de San Martín"- UBA (2)

La presencia de lipoproteínas modificadas con mayor poder aterogénico como LDL pequeña y densa y VLDL atípicas, es una característica del síndrome metabólico (SM). La mitad de los eventos cardiovasculares en mujeres se relacionan con SM. Nuestro objetivo fue evaluar la relación entre número de marcadores de SM (score SM) según ATP-III con las lipoproteínas modificadas y el grado de insulino-resistencia (IR). Se estudiaron 27 mujeres (27-61 años) divididas en dos grupos: con (n=15) y sin (n=12) SM, pareadas por edad y status menopáusico. Se midieron los marcadores del SM: circunferencia de cintura (CC), presión arterial (PA) colesterol(c)-HDL, TG y glucosa. Se determinaron las lipoproteínas modificadas midiendo la proporción de LDL pequeña y densa (LDLd) (d=1048-1063g/ml) y c-VLDL estimando el tipo de VLDL con el índice c-VLDL/TG. Se midió insulina y se evaluó IR con los índices TG/c-HDL y HOMA. Las mujeres con SM presentaron score 3 (n=10) y 4 (n=5) y las sin SM score 0 (n=3), 1 (n=4) y 2 (n=5). Las medias±DS en mujeres con SM vs sin, fueron: CC (98±8 vs 87±15 cm), TG (198±69 vs 114±63 mg/dl), glucemia (104±13 vs 94±13 mg/dl) p< 0.02, c-HDL (49±12 vs 60±15 mg/dl p< 0.04); 13 de 15 con SM presentaron PA elevada o tratada, en cambio 3/12 en mujeres sin SM, p< 0.01. El grupo con SM presentó mayor % LDLd (23±9.9 vs 15±6.1, p< 0.05) y menor c-VLDL/TG (0.15±0.03 vs 0.21±0.07, p< 0.02). El índice HOMA no mostró diferencias entre grupos (2.9±1.7 vs 2.6±0.9, p=0.6), sin embargo TG/c-HDL fue mayor en SM (4.3±2.1 vs 2.3±2.0 p< 0.04) y a su vez correlacionó con LDLd (r= 0.72) y con c-VLDL/TG (r=-0.70) p< 0.001. El score SM no correlacionó con HOMA (r=-0.04, p=0.8) pero sí con TG/c-HDL (r=0.76, p< 0.001), con LDLd y con c-VLDL/TG (r= 0.62 y r=-0.58 respectivamente,

p< 0.003). A medida que aumenta el score o número de marcadores de SM, se incrementaría el predominio de lipoproteínas modificadas -LDLd y VLDL rica en TG- y el grado de IR, evaluado por el índice TG/c-HDL pero no por HOMA.

- 188. (498) POLIMORFISMO C677T DE LA 5,10-METILEN TETRA HIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) RELACIÓN CON NIVELES PLASMÁTICOS DE HOMOCISTEÍNA EN UNA POBLACIÓN ABORIGEN.** ENSINCK ALEJANDRA, LIOI SUSANA, PITUELLI NORMA, CORBERA MIRTHA, TURCO MIRYAN, BELOSCAR JUAN, ROSILLO IRENE, D ARRIGO MABEL

Area Química Analítica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

La MTHFR cataliza la conversión irreversible de 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato, el cual actúa como un dador de grupos metilo en la remetilación de la homocisteína a metionina. La variante C677T está caracterizado por actividad de MTHFR reducida y elevada concentración de homocisteína plasmática total (tHcy) bajo deficientes niveles de folatos. La concentración de tHcy elevada está determinado por factores genéticos y fisiológicos, estilo de vida y consumo de folatos entre otros. La prevalencia del polimorfismo C677T está relacionada a la etnicidad. El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio explorativo para determinar la frecuencia genotípica (FG) de la mutación C677T en una muestra de una población de origen aborigen (PA) nacidos en el Chaco y emigrados a Rosario, compararla con una población caucásica argentina (PC) y analizar el efecto metabólico (concentración de tHcy y de folatos). Para estudiar la FG en ambas poblaciones (PA n: 55, 1-45 años, PC n: 69, 5-50 años), el tamaño muestral fue calculado estadísticamente para lograr una estimación representativa de la población total con una confianza del 95%. Las muestras fueron reclutadas en forma aleatoria de individuos que aceptaron participar previo consentimiento firmado del mismo paciente o familiar a cargo. Se trabajo con sangre periférica. Se realizó la genotipificación de MTHFR, por PCR-RFLP; tHcy y folato por inmunometodos. Para comparar ambas FG, se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal. Los resultados de FG (IC 95%) fueron PC: TT 0.1304(0.0509-0.2099), CT 0.4493 (0.3319-0.5667) y CC 0.4203(0.3038-0.5368); PA: TT 0.0545 (0.000-0.1145), CT 0.6545(0.5284-0.7805) y CC 0.2910 (0.1709-0.4110). Las FG (CT y CC) muestran diferencias significativas. La tHcy fue significativamente mayor (p< 0.05) en los pacientes con genotipo TT. El tamaño y esquema de muestreo, factores ambientales y la étnia, podrían contribuir a los resultados obtenidos.

- 189. (201) DISMINUCIÓN DE ADIPONECTINA EN HIPER TRIGLICERIDEMIA PRIMARIA.** BENÍTEZ MARÍA BELÉN, GÓMEZ ROSSO LEONARDO, ELIKIR GERARDO, CUNIBERTI LUIS, WIKINSKI REGINA, BRITES FERNANDO

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; UNIVERSIDAD FAVALORO

La adiponectina es la adipocitoquina más abundante, relacionada con inflamación, resistencia insulínica y alteraciones lipoproteicas. Posee propiedades antiaterogénicas como el estímulo en la producción de óxido nítrico y la inhibición en la expresión de receptores scavenger y moléculas de adhesión endoteliales. Nuestro objetivo fue evaluar los niveles plasmáticos de adiponectina y su asociación con diferentes parámetros antropométricos y lipoproteicos en pacientes con hipertrigliceridemia primaria (HTG) y controles normotriglicéridémicos (NTG). Se estudiaron 23 hombres HTG y 30 NTG (20-70 años). No se incluyeron sujetos con síndrome metabólico, diabetes, alteraciones tiroideas, nefropatías, hepatopatías o bajo tratamiento. Se midieron peso, altura, circunferencia de cintura, niveles de adiponectina (ELISA), glucosa, triglicéridos (TG), colesterol (C) total, C-HDL, C-no-HDL, C-LDL, apo A-I y apo B (métodos estandarizados). Se analizó composición química de HDL (ultracentrifugación) y actividad de

proteína transportadora de C esterificado (CETP; método radiométrico). Al comparar sujetos HTG con NTG, se observó disminución de los niveles de adiponectina (Media \pm DE: 4202 \pm 1731 vs 6939 \pm 3249 ng/ml; $p < 0,001$), la cual sólo correlacionó positivamente con C-HDL ($r=0,34$; $p < 0,05$) y negativamente con glucosa ($r=-0,33$; $p < 0,05$), TG ($r=-0,40$; $p < 0,01$), TG-HDL ($r=-0,32$; $p < 0,05$), y actividad de CETP ($r=-0,49$; $p < 0,0005$). En esta población de sujetos con HTG estrictamente primaria, la adiponectina no mostró relación con el índice de masa corporal o la cintura a pesar de ser sintetizada por el tejido adiposo. Sin embargo, se evidenció asociación con los niveles de lipoproteínas ricas en TG, de HDL y con actividad de CETP, encargada del intercambio de CE y TG entre ambas fracciones. La disminución de adiponectina en pacientes con HTG primaria constituiría una alteración del potencial antiaterogénico, que se suma a las modificaciones ya descritas de la capacidad protectora de HDL.

- 190. (531) EFECTO DE LA RESTRICCIÓN LIPÍDICA SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO Y LOS NIVELES DE LEPTINA E IGF1, EN RATAS EN CRECIMIENTO.** SUÁREZ CRISTINA (1), MACRI VANESA, GONZALES CHAVES (1) MACARENA, PELLEGRINI GRETEL (1), COMPAGNUCCI GABRIELA (2), RODRÍGUEZ PATRICIA (1), MANDALUNIS PATRICIA (3), ZENI SUSANA (1), FRIEDMAN SILVIA (1)

Cátedra de Bioquímica Gral y Bucal. FOUBA (1) Cátedra de Fisiología. FOUBA (2) Cátedra de Histología (3)

Es conocido que la IGF1 es un indicador de adecuación proteica y que participa activamente en el metabolismo óseo y mineral. Asimismo la leptina se considera como un indicador de ingesta energética. Objetivo: evaluar la interacción entre metabolismo óseo y consumo de dietas restrictivas en lípidos (E= 18%). Al destete, Wistar hembras (n=28) se dividieron en 2 grupos que recibieron hasta 35 días de edad una de dos dietas con relación carbohidratos: lípidos (CH/L) 1:1 vs. 3:1. Se evaluaron: leptina, IGF1, α -CTX, y fosfatasa alcalina ósea (FAO) en suero y densitometría de esqueleto total para evaluar contenido mineral corporal total (CMO, DEXA Lunar DPX) e histomorfometría estática de tibia. Los resultados (x \pm DS) de la dieta 1.1 vs. 3.1 fueron respectivamente: leptina (ng/ml) 1.1 \pm 0.6 vs. 0.5 \pm 0.2, $p < 0,05$; IGF1 (ng/ml) 329 \pm 45 vs. 276 \pm 36, $p < 0,05$; FAO (UI/L) 176 \pm 84 vs. 90 \pm 34, p ns.; CTX (ng/ml) 58.2 \pm 13.1 vs. 70.7 \pm 10.3, $p < 0,05$; CMO (mg) 495 \pm 77 vs. 297 \pm 97, $p < 0,05$; cartilago hipertrófico %: 48.1 \pm 4.2 vs. 58.0 \pm 3.5, $p < 0,01$ y volumen óseo %: 31.7 \pm 6.7 vs. 27.1 \pm 5.5, p ns. La disminución significativa en la leptina sérica y en el contenido mineral corporal, con un aumento significativo en los niveles de α -CTX y una tendencia franca a la disminución en los niveles de IGF1 y de FAO, se reflejan a nivel histológico en un aumento significativo en el % de cartilago hipertrófico y una disminución, aunque no significativa, en el volumen de hueso. Conclusión: la restricción de calorías aportadas por los lípidos interfiere en la adquisición de masa ósea. UBACyT O 003 y O004.

- 191. (202) AUMENTO DE LDL OXIDADA EN PACIENTES CON ACROMEGALIA ACTIVA** BOERO LAURA, CUNIBERTI LUIS, BENITEZ MARIA BELEN, YANNARELLI GUSTAVO, GOMEZ ROSSO LEONARDO, MANAVELA MARCOS, BRITES FERNANDO

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA Universidad Favaloro Servicio de Endocrinología, Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA

La acromegalia es una enfermedad crónica generada por hipersecreción de hormona de crecimiento, siendo la enfermedad cardiovascular la principal causa de morbi-mortalidad. Nuestro objetivo fue evaluar los niveles plasmáticos de LDL oxidada (LDLox) en pacientes con acromegalia activa en comparación con controles sanos y su relación con parámetros lipoproteicos y enzimas asociadas a lipoproteínas. Se estudiaron 15 pacientes con acromegalia activa y 15 controles apareados por sexo y edad. Se midieron los niveles plasmáticos de LDLox (método ELISA),

triglicéridos (TG), colesterol (C) total, C-HDL, C-no-HDL, C-LDL, apo A-I, y apo B (métodos estandarizados). Se determinaron las actividades de proteína transportadora de C esterificado (CETP; método radiométrico), arilesterasa (ARE; método cinético) y fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA2; método radiométrico). Los pacientes acromegálicos en comparación con controles presentaron aumento de los niveles de LDLox (Media \pm DE: 119 \pm 19 vs 86 \pm 20 U/l; $p < 0,0001$), TG (117 \pm 34 vs 84 \pm 26 mg/dl; $p < 0,01$), C-no-HDL (171 \pm 28 vs 140 \pm 31 mg/dl; $p < 0,01$), C-LDL (149 \pm 28 vs 122 \pm 26 mg/dl; $p < 0,01$), apo B (110 \pm 21 vs 81 \pm 13 mg/dl; $p < 0,0001$), y disminución de C-HDL (50 \pm 12 vs 60 \pm 16 mg/dl; $p < 0,05$). La actividad de CETP fue mayor en pacientes (227 \pm 17 vs 201 \pm 20 %/ml.h; $p < 0,001$), mientras que no hubo diferencias en ARE y Lp-PLA2. La LDLox correlacionó positivamente con TG ($r=0,62$; $p < 0,001$), C total ($r=0,55$; $p < 0,005$), C-no-HDL ($r=0,82$; $p < 0,0001$), C-LDL ($r=0,79$; $p < 0,0001$), apo B ($r=0,70$; $p < 0,0001$), CETP ($r=0,50$; $p < 0,01$) y Lp-PLA2 ($r=0,57$; $p < 0,005$). De este modo, la LDLox se asoció con parámetros lipoproteicos aterogénicos y con Lp-PLA2, la cual ha sido postulada como un biomarcador de aterosclerosis principalmente por su acción liberadora de ácidos grasos oxidados. En conclusión, la elevación de LDLox circulante en pacientes con acromegalia activa estaría reflejando la ocurrencia de procesos vasculares oxidativos de elevado potencial aterogénico.

- 192. (547) EFECTO DE LA RELACION N-6/N-3 PUFA DE DIETAS NORMOGRASAS SOBRE EL CRECIMIENTO OSEO DE LA RATA.** MACRI VANESA, COMPAGNUCCI GABRIELA, SUAREZ CRISTINA, MANDALUNIS PATRICIA, BOYER PATRICIA, FRIEDMAN SILVIA.

Cátedra de Bioquímica Gral y Bucal. FOUBA. Cátedra de Fisiología. FOUBA. Cátedra de Histología. FOUBA

Dada la estrecha relación entre colesterol, grasa saturada (GS) y ECV, se recomienda reducir la GS y aumentar los aceites vegetales; sin embargo, su exceso y la n-6/n-3 PUFA podrían afectar la estructura ósea. Objetivo: evaluar el efecto del consumo de dietas normograsas con diferentes n-6/n-3 PUFA sobre el crecimiento de hueso apendicular de la rata. Ratas Wistar macho al destete (n=24) fueron divididas en 4 grupos, c/u recibió una dieta ad libitum durante 4 semanas: soja, maíz, lino y vaca (S, M, L y V). Los % de grasa (según AIN-93) y de calcio fueron similares en todos los grupos; con n6/n3, S=8, M=44, L=4, V=GS. Se pesaron y midieron semanalmente y se calcularon: velocidad de ganancia de peso (VGP g/100g rata/periodo) y longitud (VGL cm/100 cm rata/periodo). A t=final se determinaron por DXA: densidad mineral ósea (DMO, mg/cm²) de tibia y fémur; contenido mineral óseo (CMO, mg) expresado en relación al Peso e histomorfometría ósea estática de la tibia. Resultados: media \pm DE (ANOVA-SNK): Tabla 1. VGP y VGL, NS ($p > 0,05$). Sólo histomorfométricamente, L mostró un aumento en hueso cortical ($p < 0,05$). Conclusión: El aumento de n-3 PUFA produjo cambios densitohistomorfométricos asociados al modelamiento óseo que mejorarían sus propiedades biomecánicas. El tipo de PUFA regularía el modelamiento del hueso apendicular, aún cuando la ingesta total de lípidos es equivalente al requerimiento. Subsidiado por UBACyT 004.

TABLA 1: letras distintas indican DS ($p < 0,05$)

GRUPO	S	M	L	V
CMO/P	7.87 \pm 0.63 a	6.08 \pm 0.40 b	8.42 \pm 0.69 a	5.71 \pm 0.43 c
DMO tibia	181.3 \pm 7.8 a	181.3 \pm 7.5 a	185.4 \pm 8.7 a	165.3 \pm 11.4 b
DMO fémur	188.8 \pm 5.7 a	186.6 \pm 4.7 a	200.7 \pm 4.6 b	181.7 \pm 7.1 a

- 193. (205) COLESTEROL-NO-HDL E INDICE HOMA: PREDICTORES INDEPENDIENTES DEL AUMENTO DE PROTEINA TRANSPORTADORA DE COLESTEROL ESTERIFICADO EN PACIENTES CON SINDROME METABOLICO.** CONIGLIO RAUL, GOMEZ ROSSO LEONARDO, FERRARIS ROBERTO, MONTIEL HUGO, MALASPINA

MARIA MARCELA, SALGUEIRO ANA MARIA, OTERO JUAN CARLOS, BENITEZ MARIA BELEN, WIKINSKI REGINA, SCHREIER LAURA, BRITES FERNANDO

Centro de Investigaciones Biomédicas. Laboratorios de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

La proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) es responsable del intercambio de colesterol (C) esterificado por triglicéridos (TG) entre HDL y lipoproteínas con apoB y de la remodelación lipoproteica. Aumentos en la actividad de CETP fueron identificados en pacientes con diabetes tipo 2 y en no diabéticos con enfermedad cardiovascular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad de CETP en sujetos con y sin síndrome metabólico (SM) y analizar su asociación con parámetros relacionados con SM. Se estudiaron 49 pacientes (14 hombres y 35 mujeres) con SM y 36 sujetos (12 hombres y 24 mujeres) sin SM (Criterio Federación Internacional de Diabetes) mayores de 45 años. Se midieron circunferencia de cintura, actividad sérica de CETP (método radiométrico), concentraciones séricas de glucosa, insulina, TG, C total, C-HDL, y C-LDL (métodos estandarizados). Se calcularon C-no-HDL e índice HOMA, indicador de resistencia insulínica. Al comparar sujetos con y sin SM, se observó aumento de la actividad de CETP (Media±DE; 261±22 vs 241±20 %/ml.h; $p < 0,001$), que correlacionó positivamente con cintura ($r=0,29$; $p < 0,01$), glucosa ($r=0,25$; $p < 0,05$), insulina ($r=0,31$; $p < 0,01$), TG ($r=0,59$; $p < 0,001$), C-no-HDL ($r=0,71$; $p < 0,001$) y HOMA ($r=0,34$; $p < 0,005$), y negativamente con C-HDL ($r=-0,33$; $p < 0,005$) (ajustado por sexo y edad). Mediante curva ROC, se estableció 250 %/ml.h como valor de corte de CETP con mayor valor predictivo y se efectuó un análisis de regresión logística incluyendo como variables: sexo, edad, cintura > 94 cm en hombres y > 80 en mujeres, TG > 150 mg/dl, C-no-HDL > 160 mg/dl, y HOMA $> 2,1$ (basado en estudios previos). Las variables predictoras fueron C-no-HDL (OR=11,14; $p < 0,0001$) y HOMA (OR=4,37; $p < 0,05$). Se concluye que los sujetos con SM que muestran aumento de C-no-HDL y HOMA, presentarían mayor riesgo de tener actividad de CETP aumentada, siendo éste un factor iniciador de la formación de LDL pequeñas y densas con mayor impacto en la aterogénesis.

194. (424) EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE VLDL Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HEP G2. FORCATO DIEGO OSCAR, MARY VERONICA SOFIA, SAMPEDRO MARÍA CECILIA

CIQUIBIC-Dpto de Química Biológica-UNC

En estudios previos hemos demostrado que drogas y lípidos hipolipemiantes afectan la secreción y acumulación de apolipoproteína A1 en cultivos de una línea celular de hepatocarcinoma humano Hep G2. Estas células conservan muchas de las características de los hepatocitos normales y es utilizada como un modelo in vitro para estudiar el metabolismo de las células hepáticas. Hemos estudiado la regulación del receptor de VLDL por drogas que actúan a nivel de los PPAR (Receptores activados por el proliferador de peroxisomas) mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Células Hep G2 cultivadas en medio de cultivo con y sin el agregado de gemfibrozil y atorvastatina fueron incubadas con VLDL marcada covalentemente con Alexa 488 en presencia o ausencia de anticuerpo anti-VLDL o proteína asociada al receptor (RAP). Los datos de citometría de flujo indicaron que la VLDL marcada se une principalmente a dos sitios de unión, uno específico ya que la unión puede ser desplazada por anticuerpo anti-VLDL, anticuerpo anti-LRP y por RAP, y otro sitio de unión inespecífico, el cual resultó ser heparan sulfato, ya que la unión es desplazada por heparina. Nuestros resultados obtenidos mediante inhibición de la unión de VLDL marcada por el anticuerpo anti VLDL y por unión directa del anticuerpo marcado fluorescentemente muestran que el receptor de VLDL se expresa en proporción minoritaria respecto de los otros sitios de unión de esta lipoproteína. Estos sitios no se encuentran distribuidos uniformemente, sino que una población de tamaño y com-

plejidad característica es la que expresa principalmente el receptor de VLDL. Gemfibrozil afectó la proporción relativa de células clasificadas tanto por los parámetros morfológicos como por la expresión del VLDLR. Nuestros resultados ayudarán a comprender algunas de los efectos de gemfibrozil relacionados con la demanda energética de la célula y con el aumento en la producción de apolipoproteína A-1.

195. (510) FUNCIONALIDAD DE HDL EN LA POSTMENOPAUSIA. ZAGO VALERIA (1), BERG GABRIELA (1), BASILIO FRANCISCO (2), WIKINSKI REGINA (1), SCHREIER LAURA (1)

Lab de Lípidos y Lipoproteínas, Depto de Bioquímica Clínica, FFyB, UBA (1) División de Endocrinología, Hospital Durand (2)

En estudios previos demostramos que la actividad de la enzima lipasa hepática (LH) está incrementada en mujeres postmenopáusicas (MPM), sin embargo la concentración de HDL no desciende. La acción LH sobre HDL constituye uno de los pasos del transporte reverso del colesterol. Nos proponemos evaluar la calidad de HDL de MPM como sustrato de LH. Se estudiaron 15 MPM (edad:51-63 años) y 7 controles premenopáusicas (PreM) (edad:19-52 años). Se determinó el perfil lipídico, se aisló HDL y se midió su composición. Se realizó un ensayo in vitro incubando concentraciones crecientes de TG-HDL (0,02-0,2 mM) y LH proveniente de plasma post-heparínico (PPH) de donante sano (actividad: 24±2 μ mol á.c.grasos/mlPPH), inhibiendo otras enzimas lipolíticas con NaCl 1M. Se midieron los ácidos grasos liberados y se calculó, mediante el trazado de Lineweaver-Burk, la Km como indicador inverso de la afinidad enzimática. MPM presentó aumento de TG, y col-LDL en comparación PreM (Media±DS:163±72 vs 83±28 mg%, $p=0,014$; 150±37 vs 99±25 mg%, $p=0,003$, respectivamente). Col-HDL no llegó a dar diferencia significativa, (55±13 vs 66±12 mg%, $p=0,07$). Su composición química porcentual reveló mayor proporción en el contenido de TG en MPM (5,1±1,5 vs 2,8±0,9, $p < 0,01$) no encontrándose diferencias en el porcentaje de colesterol, fosfolípidos y proteínas. La medida de la afinidad enzimática demostró una Km superior en MPM (161±104 vs 43±15 μ M, $p=0,016$) que correlacionó directamente con el contenido en TG-HDL ($r=0,70$ $p=0,01$). Si bien el nivel de col-HDL de MPM no desciende, alteraciones cualitativas como el enriquecimiento en TG de la partícula, determinarían menor afinidad de la enzima por la lipoproteína en el transporte reverso del colesterol, disminuyendo su eficiencia.

196. (615) PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL EN MUJERES EMBARAZADAS NO DIABÉTICAS: SU RELACION CON LA VARIANTE PRO12ALA DEL RECEPTOR ACTIVADO POR EL PROLIFERADOR DE PEROXISOMAS (PPARG). SOOKOIAN SILVIA, CASTAÑO GUSTAVO, BURGUEÑO ADRIANA, FERNANDEZ GIANOTTI TOMAS, DURANTE MARIA MARTA, KANEVSKY DIEGO, PIROLA CARLOS JOSE

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas, A. Lanari. UBA. CONICET; Consejo de Investigación GCBA. Medicina Interna. Hospital J.M. Penna. División Obstetricia. Hospital J.M. Penna.

La prueba de tolerancia a 75 g de glucosa oral (OGTT o P75) se utiliza como marcador precoz de diabetes del embarazo. A su vez la variante pro12Ala del gen del PPARg estaría relacionada a resistencia a insulina. Nuestro objetivo fue correlacionar los niveles de glucosa luego de 75 g de glucosa oral con las características antropométricas y clínicas de madres no diabéticas y sus recién nacidos ($n=139$) y con los genotipos Pro12Ala del gen del PPARg. El 7.2% (10 mujeres) mostraron niveles superiores a 140mg/dl pero menores de 200 mg/dl considerados como valores de corte para intolerantes a la glucosa. En la regresión múltiple, los niveles de la P75 no correlacionaron ni con el índice de masa corporal (BMI), presión arterial, ganancia de peso du-

rante el embarazo, antecedentes familiares, ponderados por parentesco, de hipertensión arterial o diabetes, índice de resistencia a insulina (HOMA) ni con los genotipos del PPAR γ (modelo dominante). El peso de los recién nacidos correlacionaron positivamente con el BMI ($p < 0.012$) y la ganancia de peso ($p < 0.002$) de la madre pero no con el HOMA, la P75, o los antecedentes familiares de diabetes o hipertensión. En resumen, la P75 no estaría influida por la variante pro12Ala del PPAR γ ni estaría asociada a las características clínicas de los recién nacidos. Sin embargo debido al relativamente bajo número muestral, estos resultados deberían ser replicados con mayor poder estadístico.

197. (664) RELACIÓN ENTRE EL COBRE SÉRICO, CERULOPLASMINA Y PCR ULTRASENSIBLE (PCRUS) EN PACIENTES CRÍTICOS CON NUTRICIÓN PARENTERAL TOTAL (NPT). YAPUR VIVIANA (1), PITA MARTÍN DE PORTELA MARÍA LUZ (1), MENÉNDEZ ANA MARÍA (2), WEISSTAUB ADRIANA (1), MONTEMERLO HUGO (2), GUIDONI MARÍA ELISA (2), GONZÁLEZ ANA LÍA (1), NEGRI GUSTAVO (1)

Facultad de Farmacia y Bioquímica (1) IADEIN (Instituto Argentino de Educación e Investigación en Nutrición) (2)

Con objeto de evitar la deficiencia o el exceso de Cu durante la administración de Nutrición Parenteral Total (NPT) se estudiaron 20 pacientes críticos, adultos, sometidos a cirugía mayor abdominal. Se determinó, al comienzo (To) y al final (Tf) del tratamiento (5-14 días) en suero: Cu (CuS) (Espectrometría de Absorción Atómica), ceruloplasmina (Cp) (actividad ferroxidásica) y PCR ultrasensible (PCR us) (método inmunoturbidimétrico, CRP Latex HS). Los resultados fueron: Promedio \pm desvío estándar y rangos (entre paréntesis): Cu S (ig/dL): To: 127 ± 38 (62-238); Tf: 128 ± 40 (60-233). Cp (U/ml/L) To: 592 ± 267 (239-1380); Tf: 5 ± 233 (271-1256). PCR us (mg/L): To: 192 ± 67 (3-236); Tf: 71 ± 76 (0,3-333). A To: CuS se encontró elevado en 3 pacientes y en 17 en el rango normal (45-157 ig/dL); Cp fue normal en 17 pacientes y superior a los valores normales de referencia (800 U/ml/L) en 3. PCR us fue superior a 5 mg/L en 19 pacientes. A Tf: Cu S se normalizó en 2 de los pacientes con valores altos, se elevó uno y se mantuvo normal en el resto. Cp disminuyó en 8 pacientes, se elevó ligeramente por encima de los valores normales en 5 y se mantuvo en valores normales en 7. PCR us disminuyó significativamente en 11 pacientes ($p < 0,0004$), pero sólo se normalizó en 2. Los cambios en el CuS correlacionaron con los cambios en la Cp ($r = 0,533$; $p = 0,003$) y con el contenido de Cu de las NPT ($r = 0,455$; $p = 0,005$). No existió correlación entre Cp y PCR us. Estos resultados evidencian que durante la evolución de estos pacientes críticos: 1) los cambios en Cp y en PCR us, ambas proteínas de fase aguda, no guardaron relación; 2) los cambios en Cp se relacionaron con las variaciones en Cu S, pero no con el Cu en la fórmula de NPT; 3) CuS se elevó en todos los pacientes que recibieron más de 1 mg/d de Cu en la NPT; 4) la PCR us informó acerca de la evolución del paciente desde el punto de vista clínico, mientras que la Cp tuvo mayor dependencia con el CuS.

NEUROCIENCIAS I

198. (322) ALTERACIONES ESTRUCTURALES DE LAS MOTONEURONAS DE LA MEDULA ESPINAL LUEGO DE LA TRANSECCION ESPINAL COMPLETA Y POR TRATAMIENTO CON PROGESTERONA (PROG). GONZALEZ SUSANA (1) (2), LÓPEZ-COSTA JUAN JOSÉ (3), LABOMBARDA FLORENCIA (1) (2), MOUGEL ANALÍA (1), GONZÁLEZ DENISELLE M. CLAUDIA (1) (2), GUENNOUN RACHIDA (4), SCHUMACHER MICHAEL (4), DE NICOLA ALEJANDRO F (1) (2)

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET-UBA (1) Facultad de Medicina, UBA (2) Instituto de Biolo-

gía Celular y Neurociencias "Prof. Eduardo De Robertis", Facultad de Medicina, UBA (3) Umr 788, Inserm, Kremlin Bicetre, Paris, France (4)

La PROG ejerce efectos neuroprotectores en modelos de lesión de la médula espinal. En el presente trabajo se evaluaron cambios en la ultraestructura de las neuronas espinales luego de SCI y por tratamiento con PROG empleando técnicas de microscopía electrónica (ME). Se estudiaron ratas con SCI a nivel torácico, tratadas con vehículo o PROG (4 mg/kg peso/día x 3 días) y animales control (CTL) con y sin tratamiento. ME reveló que 3 días post-lesión, las neuronas presentaban dispersión del nucleoplasma, desplazamiento del núcleo a la periferia celular (excentricidad) y fragmentación del retículo endoplásmico rugoso (RER) con dispersión centrífuga de la sustancia de Nissl (reacción cromatolítica). PROG previno estas alteraciones estructurales, preservando la organización del RER y la localización nuclear. Se cuantificó el porcentaje de excentricidad nuclear (% ExN) como índice de la respuesta neuronal a la injuria. Las neuronas se clasificaron en 3 categorías: N (normales)= 0-33% ExN, tipo I (moderada)= 33-66% y tipo II (severa)=66-100%. El análisis de los histogramas de frecuencia ($\chi^2 = 46,65$, $P < 0,0001$) reveló que el 75% de las neuronas en CTL y CTL+PROG presentaban localización normal del núcleo. El grupo SCI mostró 50% de neuronas tipo II y un 30% tipo I, y sólo un 20% de las células permanecieron normales ($P < 0,005$, vs CTL y CTL+PROG). PROG incrementó el porcentaje de neuronas normales a 64% ($P < 0,005$ vs. SCI) asemejándose al grupo CTL. El estudio se completó analizando la densidad de inmunoreacción para MAP2 (ILIGV/mm²), proteína del citoesqueleto que mantiene la estructura neuronal. Luego de SCI, se observó una disminución de la densidad de inmunoreacción con respecto a CTL (CTL: 81720 ± 8577 , SCI: 28745 ± 3740 , $P < 0,001$) que fue revertido por tratamiento con PROG (SCI+PROG: 69034 ± 2237 , $P < 0,001$). Los resultados sugieren que PROG mantiene la integridad estructural de las neuronas lesionadas, evento clave para el restablecimiento de la función celular post-injuria.

199. (231) EFECTOS NEUROPROTECTORES DEL ESTRADIOL SOBRE EL HIPOCAMPO DE RATONES EN PROCESO DE ENVEJECIMIENTO: IMPLICANCIA DE NEURONAS Y GLIA. SARAVIA FLAVIA E, BEAUQUIS JUAN, PIETRANERA LUCIANA, ROIG PAULINA, ALEJANDRO F. DE NICOLA

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

Durante el envejecimiento el hipocampo experimenta numerosas alteraciones. Los estrógenos se encuentran entre los factores que protegen al cerebro de las enfermedades asociadas a la edad, incluido el Alzheimer. Numerosos cambios se inician tempranamente, en la llamada "edad intermedia". El objetivo fue estudiar si el 17- β estradiol (E2) prevenía determinados cambios hipocámpales asociados al envejecimiento. Ratones C57BL/6 machos de 3 y 10 meses de edad (edad intermedia, EI) recibieron un implante de E2 durante 2 meses. La proliferación en el giro dentado (GD) del grupo EI medida por inmunocitoquímica para Ki67 se encontró muy disminuida con respecto a los jóvenes, pero el tratamiento estrogénico la incrementó (EI 388.3 ± 67.3 ; EI+E2 1016.3 ± 34.2 células Ki67+/GD $p < 0,0001$). Mediante incorporación de bromodesoxiuridina 21 días antes del sacrificio se estudió la migración celular en el GD sin encontrarse cambios. Se cuantificaron las células doublecortin+, marcador temprano de neuroblastos: el grupo EI+E2 no solo mostró mayor número respecto al no tratado (EI: 786.2 ± 79.4 ; EI+E2: 1714.7 ± 126 células por hemiGD $p < 0,0001$) sino también mayor longitud de los procesos. El tratamiento estrogénico en el grupo EI evitó la pérdida neuronal en el hilio del GD a la vez que disminuyó significativamente el número de astrocitos GFAP. En el grupo EI+E2 se contaron menor cantidad de células lipofuscina+, pigmento autofluorescente indicador de incremento de stress oxidativo asociado al envejecimiento en la región hiliar que en el control (EI: 3067 ± 325.5 , EI+E2: 1627 ± 161.4 $p < 0,05$). En ratones de EI, el tratamiento

estrogénico revirtió numerosos indicadores de envejecimiento hipocámpal que incluyeron disminuída neurogénesis, astrocitosis, pérdida de neuronas en el hilio e incremento de los depósitos de lipofuscina. Estos efectos -que estarían mediados por receptores estrogénicos- contribuirían a mejorar el funcionamiento cerebral contrarrestando la neuropatología que acompaña al envejecimiento.

200. (318) NUEVOS RECEPTORES DE MEMBRANA DE PROGESTERONA (PROG) ACOPLADOS A PROTEÍNA G EN LA MEDULA ESPINAL (ME). LABOMBARDA FLORENCIA (1), MEFFRE DELPHINE (2), GONZÁLEZ SUSANA (1), SCHUMACHER MICHAEL (2), GUENNOUN RACHIDA (2), DE NICOLA ALEJANDRO (1)

Instituto de Biología y Medicina Exp. CONICET y Facultad de Medicina, UBA (1) UMR 788 INSERM, Kremlin Bicetre, Paris, France (2)

Numerosos trabajos han descrito las acciones neuroprotectoras y mielinizantes de la PROG en la ME lesionada. Estos efectos pueden ser mediados por mecanismos genómicos, a través del receptor nuclear clásico (PR) o no genómicos, a través de receptores de membrana alternativos (mPR con sus tres isoformas: α, β, γ y 25-Dx). Trabajos previos detectaron por inmunohistoquímica y por RT-PCR, el PR y el receptor 25-Dx en la ME. En este trabajo nos propusimos estudiar la presencia, localización y regulación de los receptores acoplados a proteína-G mPR α, β, γ en la ME, a fin de profundizar sobre los múltiples mecanismos de acción de la PROG. Utilizando RT-PCR y Western Blot describimos β en la ME de, por primera vez la expresión de los ARNm y proteínas para mPR α ratón. Por hibridación in situ isotópica y por inmunohistoquímica encontramos que los mPR α y β se expresaron en las motoneuronas, células gliales y neuronas del asta dorsal. Finalmente, estudiamos si el PR regula la expresión de estos receptores. A tal fin se determinó por RT-PCR los niveles de expresión de los receptores en ratones PR knock-out (PRKO). La expresión del ARNm para mPR α en ratones PRKO no mostró diferencias significativas con los ratones wild type (WT) (PRKO, $123,40 \pm 6,88$ vs WT, $100 \pm 6,34$; NS, ANOVA). Tampoco se verificaron diferencias significativas entre machos y hembras (machos, $100 \pm 6,34$ vs hembras, $117,30 \pm 10,55$; NS, ANOVA). Resultados similares se obtuvieron con los mPR β y γ (mPR β : PRKO, $84,79 \pm 15,62$ vs WT, $100 \pm 4,79$; NS, ANOVA; mPR γ : PRKO, $90,35 \pm 14,54$.vs WT, $100 \pm 13,39$; NS, ANOVA). Los resultados en PRKO indican que la PROG a través de su PR clásico no ejerce ningún tipo de regulación sobre los mPR. La amplia distribución de los mPRs sugiere que podrían estar implicados en los diferentes efectos biológicos de la PROG en la ME. Mediando las acciones neuroprotectoras y mielinizantes observadas previamente en las motoneuronas y células gliales.

201. (88) MECANISMO DE ACCIÓN MULTIMODAL MEDIADO POR PURINAS EN SINAPSIS NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO. DE LORENZO SILVANA, MAGALIÑOS MARIA PAULA, MUCHNIK SALOMÓN, LOSAVIO ADRIANA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari -U.B.A.

En sinapsis motora de mamífero, demostramos que la activación de receptores (R) purinérgicos A1 para Adenosina (AD) y P2Y12/13 para ATP/ADP inducen inhibición presináptica de la liberación de ACh al modular los canales de calcio voltaje dependientes (CCVD) vinculados a la secreción espontánea y evocada del neurotransmisor. Continuando con el objetivo de investigar el/ los sitios de acción vinculados con la activación de R purinérgicos presinápticos, hemidiafragmas de ratones CF1 fueron expuestos a Ringer hipertónico por el agregado de sucrosa (Osm: 423 mOsm/L). Tal procedimiento provoca un incremento de la frecuencia de potenciales de placa miniatura (fMEPPs) al activar un paso del proceso de exocitosis independiente de la entrada de Ca^{++} a través de los CCVD. Los resultados demuestran que en presencia de 500 nM CCPA (agonista específico RA1) y 150 nM 2-MeSADP (agonista RP2Y12/13) el área bajo la curva de la res-

puesta hipertónica disminuyó un $41.2 \pm 2.8\%$ ($n=4$) y un $39.9 \pm 4.1\%$ ($n=4$) respectivamente, con respecto a las áreas obtenidas en las soluciones hipertónicas controles. Cuando las preparaciones fueron incubadas previamente con antagonistas específicos para RA1 (0.1 μ M DPCPX) y RP2Y12/13 (1 μ M AR-C699312MX), la respuesta de CCPA sufrió un incremento del $23.30 \pm 3.2\%$ ($n=4$) con respecto a la respuesta control, mientras que la respuesta de 2-MeSADP no se diferenció significativamente de la control ($2.7 \pm 8.6\%$, $n=4$). Conclusión: En unión neuromuscular de mamífero, la inhibición presináptica inducida por AD y ADP es mediada por un mecanismo multimodal, ya que la activación de los RA1 y RP2Y12/13 respectivamente, lleva a la modulación de los CCVD y de la maquinaria de liberación involucrada en el proceso de exocitosis en un paso posterior al flujo de Ca^{++} .

202. (95) INHIBICIÓN PRESINÁPTICA INDUCIDA POR INOSINA EN SINAPSIS NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO. MUCHNIK SALOMÓN, VEGGETTI MARIELA, DE LORENZO SILVANA, MAGARIÑOS MARIA PAULA, LOSAVIO ADRIANA

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari - U.B.A

El ATP es secretado junto al neurotransmisor acetilcolina (ACh) en la unión neuromuscular. Una vez en el espacio sináptico y por la acción enzimática (ectoenzimas) es hidrolizado a adenosina (AD). La AD es un nucleósido esencial en regular la secreción de ACh. Se sabe que este efecto puede ser inhibido por la adenosina deaminasa, enzima que inactiva a la AD endógena, llevándola a inosina (IN), su metabolito inactivo. Sin embargo, recientes publicaciones señalan que la IN ejerce protección y regulación sobre varios tipos de injuria. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la IN posee algún efecto modulador sobre la liberación espontánea de ACh en diafragmas de ratones CF1. Los resultados demuestran que la IN exógena (100 μ M) reduce la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (MEPPs) (MEPPs/seg: Ringer Normal (RN): 1.02 ± 0.02 ; RN + IN: 0.59 ± 0.04 , $n=6$). Con el propósito de identificar el receptor (R) purinérgico involucrado en esta acción, estudiamos el efecto de la IN en presencia de distintos antagonistas: DPCPX (0.1 μ M) para RA1, MRS1191 (5 μ M) para RA3, Suramina (100 μ M) y Reactivo Azul 2 (RA2, 5 μ M) para RP2X y/o RP2Y. El efecto de la IN sólo fue abolido en presencia de MRS1191 (MEPPs/seg: MRS1191 0.96 ± 0.04 , MRS1191 + IN: 1.00 ± 0.02 , $n=4$), mientras que en presencia de DPCPX, Suramina y RA2, la IN mantuvo su acción inhibitoria (MEPPs/seg: DPCPX 1.01 ± 0.03 , DPCPX + IN 0.58 ± 0.01 , $n=4$; Suramina 1.06 ± 0.04 , Suramina + IN 0.66 ± 0.03 , $n=4$; RA2 1.02 ± 0.03 , RA2 + IN 0.66 ± 0.02 , $n=6$). Estos resultados sugieren que en la sinapsis neuromuscular de mamífero la IN ejerce un efecto modulador sobre la liberación espontánea de ACh mediada por activación de los RA3.

203. (405) LA HIPOXIA PRENATAL PRODUCE DAÑOS BIOQUÍMICOS Y ULTRAESTRUCTURALES DEPENDIENTES DE ÓXIDO NÍTRICO EN LAS MITOCONDRIAS DEL SNC. GIUSTI SEBASTIÁN, CONVERSO DANIELA, PODEROSO JUAN JOSÉ, FISZER DE PLAZAS SARA

Laboratorio del Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis". Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

El daño mitocondrial conduce a la muerte neuronal luego de una hipoxia, aunque no se conocen con precisión las vías de señalización implicadas. Con el objetivo de elucidar el rol del stress nitrativo en el daño hipóxico, evaluamos la modulación de la enzima óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) en el SNC en desarrollo luego de una hipoxia aguda y determinamos su posible asociación con daños bioquímicos y ultraestructurales de estas organelas. Observamos un aumento transitorio de la expresión de mtNOS entre 0-2 h post-hipoxia ($P < 0.05$), que provocó un incremento significativo en la nitración de proteínas

mitocondriales medidas por inmunoblotting. En un curso temporal coincidente con el incremento de mtNOS, las mitocondrias exhibieron una inhibición irreversible (~45%) en la actividad máxima del complejo I ($P < 0.01$) y fenotipos ultraestructurales asociados con la transición de permeabilidad de membrana (MPT), que pudieron ser prevenidos por la administración del inhibidor de NOS L-NAME 20 min antes de la hipoxia. En conclusión, la hipoxia aguda prenatal genera stress nitrativo por medio de la sobreexpresión de mtNOS, produciendo a su vez inhibición del complejo I y daños ultraestructurales NO-dependientes. Los resultados sugieren que la inhibición de mtNOS es una estrategia promisoriosa de neuroprotección en eventos de hipoxia/isquemia.

- 204. (739) CAMBIOS DE LA NOS/NADPH-DIAFORASA EN LA CORTEZA TEMPORAL DE PACIENTES CON EPILEPSIA REFRACTARIA Y ESCLEROSIS HIPOCAMPAL.** D'ALESSIO (1) LUCIANA, LÓPEZ-COSTA. (2) JUAN JOSÉ, KONOPKA, (3) HÉCTOR, CONSALVO (1) DAMIÁN, SEOANE(1) EDUARDO, LÓPEZ (2) ESTHER MARÍA, GUELMAN (4) LAURA, KOCHEN (1) SILVIA, ZIEHER (4) LUIS MARIA

(1)Hospital Ramos Mejía (2)Instituto E De Robertis (3)Hospital Moyano (4)Primera Cátedra de Farmacología, Fac Med, UBA

Introducción: El óxido nítrico (NO) es un mensajero biológico que favorece la liberación de neurotransmisores. Dependiendo del modelo experimental, puede ejercer efectos anticonvulsivantes o proconvulsivantes. Existen muy pocos reportes en pacientes con epilepsia. **Objetivos:** Investigar las modificaciones de las neuronas que sintetizan NO NOS/NADPH-diaforasa (NADPH-d) en la corteza temporal de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal refractaria (ELTR) que recibieron tratamiento quirúrgico. **Métodos:** Se tomaron muestras de la corteza temporal enviada a anatomía patológica de 7 pacientes con ELTR y de 5 controles postmortem que fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y cortadas en vibrátomo. Las secciones fueron teñidas con la técnica de NADPH-d, la cual revela las neuronas que sintetizan NO. Se determinaron el área y la densidad óptica de las neuronas reactivas por análisis de imágenes y las diferencias fueron analizadas con el test de student. **Resultados:** En los epilépticos, las neuronas NADPH-d reactivas presentaron mayor tamaño, dendritas más largas y ramificadas. El área de las neuronas ELTR vs controles fue de $543 \pm 351 \text{ pixel}^2$ vs $393 \pm 190 \text{ pixel}^2$ ($p < 0.001$) y la densidad óptica X100, fue de 79 ± 5 vs 74 ± 2 ($p < 0.001$). **Conclusiones:** Estos resultados muestran un incremento o up regulation del NO en la corteza de pacientes con ELTR.

- 205. (151) ACTIVACIÓN DE ERK1/2 EN EL CEREBRO DE RATONES QUE SOBREENPRESAN CRH SELECTIVAMENTE EN ESTRUCTURAS LÍMBICAS DEL CEREBRO ANTERIOR EN RESPUESTA A ESTRÉS AGUDO POR INMOVILIZACIÓN.** SILBERSTEIN SUSANA, REFOJO DAMIÁN, BELLIO DAMIÁN, ACUÑA MATÍAS, WURST WOLFGANG, DEUSSING JAN M., FLORIAN HOLSBOER, ARZT EDUARDO

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires e IFIBYNE-CONICET y Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich

La hormona CRH es clave en el control de la respuesta conductual, autonómica y neuroendócrina al stress, actuando a través de sus receptores CRHR1 y CRHR2. En trabajos previos demostramos que la activación de ERK1/2 media los efectos de CRH en corticotrofos y en el sistema nervioso central. El cerebro de ratones tratados icv con CRH mostró, por inmunohistoquímica y análisis por microscopía confocal, un incremento de pERK1/2 dependiente de CRHR1 en áreas límbicas específicamente relacionadas con el procesamiento de la información del ambiente y

con aspectos comportamentales de la respuesta a estrés, pero no en áreas vinculadas a funciones vegetativas/neuroendócrinas. Hemos extendido este análisis a un modelo de ratón que sobreexpresa CRH específicamente en áreas límbicas. Se evaluaron ($N=5$ cada condición) los niveles de pERK1/2 en el cerebro de animales salvajes (WT) y sobreexpresores de CRH (CRHOE) en condiciones basales y de estrés por inmovilización. En ausencia de estrés los niveles de pERK1/2 en hipocampo y en amígdala, así como los niveles de corticosterona (CORT) fueron similares ($p > 0.05$) en los WT (CORT: $20.03 \pm 3.5 \text{ mg/dl}$) y CRHOE (CORT: $25.4 \pm 7.5 \text{ mg/dl}$), indicando que la sobreexpresión de CRH en estructuras límbicas no altera el eje HPA. El análisis densitométrico de la señal de pERK1/2 en la amígdala indicó una significativa disminución en la activación de ERK1/2 ($p < 0.01$) en los CRHOE sometidos a estrés. El efecto del estrés reflejado en elevados niveles de CORT en los dos grupos de animales no correlacionó con la activación de ERK1/2, indicando que los glucocorticoides no son responsables de la regulación de la MAP quinasa en estas áreas. Ensayos de binding indican que la disminución de los niveles de pERK1/2 en los CRHOE sometidos a estrés no puede explicarse por un mecanismo de down-regulation de CRHR1 (incluso aumentados en un 60%, $p < 0.01$) y sugieren que en condiciones de exposición crónica a CRH el estrés activaría mecanismos inhibitorios de ERK1/2.

ONCOLOGÍA III

- 206. (179) ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SOBREVIVENCIA PI3K/AKT Y SU MODULACIÓN EN CÉLULAS RESISTENTES A VINCISTINA Y A DOXORUBICINA DERIVADAS DE UN LINFOMA T-MURINO.** GARCIA MARIANA, CORDO RUSSO ROSALIA, ALANIZ LAURA, ALVAREZ ELIDA, HAJOS SILVIA

Cátedra de Inmunología-IDEHU-FFyB-UBA-CONICET

La resistencia a multidrogas (MDR) se caracteriza por falta de respuesta al tratamiento quimioterápico, siendo alguna de las causas la sobre-expresión de bombas de eflujo de drogas como la Pgp y la inhibición de la apoptosis. La activación de PI3K por diferentes estímulos lleva a la fosforilación de Akt (pAkt) que a su vez fosforila diferentes proteínas involucradas en la supervivencia e inhibición de la apoptosis. El objetivo de este trabajo fue analizar la vía de señalización de PI3K/Akt en relación con MDR. Se utilizaron líneas celulares resistentes a VCR (LBR-V) y a DOX (LBR-D), ambas Pgp+ y sensible (LBR-) obtenidas previamente en nuestro laboratorio. Se evaluó pAkt por western blot encontrándose mayores niveles en las líneas resistentes que en la sensible. Utilizando inhibidores de esta vía, $0.5 \mu\text{M}$ wortmanina (W) y $10 \mu\text{M}$ LY294002 (LY), se analizó la apoptosis mediante microscopía de fluorescencia y AnnexinV observándose mayor apoptosis en LBR-D ($17.6\% \pm 9.5\%$ y $25.1\% \pm 7.4\%$) y LBR-V ($17.4\% \pm 4.8\%$ y $13\% \pm 5.7\%$) que en LBR- ($3.8\% \pm 3.4\%$ y $4\% \pm 1.8\%$) con W y LY respectivamente ($P < 0.01$). Estos inhibidores disminuyeron la expresión de survivina, proteína que inhibe la apoptosis y de I κ B, el inhibidor de NF κ B, en las tres líneas celulares. VCR aumentó la expresión de pAkt y survivina; el co-tratamiento de LY y VCR incrementó la apoptosis en relación a VCR sola en LBR- ($46.5\% \pm 11.7\%$ vs $26.9\% \pm 4.9\%$) ($P < 0.05$), y que LY sólo en LBR-D ($64.8\% \pm 6.8\%$ vs $25.1\% \pm 7.4\%$) ($P < 0.001$) y en LBR-V ($40.3\% \pm 3.4\%$ vs $13\% \pm 5.7\%$) ($P < 0.001$), mientras que DOX no tuvo efecto sinérgico con LY en ninguna de las líneas. Además W y LY inhibieron el eflujo de drogas de la Pgp. Se concluye que la vía de PI3K/Akt se encuentra más activa en las líneas resistentes y que la activación de Akt induce la expresión de survivina e inhibe NF κ B. El quimioterápico VCR aumenta la actividad de esta vía y W y LY sinergizan el efecto apoptótico por inhibición de Akt y modulan el eflujo de drogas de la Pgp.

- 207. (228) INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL IN VIVO DE UNA LÍNEA DE CARCINOMA MAMARIO TRANSFECTADA CON SHRNA PARA EL RECEPTOR DE**

PROGESTERONA (RP). LAMB CAROLINE, SALVATIERRA EDGARDO, LANARI CLAUDIA, PODHAJECER OSVALDO*Fundación Instituto Leloir, Instituto de Biología y Medicina Experimental*

Desarrollamos una línea de carcinoma mamaria murina (MC4L5) que expresa RP. Su crecimiento es hormono-independiente (HI) ya que no necesita la administración de la hormona para crecer in vivo e in vitro. Utilizamos esta línea celular sin transfactor (MC4L5-Wt) y transfectada en forma estable con un vector vacío (MC4L5-pCMV) o con un vector con una secuencia shRNA capaz de inhibir al mRNA del RP (MC4L5-O6). En este trabajo estudiamos el efecto del bloqueo estable del RP sobre la proliferación celular in vitro y sobre el crecimiento tumoral in vivo. La expresión estable del shRNA inhibió la expresión del RP en un 79±8% evaluado por Western blot. Ensayos de proliferación (incorporación de ³H-timidina) y recuento celular no revelaron diferencias significativas entre los 3 grupos. Por el contrario, el inóculo de los tres grupos experimentales (1500000 céls/ratón) en ratones hembra BALB/c arrojó diferencias significativas. A los 46 días post-inóculo la línea MC4L5-Wt alcanzó un tamaño tumoral de 77.80±19.83 mm², la MC4L5-pCMV 66.50±16.82 mm² y la MC4L5-O6 estancó su crecimiento en 9.4±10.24 mm² (p < 0.001). En otros dos ensayos similares la C4L5-O6 comenzó a crecer y luego regresión totalmente. En la línea C4L5-O6 se observó un menor número de mitosis (Wt: 0.86±0.09%; pCMV: 1.31±0.10%; O6: 0.44±0.10%; p < 0.01) y un mayor nivel de apoptosis (Wt: 1.47±0.09%; pCMV: 0.88±0.11%; O6: 1.91±0.43%; p < 0.05) que en los controles lo que correlacionó con una escasa o nula marcación para BrdU. Por Western blot e in vivo se reveló una disminución en la expresión de RP. Los resultados demuestran que el RP es fundamental en el crecimiento in vivo de esta línea celular, reforzando la idea que el RP es crítico aún en el crecimiento HI. Las diferencias de crecimiento encontradas entre el modelo in vivo e in vitro indican que el RP sería necesario para la formación del tumor, por ejemplo como inductor de angiogénesis o reclutando el estroma tumoral, ambos prescindibles in vitro.

208. (239) CATEPSINA B MEDIA EL EFECTO ANTITUMORAL DE BCG EN CÉLULAS DE CÁNCER DE VEJIGA, POR LA VÍA APOPTOTICA INTRÍNSECA. SANDES EDUARDO OMAR (1), LODILLINSKY CATALINA (1), CWIRENBAUM RUTH (1), ALVAREZ VALERIA (1), ARGUELLES CLAUDIA (2), CASABÉ ALBERTO (1), EIJÁN ANA MARÍA (1)*Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" - UBA (1) Instituto Nacional de Microbiología "Carlos Malbrán" - Anlis (2)*

La administración intravesical del bacilo Calmette-Guerin (BCG), es una de las terapias más efectivas en el cáncer de vejiga (CaV) in situ, superficial de alto grado o recurrente. BCG induce una respuesta inmune local, sin embargo, se ha propuesto también un efecto directo sobre la célula tumoral, que es poco conocido. En el mecanismo de muerte celular pueden estar involucradas proteasas lisosomales como catepsina B (CB). Objetivo: estudiar el efecto citotóxico de BCG en células de CaV humanas y murinas y el rol de la CB en el mismo. Materiales y métodos: se emplearon células de CaV humanas T24 y murinas MB49 y MBT2, BCG cepa Pasteur (3x10⁶ UFC/mg) y el inhibidor de CB CA074Me (CA). Las células se tratan con BCG (2mg/ml) por 48 hs con y sin CA. La inhibición del crecimiento se evaluó con MTS y recuento celular. La tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio se usó para determinar apoptosis. La expresión de CB se evaluó por Western blot (W-b) con un anticuerpo específico y la actividad con un método colorimétrico con un sustrato específico. La vía apoptótica involucrada se evaluó por W-b con inmunodetección de Bid y Caspasa 9. Test estadístico ANOVA/Bonferroni. Resultados: BCG inhibe significativamente (p < 0,01) el crecimiento de MB49:65%, T24:40% y MBT2:30%; efecto parcialmente bloqueado por CA en las tres líneas (p < 0,05). BCG aumenta la expresión de CB 5,7 ± 0,8 ug vs 3,4 ± 0,4 ug sin BCG en T24 (p < 0,01). La actividad expresada en UI de papaína/106 células aumenta en T24 de 5,1 ± 0,2 a 7,2 ± 0,3 y en MB49 de

4,3 ± 0,2 a 5,1 ± 0,2 (p < 0,01), inhibido por CA. Con BCG hay aumento significativo de células apoptóticas T24: 40%, MB49: 50% y MBT2: 67% (p < 0,01 vs sin BCG), el CA lo inhibe significativamente. En células T24 y MB49 observamos activación de Bid y caspasa 9, bloqueado con CA. Conclusión: La BCG induce apoptosis en células de CaV, mediado por CB activando proteínas de la vía intrínseca.

209. (273) INDUCCIÓN DE APOPTOSIS IN VITRO Y ACCIÓN ANTITUMORAL IN VIVO DE LA 2'-NITROFLAVONA. CÁRDENAS MARIANO GONZALO (1), BLANK VIVIANA CLAUDIA (1), ZOTTA ELSA (2), MARDER MARIEL (1), ROGUIN LEONOR PATRICIA (1)*IQUIFIB. Departamento de Química Biológica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. (1) Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA. (2)*

En un trabajo previo demostramos el efecto antiproliferativo de un derivado sintético de flavona, la 2'-nitroflavona (2'-NF), en una línea de células derivada de un tumor mamario murino (LM3). Con el propósito de explorar el mecanismo de acción antitumoral de este compuesto, evaluamos su capacidad de inducir apoptosis. Por ensayos de citometría de flujo demostramos que la 2'-NF incrementa la población de células sub-G1 en función del tiempo de incubación. Asimismo, este derivado indujo un patrón de fragmentación "en escalera" del ADN cromosomal y un incremento significativo en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax. Con el fin de evaluar su acción in vivo, se inocularon ratones BALB/c con 300.000 células LM3 por vía subcutánea. A partir del día 7, se administraron por vía ip 10 y 40 mg/kg de 2'-NF disuelta en 0,2 ml de vehículo (5% DMSO, 0,05% Tween 80, NaCl 0,15M), cada 3 días durante 3 semanas. El tamaño de los tumores se midió dos veces por semana durante el tratamiento. Al finalizar el mismo, los tumores fueron extraídos, medidos y pesados. El volumen tumoral en ratones tratados con 2'-NF se redujo en un 65 y 42% (p < 0,01) con dosis de 10 y 40 mg/kg, respectivamente. Además, el peso de los tumores disminuyó 60 y 50% (P < 0,01) bajo las mismas condiciones de tratamiento. Estudios de toxicidad realizados en animales inyectados con 40 mg/kg de 2'-NF revelaron la ausencia de alteraciones histológicas en tejidos provenientes de distintos órganos. Los resultados obtenidos sugieren el potencial uso terapéutico de la 2'-nitroflavona como un agente antitumoral, capaz de inducir apoptosis de células de tumor mamario murino in vitro y de inhibir el crecimiento de tumores in vivo, sin ejercer efectos tóxicos sistémicos.

210. (289) LAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN MEK/ERK Y PI3K/AKT MODULAN EL CRECIMIENTO CELULAR Y LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA SOBREENPRESION DE PKCδ EN CÉLULAS MAMARIAS MURINAS. GROSSONI VALERIA, KARLIC JUAN, KAZANIETZ MARCELO, BAL DE KIER JOFFÉ ELISA, URTREGER ALEJANDRO*Instituto de Oncología "A. H. Roffo" Department of Pharmacology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA*

A fin de evaluar el rol de PKCδ en los procesos transformación maligna y progresión tumoral se sobreexpresó esta isoforma de PKC en células mamarias murinas NMuMG. La sobreexpresión de PKCδ indujo un leve incremento en la capacidad proliferativa basal (tiempo de duplicación poblacional: 15,5±2,8 hs vs 17,7±3,6 hs en cél control), pero la activación con PMA aumentó significativamente la capacidad proliferativa de estas células (p < 0,05 vs cél control). Este incremento se confirmó mediante citometría de flujo e incorporación de [3H]-timidina. El aumento en la proliferación se asoció a un incremento en la expresión de la ciclina D1 (3,5 veces, p < 0,01) y en la fosforilación de Rb (2,4 veces, p < 0,05) respecto de las células control. Además, las células NMuMG-PKCδ mostraron un aumento en los niveles de pERK. La inhibición de la expresión endógena de PKCδ mediante ensayos de ARN de interferencia, redujo los niveles de pERK

en un 80% ($p < 0.05$) confirmando el papel de PKC δ en la activación de esta vía. Las células PKC δ fueron más resistentes a la apoptosis inducida por privación de suero o tratamiento con doxorubicina que las células control (incremento en sobrevivencia: 25% a 50% vs cél control, $p < 0.05$). El tratamiento con inhibidores farmacológicos de MEK/ERK (PD98059) y PI3K/Akt (LY94002) nos permitió determinar que la vía de Akt es la responsable de la mayor resistencia a la apoptosis. Asimismo, la insulina, factor de crecimiento ligado a la activación de PI3K incrementó 2,6 veces ($p < 0.05$) la resistencia a la muerte celular inducida por la privación de suero en las células NMuMG-PKC δ respecto a las células control. Además, la sobreexpresión de PKC δ indujo la capacidad de crecer en forma independiente del anclaje, siendo este efecto más notorio luego de la activación con PMA. Estos resultados indican que PKC δ controla el crecimiento y la resistencia a la apoptosis en células mamarias mediante dos vías de señalización independientes MEK/ERK y PI3K/Akt respectivamente.

211. (376) ROL DE LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A CARCINOMA EN LA ADQUISICIÓN DE LA HORMONO INDEPENDENCIA DE UN CARCINOMA MAMARIO MURINO. ESTUDIOS IN VIVO. FABRIS VICTORIA T., LAMB CAROLINE A., GOROSTIAGA MARÍA ALICIA, LANARI CLAUDIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental de cáncer de mama en el cual los carcinomas mamarios murinos ductales expresan receptores hormonales, y transitan por diferentes estadios de hormono dependencia. En estudios previos de co-cultivo se demostró que CAF de tumores hormono-independientes (HI) (CAF-HI) inducen una mayor estimulación de la proliferación de las células epiteliales purificadas (EPI) que los CAFs provenientes de los tumores hormono-dependientes (HD) (CAF-HD). El objetivo de este trabajo fue investigar si los CAF-HI inoculados in vivo junto con EPI de tumores HD son capaces de conferir un fenotipo HI. Se eligió un tumor HD con un número cromosómico diploide, y un tumor HI aneuploide. Se inocularon 200.000 células EPI de ambos tumores, solas o junto con igual cantidad de CAF-HI o CAF-HD ($n=8$ /grupo). En el grupo EPI-HD+CAF-HI, el 100% de los tumores crecieron, mientras que no se observaron tumores en el grupo EPI-HD+CAF-HD. Al realizar los estudios citogenéticos que confirmaran el cariotipo diploide de los tumores EPI-HD+CAF-HI, observamos, por el contrario, un cariotipo aneuploide. Esto indica que el crecimiento observado en este grupo se debió a un bajo número de células EPI-HI presentes en la fracción enriquecida de CAF-HI ($< 5\%$). Con el objetivo de investigar si los CAFs inoculados son capaces formar parte del tumor, se inocularon células EPI-HI en ratones hembra o macho, solas o junto con CAF-HI. El 90% de las metafases de los CAFs purificados de los tumores EPI+CAF en ratones macho reveló un cariotipo macho normal ($2n=40, XY$). Estos resultados fueron confirmados por medio de la técnica de Hibridación in situ Fluorescente, usando una sonda total para el cromosoma Y. Estos datos sugieren que en nuestro modelo, los CAFs inoculados junto con las células epiteliales tumorales son capaces de favorecer el inicio del crecimiento tumoral, y que el estroma tumoral es reclutado del huésped.

212. (503) EFECTO DE RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS EN LÍNEAS TUMORALES MAMARIAS. PÉREZ CECILIA, BRUZZONE ARIANA, CASTILLO LILIAN, LÜTHY ISABEL A.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)

Anteriormente nuestro grupo describió la presencia de receptores α_2 -adrenérgicos (AR- α_2) en diversas líneas tumorales mamarias humanas y murinas. Mediante RT-PCR se observó la presencia del subtipo AR- α_2A en la línea humana HS-578T. En la línea MC4-L5 se detectó la presencia de los tres subtipos de AR- α_2 por inmunofluorescencia. En ambas líneas celulares la estimulación con agonistas α_2 provocó un aumento de la prolife-

ración celular. Otros grupos demostraron la presencia de receptores beta-adrenérgicos (AR- β) en las células tumorales humanas MCF-7 y MDA-MB-231. Para completar la caracterización de los receptores adrenérgicos en las líneas utilizadas en el laboratorio evaluamos la presencia de los AR- β en la línea humana HS-578T y en la línea murina MC4-L5. Mediante ensayos de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia se observó tinción positiva tanto para el subtipo AR- β_2 como para AR- α_2 en ambas líneas celulares. Estos ensayos fueron realizados con anticuerpos específicos para el AR- β_2 y los subtipos AR- α_2 en una concentración final 1:50. Con el objetivo de estudiar si estos receptores poseían un efecto biológico, se realizaron ensayos de incorporación de timidina tritiada en presencia del agonista adrenérgico epinefrina (EPI) y el agonista específico β isoproterenol (ISO). En la línea MC4-L5 se observó que EPI generó un aumento significativo de la incorporación de [3H]-Timidina con un $EC_{50}=0,13$ pM, al igual que en las células HS-578T ($EC_{50}=0,16$ nM). Por otro lado, el ISO provocó una disminución significativa de la incorporación de timidina tritiada con $EC_{50}=1,4$ pM y 17 nM para las líneas MC4-L5 y HS-578T respectivamente. Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado anteriormente en otras líneas tumorales mamarias y sugieren que la EPI está actuando en estas líneas tumorales mamarias fundamentalmente a través de AR- α_2 , asociados a un incremento de la proliferación celular y no a través de AR- β asociados a su disminución.

213. (576) ACCIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN EL TRATAMIENTO CON INTERFERÓN ALFA DE LA PRENEOPLASIA HEPÁTICA EN LA RATA. QUIROGA ARIEL DARIÓ, ALVAREZ MARÍA DE LUJÁN, PARODY JUAN PABLO, RONCO MARÍA TERESA, FRANCÉS DANIEL, MONTI JUAN ALBERTO, OCHOA ELENA, CARNOVALE CRISTINA, CARRILLO MARÍA CRISTINA

Instituto de Fisiología Experimental (CONICET)

Previamente demostramos en ratas con preneoplasia hepática que el IFN induce apoptosis reduciendo el número y volumen de los focos hepáticos alterados (FHA) a través de TGF- β_1 y ROS. En este trabajo profundizamos el estudio del rol de ROS en nuestro modelo de preneoplasia hepática. Estudios in vivo: las ratas sujetas a iniciación-promoción (IP), se dividieron en 4 grupos: G1) IP, G2) IP + IFN, G3) IP + IFN + ácido ascórbico (ASC), y G4) IP + ASC. El índice apoptótico en los FHA aumentó en G2 ($0,38 \pm 0,06^*$); G3 y G4 mostraron valores similares a G1 ($0,21 \pm 0,01$). IFN redujo el número de FHA (-75%) en G2, mientras que en G3 y G4 no se observaron cambios. El volumen de los FHA se redujo un 50% en G2, mientras que en G3 aumentó 25% . Los niveles de lipoperoxidación hepática aumentaron un 20% en G2. ($*p < 0,05$ con respecto a G1). Estudios in vitro: se cultivaron a distintos tiempos hepatocitos de animales IP: A) sin IFN, B) con IFN, C) con IFN + anti-TGF β_1 , D) con IFN + ASC. Los niveles de ROS en el grupo B aumentaron a 1h ($+41\% \#$) y 9h ($+39\% \#$) de cultivo. Anti TGF β_1 o bloqueó la aparición del primer pico pero sí la del segundo. Como fuente de ROS medimos la actividad de la enzima NADPH Oxidasa (NOX), la cual aumentó desde 1h de cultivo en el grupo B ($+200\% \#$) con máxima actividad a 9h ($+500\% \#$). Anti-TGF- β_1 no afectó el aumento de la actividad a 1h y disminuyó la actividad a las 9h de cultivo a los mismos valores de actividad observados a la hora ($200\% \#$) ($\#p < 0,05$ respecto al grupo A). Estos resultados muestran que el aumento de ROS sería responsable de la apoptosis inducida por IFN: IFN induce la estimulación temprana de NOX aumentando la producción de ROS e induciendo la síntesis de TGF- β_1 . NOX sería sobrestimulada por TGF- β_1 y este mayor aumento de ROS llevaría a cabo el mecanismo apoptótico.

REPRODUCCIÓN III

214. (149) EFECTO DE CITOQUINAS SOBRE CELULAS JEG-3: CORRELACION ENTRE EXPRESION DE LEPTINA Y ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE METALOPROTEASAS.

FONTANA VANINA(1), BELLUSCIO LAURA(1), CALVO JUAN CARLOS(1,2)

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA (1) Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET (2)

Anteriormente presentamos que las células JEG-3 (como modelo citotrofoblástico) expresan leptina y metaloproteasas (MMP-9 y 2) y la regulación de estas enzimas por leptina o por agregado de oligonucleótido antisentido para leptina. Ahora estudiamos la regulación de MMP-9 y MMP-2 por Interferón- γ (IFN), IL-1 β y leptina, posiblemente involucrados en la implantación. Objetivo: estudiar la participación de estas citoquinas en el proceso de invasión trofoblástica, tomando como indicación de la misma la expresión de metaloproteasas. Métodos: Se cultivaron células JEG-3 en DMEM-1% SFB, en presencia de IL-1 β [0-100 pg/ml], IFN [0-50.000UI/ml], leptina (100ng/ml) por separado o combinados. Después de 3 días, se evaluó la actividad de MMP-9 y 2 y la expresión de MMP-9 por zimografía y Western blot, respectivamente. Las bandas fueron analizadas por densitometría. También se analizó la expresión endógena de leptina por las células con estos tratamientos. Resultados: El cultivo de JEG-3 en presencia de IL-1 β [0-50 pg/ml] mostró una disminución entre 4-5 veces en la leptina endógena. Esto se correlaciona con un incremento de dos veces en la expresión de MMP-9, secretada al medio de cultivo. Este aumento en la expresión se correlaciona con un aumento en la actividad. No se observaron cambios en la actividad de MMP-2. Cuando las JEG-3 se cultivaron en presencia de IFN, no se observaron cambios en la expresión de leptina endógena, como así tampoco en MMP-9 o MMP-2. Conclusiones: Tomando como modelo de citoquinas relacionadas con el proceso implantatorio, pudo observarse un aumento en la expresión y actividad de MMP-9 por IL-1 β pero no por IFN- γ . El IFN, una citoquina tipo TH1, con posibles efectos deletéreos en la interacción materno-embionaria, pareciera no estar involucrado en la invasión a través de metaloproteasas. IL-1 β no posee un papel tan definido como el IFN en este proceso y, por lo visto, parecería contribuir a la invasividad mediada por MMP-9.

215. (154) LA EXPRESIÓN DE NESTINA EN LAS CÉLULAS ESTROMALES DE LA GLÁNDULA MAMARIA DE LA RATA SE ASOCIA A ÁREAS DEL PARÉNQUIMA CON ALTA PROLIFERACIÓN. DURANDO MILENA, RAMOS JORGE G, PERDOMO VIRGINIA, LUQUE ENRIQUE H, MUÑOZ DE TORO MÓNICA

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), Fac de Bioquímica y Cs Biológicas, UNL

En la glándula mamaria (GM), los terminal end buds (TEBs) y los alveolar-buds (ABs) son las estructuras con mayor índice de proliferación epitelial. La actividad proliferativa está regulada por interacciones estroma-epitelio. La proteína nestina (Nes) es un filamento intermedio expresada por células de origen neuroectodérmico. Nuestra hipótesis propone que, en la GM, el estroma íntimo Nes(+) participa en la regulación de la proliferación de las estructuras epiteliales adyacentes. En GM de ratas Wistar de 30, 50 y 110 días de edad (d) evaluamos incorporación de bromodeoxyuridina (marcador de proliferación) y la expresión de Nes. Conforme la GM madura, observamos que la expresión de Nes se modifica persistiendo sólo en el estroma de las estructuras inmaduras: a los 30d todo el estroma adyacente al parénquima es Nes(+) mientras que a los 110d la marcación Nes(+) se limita al estroma que rodea a TEBs y ABs. Hay una correlación positiva entre la proliferación del epitelio y el área Nes(+) del estroma adyacente a los 30d ($r^2=0,81$; $p < 0,001$), 50d ($r^2=0,89$; $p < 0,001$) y 110d ($r^2=0,85$; $p < 0,001$). En animales de 110d las células del estroma íntimo adyacente a TEBs y ABs poseen características de tipo miofibroblasto: co-expresan Vimentina, α -actina y Nes. En tumores mamarios (generados por inyección con N-nitroso-N-metilurea) se observó abundante expresión de Nes en el estroma adyacente a regiones con alta proliferación epitelial. Nuestros

resultados demuestran que la Nes es un marcador de células estromales de la GM que están asociadas con estructuras epiteliales con alto índice de proliferación, tanto durante el desarrollo normal de la glándula como en el tejido tumoral. Sugerimos que existiría un cross-talk entre parénquima y células del estroma íntimo Nes (+), que regularía la proliferación epitelial. Estudios futuros permitirán dilucidar el rol de Nes en el desarrollo normal de la GM y sus neoplasias.

216. (387) EFECTOS DE METFORMINA SOBRE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CICLOOXIGENASA2 Y ÓXIDO NÍTRICO SINTASA UTERINAS EN RATONES HIPERANDROGENIZADOS DURANTE LA PREÑEZ TEMPRANA. LUCHETTI CAROLINA GRISELDA, MOTTA ALICIA BEATRIZ

CEFAYBO-CONICET

La metformina (M) es un antihiper glucemiante utilizado en el tratamiento de diabetes y poliquistosis ovárica. En trabajos previos de nuestro laboratorio vimos que previno la reabsorción embrionaria (RE) provocada por la hiperandrogenización con dehidroepiandrosterona (D) en ratones de 8 días de preñez. Esta hiperandrogenización provocaba disminución en prostaglandina E (PGE) y en la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) en el tejido uterino mientras que M previno estas alteraciones. El objetivo de este trabajo fue estudiar la morfología de los sitios de implantación (SI), la localización de las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX) y NOS y realizar una evaluación semicuantitativa de dichas expresiones (% área marcada determinada por ImageProPlus). Los SI de ratones hiperandrogenizados con D (sc 60 mg/kg peso corporal, 24 y 48 hs post-implantación, toma de muestras 24 hs después) tienen mayor número y tamaño de lagunas y ruptura de fibras de colágeno en la matriz decidual con respecto a los controles (C) (n=6/grupo). La M vía oral por cánula (250 mg/kg los mismos días) administrada conjuntamente con D previno estos efectos. Por inmunohistoquímica (IHQ) vimos que la expresión de iNOS, eNOS y COX se localiza en las zonas de lagunas y sincitiotrofoblasto tanto en el grupo C como en D y D+M. Por semicuantificación de las IHQ observamos un aumento significativo en la expresión de las tres enzimas por D y su reversión por M (COX: C 10.3 \pm 0.4; D 28 \pm 1; D+M 9.7 \pm 0.4 %- iNOS: C 7.5 \pm 0.3; D 20 \pm 1; D+M 13.1 \pm 0.3 %- eNOS: C 8.3 \pm 0.2; D 13.1 \pm 0.3; D+M 7.1 \pm 0.2 %-n=6/grupo). Concluimos que M previene la RE provocada por la hiperandrogenización con D en preñez temprana no sólo regulando la producción de PGE y la actividad de NOS uterinas sino también la expresión de las enzimas COX y NOS, siendo sus localizaciones similares en todos los grupos experimentales. El incremento en las expresiones de COX y NOS por D podría ser un mecanismo compensatorio para la disminución en sus actividades.

217. (406) MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y DE LA APOPTOSIS DE LINFOCITOS DE RATONES HEMBRAS EN CULTIVO POR LA DEHIDROEPIANDROSTERONA Y LA N, N DIMETILBIGUANIDA: METFORMINA. SOLANO MARÍA EMILIA, SANDER VALERIA, WALD MIRIAM, MOTTA ALICIA B

CEFAYBO-UBA-CONICET

El objetivo de este trabajo fue evaluar el mecanismo por el cual la dehidroepiandrosterona(D) y la Metformina(M) regulan la funcionalidad de los linfocitos(L). 10(7) L extraídos de nódulos linfáticos de ratones hembra prepúberes BALB/c, fueron cultivados por 4h en medio RPMI a 37 °C con D10 μ M(D); M10 y 100 μ M(M10 y M100); D+M10 o 100 μ M(DM10 y DM100) y un grupo control (C), n=5/grupo. La proliferación (P, incorporación de timidina tritiada; %) basal no fue afectada en D(103 \pm 16) y disminuyó por igual en M10, M100, DM10 y DM100(70 \pm 10;74 \pm 21;53 \pm 23 y 73 \pm 19 vs C:100 \pm 8 $p < 0,05$). P con ConA 2 μ M disminuyó en D(3721 \pm 424), y en M10, M100, DM10 y DM100 dependiendo de la dosis de M(6258 \pm 1019;2841 \pm 379; 765 \pm 289 y 203 \pm 16 vs C: 7625 \pm 422, $p < 0.01$). Se evaluó si esta inhibición se debía a: 1) Apoptosis (A,por AnexinaV; %). A las 4h los niveles de A no pre-

sentaron diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$), mientras a las 18h se incrementaron en M10, M100, DM10 y DM100 (88 ± 2 ; 86 ± 4 ; 89 ± 4 y 85 ± 6) vs C y D (81 ± 2 y $80,1 \pm 0,1$) $p < 0,05$; ó 2) Estado de oxidación celular (Índice de Lipoperoxidación:LPO; pmol malondialdeído/10(7)células). D(39 ± 2) no modificó LPO mientras M10, M100, DM10 y DM100 lo disminuyeron (35 ± 5 ; 27 ± 6 ; 33 ± 5 y 29 ± 6 vs C: 42 ± 2 ; $p < 0,05$). Debido al controvertido rol del Oxido Nítrico(NO) como mediador de A y agente oxidante se evaluó la actividad de NO Sintasa(NOS, conversión de Arginina a Citrulina; nmol NO/minx10(7)células) que aumentó en D, M10, M100 y DM100 ($8,3 \pm 0,3$; $8,1 \pm 1,2$; $8,5 \pm 0,7$ y $8,4 \pm 0,2$) vs C y DM10 ($6,9 \pm 0,8$ y $7,2 \pm 0,9$) $p < 0,05$. D disminuye P estimulada por una vía independiente de A y LPO. M pese a disminuir LPO disminuye P debido al menos en parte a A incrementada. D+M inhibe sinérgicamente P estimulada, mientras P basal, A y LPO presentan solo el efecto de M. La presencia de D incrementa el NO sin variar A ni LPO, asimismo DM10 no varía el NO y si los restantes parámetros. Esto sugeriría que el NO no sería mediador de A ni LPO y su rol en este sistema debe ser estudiado.

218. (460) LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR PPARDELTA MODULA EL METABOLISMO LIPÍDICO Y NITRIDÉRGICO EN TEJIDO DECIDUAL DE RATA DIABÉTICA DURANTE LA ORGANOGÉNESIS TEMPRANA. HIGA ROMINA DANIELA, WHITE VERÓNICA, FERNÁNDEZ DO PORTO DARÍO, GONZÁLEZ ELIDA, JAWERBAUM ALICIA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET-UBA)

Trabajos previos muestran las alteraciones del metabolismo nitridérgico y lipídico en embriones de rata diabética durante la organogénesis temprana y su vinculación con la inducción de malformaciones congénitas. El tejido decidual constituye el entorno que brinda sustento al embrión en esta etapa del desarrollo, y dará origen a la placenta materna de la placenta. Tanto la decidua como el embrión expresan el receptor nuclear PPARdelta en este período. El objetivo del presente trabajo fue determinar la producción de óxido nítrico (NO) y los niveles de lípidos en tejido decidual de rata control (C) y diabética (D) durante la organogénesis temprana y estudiar si la activación de PPARdelta modula dichos parámetros. Metodología: La diabetes se indujo por administración de estreptozotocina (50 mg/kg) previo al apareo. Deciduas obtenidas en día 10.5 de preñez se incubaron en presencia o ausencia de carboxiprostaciclina, cPGI2 (1 mM), análogo estable de PGI2, agonista de PPARdelta. Los niveles de lípidos se dosaron mediante TLC y densitometría. Los niveles de nitratos/nitritos (índice de la producción de NO) fueron dosados por reacción de Griess. Resultados: Los niveles de triglicéridos en decidua D están incrementados respecto a C (135%, $p < 0.05$). La adición de cPGI2 incrementa tanto los niveles de triglicéridos (118%, $p < 0.05$) como de fosfolípidos (344%, $p < 0.01$) en decidua D, mientras que no ejerce efecto en C. Los niveles de nitratos/nitritos son mayores en decidua D (83%, $p < 0.005$) respecto a C y la adición de cPGI2 disminuye los mismos (55%, $p < 0.0001$) en decidua D, mientras que no ejerce efecto en decidua C. Conclusiones: Tanto el metabolismo nitridérgico como lipídico del tejido decidual se encuentra afectado por la diabetes materna, alteraciones probablemente vinculadas con las anomalías metabólicas y morfológicas que presentan los embriones de estos animales. Se destaca asimismo la capacidad de PPARdelta de modular estos parámetros en tejido decidual de rata diabética.

219. (554) MODULACIÓN DE LOS TIMPS POR ACCIÓN DE LA 15D-PGJ2 EN LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA DE RATA DIABÉTICA. PUSTOVRH CAROLINA, CAPOBIANCO EVANGELINA, MARTÍNEZ NORA, GONZÁLEZ ELIDA, JAWERBAUM ALICIA

CEFyBO-CONICET-UBA

Las metaloproteinasas (MMPs) juegan un activo rol en la reestructuración tisular que acompaña al desarrollo feto-placentario.

Previamente hemos demostrado que dichas enzimas se encuentran incrementadas en la unidad feto-placentaria de rata diabética y que la 15deoxy-delta12,14PGJ2 (15dPGJ2), disminuida en dichos tejidos, es capaz de modular negativamente su actividad. Objetivo: Evaluar los niveles del receptor nuclear PPARgamma (receptor de 15d-PGJ2) y la regulación de los inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (TIMPs) por 15d-PGJ2 en feto (F) y placenta (P) de ratas controles (C) y diabéticas (D) a mediados de la preñez. Metodología: La diabetes se indujo por administración neonatal de estreptozotocina (90 mg/kg). Los niveles de PPARgamma fueron evaluados por western blot y los niveles de TIMPs por zimografía reversa. Resultados: Se observa un incremento en los niveles de PPARgamma en PD y FD en relación al C (40% y 35% respectivamente, $p < 0.05$). En las PD los niveles de TIMPs se encuentran fuertemente disminuidos en comparación al C (60%, $p < 0.01$) y la adición al medio de incubación de 15D-PGJ2 permite una recuperación de estos niveles en PD ($p < 0.01$) no provocando cambios en la PC. En F los TIMPs no pudieron ser detectado por medio de la técnica empleada. Conclusión: Existe un incremento en la expresión de PPARgamma, probablemente compensando la disminución en los niveles de 15D-PGJ2 (su agonista endógeno), el cual es capaz de modular tanto la actividad de las MMPs como los niveles de los TIMPs (sus inhibidores endógenos). Estos resultados abren una vía para el estudio de nuevos moduladores que podrían mejorar las alteraciones feto-placentarias presentes en esta patología.

220. (558) OBTENCIÓN Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS A PARTIR DEL MACIZO CELULAR INTERNO, A TRAVÉS DE UN MÉTODO DE DISGREGACIÓN MECÁNICA. DELCOURT STELLA, VIEIRO MERCEDES, OJEA QUINTANA MARCOS, ALIPPE YAEL, ARGIBAY PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental-Hospital Italiano Bs As

Las células madre embrionarias (CME), obtenidas a partir del macizo celular interno (MCI) del blastocito, pueden ser cultivadas manteniendo la propiedad de pluripotencialidad y proliferan mediante un proceso de autorenovación y supresión de la diferenciación. Se ha planteado que podrían ser una fuente celular a utilizar en medicina regenerativa. El objetivo de nuestro trabajo es presentar un método de aislamiento y proliferación por disgregación mecánica de CME obtenidas de blastocitos murinos. Métodos: Se aislaron embriones en dos células de hembras superovuladas de ratones C57BL/6. Dichos embriones se cultivaron en medio HTF/HSA 5% (37°C, 5% CO₂). Se incubaron los blastocitos hatching sobre una monocapa alimentadora de fibroblastos primarios embrionarios murinos irradiados en el medio de CME-MEM (MEM alta glucosa suplementado con antibiótico, BSA y factores) durante 48 horas hasta la adherencia del MCI. Las células del centro de la colonia formada fueron transferidas a una nueva monocapa y se dejaron proliferar de 10-15 días. Los sucesivos pasajes se realizaron por disgregación mecánica. Se observó la morfología de las células y se midió el crecimiento de los cúmulos mediante una grilla micrométrica. Se evaluó el parámetro diámetro de la colonia como indicativo de la proliferación. Resultados: La proliferación fue extensiva. Se obtuvo un promedio de 300 a 400% de aumento en los diámetros de las colonias para los pasajes 2 y 3 con un aumento diario de 20% a 80%. Al día 10 de cultivo la proliferación se mantuvo en un 10% diario, seguida de un ritmo de proliferación del 2%. En todos los casos el fenotipo observado fue típicamente de CME, sin evidencias de diferenciación. Conclusión: Se logró aislar y proliferar CME mediante un método simple de disgregación mecánica. Luego de 10 días la tasa de proliferación disminuye. La técnica descrita es una alternativa válida a técnicas más complejas y costosas como la inmunocirugía y la disgregación enzimática.

221. (712) ACCION DE LA HIPERANDROGENIZACION CON DEHIDROEPIANDROSTERONA SOBRE EL OVARIO DURANTE LA REGRESION DEL CUERPO LUTEO. EFEC-

TO DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA. SANDER VALERIA ANALIA, SOLANO MARIA EMILIA, MOTTA ALICIA

CEFYO-UBA-CONICET

En estudios previos vimos que la hiperandrogenización con dehidroepiandrosterona(D) alteró la esteroidogénesis y la expresión de linfocitos T en el ovario. La administración de metformina (M), droga utilizada en el síndrome de poliquistosis ovárica (andrógenos elevados) fue capaz de revertirlas. El objetivo es estudiar el efecto de D y M durante la luteolisis(L) estructural: balance oxidativo ovárico y funcional:estradiol(E), así como en la viabilidad(Vi), apoptosis(A) y necrosis(N) de linfocitos de ganglios drenantes de ovario(anexina V). Ratones hembras prepúberes BALB/c fueron inyectadas ip con gonadotropina coriónica equina(eCG:10UI/ratón, día 0) obteniéndose ovarios con cuerpos lúteos funcionales por 11 días. Se tratan 24 y 48 h antes del sacrificio(día 11): D(sc 60mg/kg peso), M(oral cánula 50mg/kg), D+M y vehículo(V),n=10/trat. La actividad de la catalasa(CAT:pmol cat/mg prot) aumenta en D+M y M(p<0.001) y D(p<0.01) vs V(0.08±0.02(a), 0.13±0.01, 0.07±0.01 y 0.025±0.002). El índice de lipoperoxidación (LPO: nm malondialdehído/mg tej) disminuye (p<0.05) sólo en M(D:0.47±0.07,D+M:0.049 (b)±0.03, M:0.035 (c)±0.03 vs V:0.6±0.07). La concentración de glutation (GSH:umol/g tej) aumenta(p<0.05) solo en M(D:2098±200; D+M:2271±300, M:2348 (d)±300 vs V:1942±160). El E(pg/ml suero) aumenta en D(p<0.001), D+M y M(p<0.01) vs V(34±3; 29±3, 29±3 vs 14.1±0.5). La Vi se incrementa en D y M vs V (58±3, 60.9±0.2 y 24±4; p<0.001), sin diferencias en A (D:15.6±0.6, D+M:18±2, M:16±3, V:16±2). Sin embargo la N fue menor en D y M vs D+M y V(24±2, 21±2 vs. 31±2 y 32±2, p<0.01). Conclusión: D incrementa la funcionalidad del ovario directa(aumento de E) e indirectamente (aumento de la Vi y de CAT:el H₂O₂ es desencadenante de L). Sin embargo no revierte GSH ni LPO (relacionados con la L estructural). La M actúa como antioxidante mejorando el balance oxidativo(CAT, GSH y LPO) y la esteroidogénesis aunque en menor medida que el D. Estos efectos no resultan aditivos como se ve en D±M.

TRANSDUCCION DE SEÑALES II

- 222. (98) AUMENTO DE C-SRC EN HÍGADO DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREEXPRESAN GH.** MIQUET JOHANNA GABRIELA, SOTELO ANA ISABEL, GONZALEZ LORENA, TURYN DANIEL

Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; IQUIFIB (UBA-CONICET)

Ratones transgénicos que sobreexpresan hormona de crecimiento (GH) poseen un peso corporal aproximadamente 70% mayor que sus respectivos controles normales. Sin embargo, en un trabajo previo demostramos que la vía JAK2/STAT5, principal vía activada por GH relacionada con el crecimiento, se encuentra inhibida en el hígado de estos animales. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar otras vías de señalización independientes de JAK2 que pudieran estar activadas en este modelo. Mediante inmunoprecipitación y Western-Blotting se analizó el contenido proteico y grado de fosforilación de la tirosina-quinasa c-Src. En los ratones transgénicos se observaron valores significativamente mayores de c-Src, tanto de su contenido proteico como de la fosforilación en tirosinas implicadas en la modulación de su actividad (Y416/419 y Y527/530). Con el fin de evaluar la actividad de esta enzima, se realizó un ensayo de actividad quinasa utilizando un péptido específico. Se observó un aumento significativo de la actividad de c-Src, que coincide con la sobreexpresión de esta quinasa en el hígado de los ratones transgénicos. Luego de un estímulo agudo con GH no se observaron variaciones en el grado de fosforilación ni en la actividad quinasa de c-Src tanto en los ratones transgénicos como en los normales. Estos resultados sugieren que en este modelo de ratones transgénicos que sobreexpresan GH hay una activación constitutiva de la tirosina quinasa c-Src en hígado, que se debe

principalmente a la sobreexpresión de esta proteína. Dado que la vía JAK2/STAT5 está atenuada en estos ratones, c-Src podría ser una vía alternativa de la transducción de la señal de GH en este modelo. Esta quinasa podría estar implicada en el mayor crecimiento que se observa en los ratones transgénicos, así como también en otros efectos adversos provocados por exceso de esta hormona, como el desarrollo de hepatocarcinoma, cuya incidencia es mayor en estos ratones.

- 223. (114) PARTICIPACIÓN DEL INHIBIDOR DEL CICLO CELULAR, P19INK4D, EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DERIVADAS DE NEUROBLASTOMA, SH-SY5Y POR ÁCIDO RETINOICO.** SCASSA MARÍA ELIDA, OGARA MARÍA FLORENCIA, VERMAL AZCONA CARLOTA, CÁNEPA EDUARDO TOMÁS

Laboratorio de Biología Molecular - Depto. Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA

La línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y se diferencia a células que resultan bioquímica, ultraestructural y electrofisiológicamente similares a neuronas cuando se las estimula con agentes diferenciadores tales como los retinoides. Un evento crucial para la diferenciación terminal es la salida permanente del ciclo celular, la cual requiere la inactivación de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Esta inactivación es debida en gran parte a la acción de inhibidores de CDKs (CKIs). Dos familias de CKIs han sido identificadas en mamíferos. Una de ellas, la INK4, compuesta por p16, p15, p18 y p19. La otra, la Cip/Kip integrada por p21, p27 y p57. Dada la necesidad de esta salida del ciclo celular y resultados del análisis in silico del promotor de p19 que revelaron la presencia de una secuencia en la posición -311 al -292 pb con alta homología a los RARE, estudiamos la regulación de este gen a lo largo del proceso de diferenciación de células SH-SY5Y estimuladas con ácido retinoico. En ensayos de Northern y Western blot observamos dos picos de inducción de p19, uno al segundo día y otro, sostenido en el tiempo, a partir del séptimo día postratamiento, mientras que la inducción de p27 (molécula esencial para la neurogénesis) se produjo y mantuvo luego del primer día. Mediante ensayos de EMSA y de desplazamiento competitivo usando oligonucleótidos conteniendo el RARE de p19 detectamos la unión específica de proteínas nucleares a este elemento. En este estudio comprobamos que la expresión de p19 como la de p27 permanece elevada en neuronas diferenciadas. Sin embargo, el tratamiento con el péptido β-amiloide produjo una significativa reducción del mRNA de p27 en concordancia con la necesidad que presentan las neuronas de re-entrar al ciclo para morir por apoptosis frente a insultos genotóxicos, mientras que los niveles del mRNA de p19 permanecieron invariantes. Estos hallazgos nos permiten proponer una función para p19 en la neurogénesis.

- 224. (210) ESTUDIO DE MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA A HIPOXIA.** GEREZ JUAN(1), CARBIA-NAGASHIMA ALBERTO(1), SILBERSTEIN SUSANA(1), PAEZ-PEREDA MARCELO(2), STALLA GÜNTNER(2), HOLSBOER FLORIAN(2), ARZT EDUARDO(1)

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEN, IFIBYNE-CONICET, UBA (1); Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania(2)

HIF-1alfa es la subunidad principal de HIF-1, factor de transcripción central en la respuesta adaptativa a hipoxia. En normoxia, HIF-1alfa es sustrato del sistema ubiquitina-proteasoma y es rápidamente degradado. Por otro lado, en hipoxia los mecanismos de degradación de HIF-1alfa se bloquean permitiendo que este factor se acumule e induzca la expresión de genes como VEGF, Eritropoietina y enzimas glucolíticas, todos ellos encargados de aumentar las posibilidades de supervivencia de la célula. En el presente trabajo estudiamos el rol de R-SUME (RWD-Containing Sumoylation Enhancer), una proteína cuyo gen fue clonado en nuestro laboratorio a partir de una línea celular de hipofisis de capacidad tumorigénica aumentada y de función desconocida,

durante el estrés hipóxico. Demostramos por RT-PCR en células Cos7 que R-SUME es inducido 4 veces luego de 16 hs de hipoxia y 6.5 veces cuando se sobre-expresa HIF-1alfa, indicando que estos efectos podrían estar mediados por HIF-1. Estos resultados fueron confirmados empleando construcciones reporteras con la zona promotora del gen de R-SUME ($p < 0.05$). Recíprocamente, en experimentos de transfección transiente con el vector de expresión de R-SUME y con construcciones reporteras para Elementos de Respuesta a Hipoxia (HRE) demostramos que R-SUME aumenta la actividad transcripcional de HIF-1 un 200% ($p < 0.01$) como así también la estabilidad de la proteína HIF-1alfa detectada por Western Blot. Si silenciamos la expresión de R-SUME por RNAi específicos, tanto el aumento de la proteína HIF-1alfa inducido por hipoxia como la actividad transcripcional de HIF-1 disminuyen considerablemente (53% y 59% respectivamente) indicando un rol importante de R-SUME en la estabilización de HIF-1alfa. Finalmente, hemos demostrado mediante ensayos de inmunoprecipitación que R-SUME interacciona físicamente con HIF-1alfa. Concluimos que R-SUME es inducido en hipoxia ejerciendo un rol importante en la activación transcripcional y estabilidad de HIF-1alfa.

225. (246) MECANISMO DE RESISTENCIA A LA INSULINA EN RATAS OBESAS ZUCKER. ROL DE LA ENZIMA TBK-1. MUÑOZ MARINA, TOBLLI JORGE, GIANI JORGE, DOMINICI FERNANDO, TURYN DANIEL

IQUIFIB (UBA-CONICET); Hospital Alemán

El receptor (IR) de insulina (INS) se autofosforila por la unión de la INS, que resulta en la activación de la quinasa intrínseca del mismo y la consecuente fosforilación de mediadores como los sustratos del IR, IRSs, que al fosforilarse en residuos de Tyr conducen a la activación de enzimas que median las acciones de la INS. La obesidad se encuentra directamente relacionada con el desarrollo de resistencia a la INS, rasgo fundamental de la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico. Aunque se estableció una correlación epidemiológica, el mecanismo molecular que relaciona la obesidad y la resistencia a la INS aún no se esclareció. Existen numerosos estudios que relacionan a la inflamación con el desarrollo de resistencia a la INS. Este concepto se sustenta en el hecho de que citoquinas pro-inflamatorias como $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 se encuentran elevadas en animales y pacientes obesos e insulinoresistentes. Estos mediadores inhiben la acción de la INS activando Ser/Thr quinazas, que llevan a la fosforilación en Ser del IR e IRSs. Una de las quinazas descritas es IKK β . En un estudio previo demostramos que el aumento en la fosforilación en Ser994 del IR en el hígado de ratas obesas Zucker (ROZ) estaría implicado en la disminución de la actividad de la quinasa intrínseca del IR. En un ensayo in vitro observamos que TBK-1, Ser/Thr quinasa que actuaría activando a IKK β , fosforiló a una secuencia del IR que contenía la Ser994. En este trabajo se analizó la participación de TBK-1 en el mecanismo de resistencia a la INS que lleva a la fosforilación del IR en serina. Mediante inmunoprecipitación seguida de inmunoblotting se midió el grado de fosforilación en Ser y Tyr del IR, el contenido proteico de TBK-1 y la asociación entre TBK-1 e IR en músculo e hígado de ROZ. Se observó un aumento en el contenido de TBK-1 y en su asociación con IR en hígado de ROZ, no así en el músculo. En conclusión, TBK-1 estaría involucrada en el mecanismo de resistencia a la INS que lleva a la fosforilación en la Ser994 del IR.

226. (266) ROL DE LOS RECEPTORES AT1 Y MAS EN LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE LA ANGIOTENSINA-1-7 EN CORAZÓN. GIANI JF, GIRONACCI MM, MUÑOZ MC, PEÑA C, TURYN D, DOMINICI FP

IQUIFIB (UBA-CONICET)

La unión de insulina (INS) a su receptor (IR), estimula la autofosforilación y la activación de la tirosina quinasa del IR dando lugar a la fosforilación en residuos de Tyr de su sustrato IRS-1, que actúa como sitio de anclaje para diversas proteínas incluyendo la enzima PI 3-quinasa (PI3K) que resulta activada luego

de la unión. Uno de los efectores de la PI3K es la enzima Akt mediadora de muchas acciones de la INS. La elevación crónica de angiotensina (Ang) II induce insulinoresistencia y disminuye la respuesta a la insulina en la vía de señalización PI3K/Akt. Previamente, demostramos que la Ang-(1-7), un fragmento proteolítico de la Ang II cuyas acciones son en su mayoría opuestas a las ejercidas por la Ang II, estimula la fosforilación del IRS-1 y de Akt y la activación de la enzima JAK2 en corazón de rata por un mecanismo que no involucra al IR y que revierte la inhibición que la Ang II ejerce sobre la fosforilación de IRS-1 y Akt estimulada por INS. En el presente trabajo, se analizó la participación del receptor AT1 de Ang II (AT1R) y del receptor Mas (MasR), específico para Ang-(1-7), en este fenómeno. Para ello se determinó el nivel de fosforilación de IRS-1, JAK2 y Akt en corazón de ratas estimuladas en forma aguda con Ang II, Ang-(1-7) o INS mediante inmunoprecipitación seguida de inmunoblotting. Las estimulaciones con Ang II o Ang-(1-7) se realizaron en presencia o en ausencia de un bloqueante del AT1R, el cual participa en la transducción de la señal tanto de Ang II como de Ang-(1-7) o de un bloqueante específico para el receptor Mas (A-779) que es selectivo para Ang-(1-7). La fosforilación de IRS-1 estimulada tanto por Ang-(1-7) como por Ang II fue inhibida en su totalidad al bloquear el AT1R. Por el contrario, el bloqueo del MasR inhibió parcialmente la fosforilación de IRS-1 inducida por ambas hormonas. La activación de la enzima JAK2 por Ang II y Ang-(1-7) fue inhibida totalmente al bloquear el AT1R. La fosforilación de la enzima Akt no fue estimulada por Ang II pero sí por Ang-(1-7). El bloqueo del AT1R no modificó el nivel de activación de Akt estimulado por Ang-(1-7) pero el bloqueo del MasR inhibió por completo dicha activación. Nuestros resultados indican que la Ang-(1-7) modula positivamente la transducción de la señal de insulina en el corazón al estimular la actividad de Akt. Dicho efecto estaría mediado por el receptor Mas, específico para esta hormona y no involucra al receptor AT1.

227. (434) PROTEÍNAS G PEQUEÑAS: UNA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ADICIONAL PARA EL RECEPTOR H1 A HISTAMINA. NOTCOVICH CINTIA (1), RIOBO NATALIA A (2), KAZANIETZ MARCELO G (2), DAVIO CARLOS A (3), SHAYO CARINA C (1)

IByME-CONICET (1) Department of Pharmacology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA (2) Departamento de Fisicomatemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (3)

La histamina es una amina endógena involucrada en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Hasta el momento se describieron 4 subtipos de receptores: rH1, 2, 3 y 4 de la familia de los GPCRs. El rH1 traduce la señal vía Gq. Varios GPCRs acoplados a esta vía activan cascadas asociadas a la familia de las G pequeñas, Rho, modulando procesos como secreción, migración, control del ciclo celular y apoptosis. Dado que la histamina modula varias de estas respuestas a través del rH1, nos planteamos como objetivo, estudiar la asociación entre la activación del rH1 y la activación de proteínas G pequeñas de la familia de Rho. Para ello, transfectamos células CHO en forma estable con el rH1. Ensayos de unión demuestran que los clones expresan el rH1 y que son funcionales (modulación de IPs). Ensayos de pulldown con proteínas específicas que unen Rac y RhoA activas, indican que la histamina y 2-(3-F3CH3fenil) histamina (agonista H1) inducen la activación de ambas en forma tiempo y concentración dependientes. Dicha activación es bloqueada por 10 μ M pirilamina (antagonista H1). Muchos de los GPCRs acoplados a Gq están asociados a la activación de proteínas G12/13. Con el objetivo de determinar la proteína G (q o 12/13) involucrada en la activación de RhoA por el rH1, evaluamos la activación de Rho en células transfectadas en forma transitoria con vectores de expresión para inhibidores de la señalización de Gq y G12/13 (RGS2 y dominio RGS de p115-RhoGE, respectivamente). Los resultados indican que la activación de RhoA es mediada por Gq. Dado que la activación de RhoA modula SRE (Serum Response Element), realizamos ensayos de gen reportero (SRE-LUC) en presencia de los

inhibidores antes mencionados y observamos que la activación del SRE se encuentra fundamentalmente mediada por Gq y por G12/13 en menor medida. Estos resultados indican por primera vez que la histamina a través del rH1 modula la vía de las proteínas G pequeñas de la familia Rho.

228. (497) LA EXPRESIÓN DEL RH2 A HISTAMINA ATENÚA LA SEÑALIZACIÓN DE OTRO GPCR ACOPLADO A LA MISMA VÍA. EVIDENCIAS EXPERIMENTALES DE LA EXISTENCIA DE UNA ESPECIE DEL RECEPTOR INACTIVA ACOPLADA A LA PROTEÍNA G. TUBIO MARIA ROSARIO (1), SHAYO CARINA C (2), DAVIO CARLOS A (1), MONCZOR FEDERICO (1)

Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA (1) Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET (2)

El receptor H2 a histamina (rH2) pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, transduciendo su señal a través de la proteína Gs. Previamente hemos descrito que ciertos agonistas inversos del rH2 son capaces de inducir una conformación inactiva del receptor capaz de secuestrar proteína G y en consecuencia atenuar la señalización de otros receptores acoplados a la misma vía. El objetivo de este trabajo es determinar si la especie del receptor inactiva pero acoplada a proteína G existe en la membrana celular independientemente de la presencia de ligandos. Para ello, evaluamos si la expresión del rH2 es capaz de interferir en la señalización de otros receptores. Por transfección estable con cDNA del rH2 en células CHO, sin rH2 endógeno, obtuvimos clones que expresan distintas cantidades de receptor, llamados CHO-H₂L y CHO-H₂H (27,1±0,4 y 0,65±0,02 fmol/mg de prot. respectivamente). Por ensayos concentración-respuesta con los ligandos: amthamina, tiotidina, famotidina, ranitidina y cimetidina, determinamos la funcionalidad del rH2. Los parámetros de las respuestas se correlacionan con el número de receptores expresados en cada clon. Evaluamos la interferencia del rH2 en la señalización del receptor a calcitonina (CT) que se expresa endógenamente en las células CHO. Mediante ensayos concentración-respuesta con CT, determinamos que la expresión del rH2 afecta la respuesta a CT disminuyendo su R_{máx} en forma dependiente de la cantidad de rH2 expresada sin modificar la CE50 (R_{máx}: 79,4±1,8; 53,7±1,5; y 25,1±1,1 pmol; pCE50: 10,2±0,1; 10,9±0,1; y 10,1±0,2 en CHO, CHO-H₂L, y CHO-H₂H, respectivamente). Este efecto fue revertido por la sobreexpresión de proteína Gs. Estos resultados indican que la sobreexpresión del rH2 atenúa la señalización mediada por CT, de un modo dependiente de la cantidad de rH2 expresado. Mediante el secuestro de proteína G, el rH2 limita el acceso de otros receptores a la proteína Gs.

229. (601) EXCLUSIÓN DE AMPc EN CÉLULAS LEUCÉMICAS PROMONOCÍTICAS HUMANAS U937. COPSEL SABRINA (1, 2), FERNANDEZ NATALIA (1, 2), SHAYO CARINA C (2), DAVIO CARLOS(1)

Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA (1) Intituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET (2)

Numerosas señales extracelulares asociadas a receptores acoplados a proteína G (GPCR) convergen en la producción de AMPc, existiendo una fina regulación a distintos niveles a fin de lograr especificidad de la señal. En los últimos años, se ha descrito la exclusión del AMPc intracelular en eucariotas inferiores y en ciertos modelos de eucariotas superiores. La exclusión del AMPc podría cumplir un papel importante en la regulación de los niveles de AMPc intracelulares (AMPci). En este trabajo, nos planteamos como objetivo determinar si el AMPci es capaz de ser excluido de las células promonocíticas humanas U937 y evaluar las variables que determinan dicho proceso. Estas células presentan en su superficie receptores a histamina H2 y receptores β adrenérgicos acoplados a la vía del AMPc. Cinéticas de producción de AMPc inducidas por 10 μM amtamina (Ago H2), 10 μM isoproterenol (Ago β) o 75 uM forskolina (activador directo de AC)

muestran que dicho nucleótido comienza su exclusión a partir de los 10 min de tratamiento. Por ensayos de cinética de producción de AMPc con distintas concentraciones de amtamina, se determinó que la exclusión es dependiente de los niveles alcanzados intracelularmente por este mensajero. Finalmente, mediante ensayos concentración-respuesta con amtamina, luego de distintos tiempos de estímulo determinamos que este proceso es además tiempo dependiente, observando un máximo de exclusión luego de 120 min de tratamiento (R_{máx} extracelular= 133.4±4.3 pmol/1e6 cel; pCE50=5.88±0.07 n=3). Estos resultados indican la presencia de un novedoso mecanismo como parte de la estricta regulación de la señal del AMPc, dependiente del tiempo post-estimulación y de la concentración intracelular de este mensajero e independiente del agente que module dichas concentraciones intracelulares.

230. (635) DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE MACRÓFAGOS FRENTE A PATÓGENOS CON DISTINTA CAPACIDAD INVASORA. HOVSEPIAN EUGENIA (1), CERQUETTI CRISTINA (1) (2), GOREN NORA (1)

CEFYO-CONICET. Fac. Medicina UBA. (1) Depto. Microbiología, Fac. Medicina UBA (2)

En el transcurso de una infección bacteriana sistémica los macrófagos activados desempeñan un importante papel con una gran producción y liberación de citoquinas y otros mediadores inflamatorios. En este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares que participan en la respuesta inflamatoria de macrófagos frente a patógenos Gram- con diferente capacidad invasora. Para ello se infectaron células RAW 264.7 con 10E7 UFC de Salmonella entérica salvaje (S) y de 2 cepas mutantes con capacidad invasora disminuida (M1 y M2). Mediante Western blot (Wb), observamos que tanto S como M1 y M2 activan a las MAPK detectándose la fosforilación de p38 y p42/44 en los 3 casos sin variaciones significativas. En cambio, al estudiar la vía de NFκB por Wb, si bien observamos la desaparición citoplasmática característica de IκBα e IκBβ luego de 30 minutos de infección, ésta resulta atenuada para las células infectadas con M1 y M2 respecto a las infectadas con S. Paralelamente se observa una menor translocación al núcleo de la subunidad p65 de NFκB en las células tratadas con M1 y M2 respecto a S. Luego de 24 h. de infección de las células RAW con las 3 cepas, se detectó mediante Wb la expresión de ciclooxigenasa-2 y óxido nítrico sintasa inducible. Sin embargo la liberación de óxido nítrico (NO) al sobrenadante de las células tratadas con S fue un 75% mayor que la de las células tratadas con M1 y M2. De manera similar los niveles de PGE2 (pg/mg prot.) para las tratadas con S:108,90±17,38, fueron mayores que los de M1:31,3±9,1 y M2:62,2±22,5. Además al evaluar la viabilidad celular mediante citometría de flujo, observamos que la inducción de apoptosis por parte de S fue significativamente mayor que la de M1 y M2 con un p < 0,025. Estos resultados nos muestran una mayor respuesta inflamatoria de las células RAW infectadas con S respecto a las cepas de menor capacidad invasora, con una gran producción de NO y PGE2 mediada por NFκB, resultando en una mayor apoptosis.

231. (695) MODULACIÓN DE LA TRASLOCACIÓN DE INOS A MITOCONDRIA POR CHAPERONAS EUCARIOTAS. GONZALEZ ANALIA (1, 2), HOLOD SILVIA (1, 2), FRANCO MARÍA CLARA (1), PODEROSO JUAN JOSÉ (1), CARRERAS MARÍA CECILIA (1, 2)

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas (1), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (2), Universidad de Buenos Aires

En estudios preliminares hemos observado que en la endotoxemia experimental, iNOS trasloca a mitocondria y podría ser un factor fisiopatogénico mayor en el deterioro multiorgánico de la sepsis grave. Con el propósito de analizar los mecanismos subyacentes, estudiamos ratas Wistar ligadas a endotoxemia experimental (E) (10 mg LPS/kg, IP) o ligadura cecal y doble pun-

ción (LCP) (n=4-6/grupo), el hígado fue extirpado y las mitocondrias aisladas y purificadas en diferentes períodos (0-2-4-6-12-18 y 24 hs) post procedimiento. Se estudiaron parámetros de funcionalidad hepática, actividad de complejos mitocondriales I-IV, expresión de iNOS, nitración de proteínas mitocondriales, expresión de chaperonas HSP90, iHSP70 y HSP40 por Western blot. Los resultados demostraron que ambos modelos producen daño hepático severo con expresión de iNOS en la mitocondria con un pico a las 6 hs (E) o a las 12 hs (LCP), nitración de las proteínas mitocondriales y disminución marcada de actividad de complejo I (C: 93±3 vs 12 hs, LC: 39±9; E: 53±6 nmoles/min/mg prot, p< 0,05) y IV (C: 18±2 vs 12 hs, LC: 13±3; E: 13±2 k/min/mg prot). En ambos modelos se observó un aumento de HSP40 a 2-4 hs y una reducción en la expresión de HSP90 a 12-24 hs (chaperonas que podrían participar en la traslocación a la mitocondria). Asimismo, se observó a 12-24 hs un aumento de iHSP70 y de hemo oxigenasa I en citosol (chaperonas que regulan la transcripción de iNOS); paralelamente se observó la entrada de hemo oxigenasa I a la mitocondria que podría estar relacionada con la degradación de iNOS intramitocondrial por consumo del pool de hemo. Conclusiones: Los resultados demuestran a) que la traslocación persistente de iNOS a mitocondria produce severo daño hepático y b) que la modulación de las chaperonas podría participar en el control de la expresión de iNOS y en su traslocación a la mitocondria.

INMUNOLOGÍA IV

- 232. (303) AUMENTO DEL SUBSET DE MONOCITOS (MO) CD14+/CD16+ EN SANGRE PERIFÉRICA (SP) Y LÍQUIDO PLEURAL (LP) DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS (TB).** ALEMÁN MERCEDES (1), YOKOBORI NOEMÍ (1), ROMERO MERCEDES (1), SCHIERLOH PABLO (1), MUSELLA ROSA (2), CASTAGNINO JORGE (2), DE LA BARRERA SILVIA (1), ABBATE EDUARDO (2), SASIAIN MARÍA DEL CARMEN (1)

Academia Nacional de Medicina (1) División de Tisiopneumología, Hospital Muñiz (2)

Los Mo de SP en su mayoría son de fenotipo CD14+/CD16- pero alrededor del 8% son CD14+/CD16+. Esta última subpoblación se incrementa hasta un 20% en enfermedades como HIV, producen citoquinas proinflamatorias y tienen elevada capacidad fagocítica. Se ha postulado que pertenecen a un linaje diferente que daría origen a células dendríticas con distintas capacidades efectoras. El objetivo de este trabajo fue caracterizar dicha población en SP y células obtenidas de LP de pacientes con TB, evaluando la expresión de marcadores por citometría de flujo. Resultados: La población CD14+/CD16+ de SP fue significativamente mayor en TB respecto de individuos sanos (N) (p< 0.02) mostrando además una mayor expresión de CD14 (p< 0.001). La expresión de CCR5 en TB está aumentada respecto de N (p< 0.001), particularmente en la subpoblación CD14+/CD16+ (MFI: 571.8±13 vs CD16-: 407.8±100, p< 0.02). Paralelamente, en pacientes que presentaron derrame pleural, la subpoblación CD14+/CD16+ se encontró elevada en LP respecto de SP (p< 0.007), así como la población CCR5+ (p< 0.05), la expresión de CD14 (p< 0.05), CD16 (p< 0.03) y CD54 (p< 0.03). La expresión aumentada de estos marcadores se observó particularmente en la población de monocitos CD16+ de LP. Como control, los Mo en LP de pacientes con cáncer de pulmón, no presentaron aumento de la población CD14+/CD16+ ni en la expresión de los marcadores antes mencionados. Conclusión: La expansión del subset de Mo CD14+/CD16+ en pacientes con TB y la expresión diferencial de receptores de homing favorecería el reclutamiento al tejido infectado contribuyendo así a la activación inmune crónica de la enfermedad.

- 233. (283) CONTRIBUCIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- α (TNF- α) A LOS EFECTOS LOCALES Y**

SISTÉMICOS DESARROLLADOS DURANTE LA INFECCIÓN POR CANDIDA ALBICANS. PORPORATTO CARINA, RODRÍGUEZ GALÁN MARIA CECILIA (1), SOTOMAYOR CLAUDIA E. (1), CANO ROXANA (1), CEJAS HUGO (2), CORREA SILVIA G. (1)

CIBICI-CONICET. Inmunología. Dpto Bioquímica Clínica. Fac. Cs. Químicas. Univ. Nac. de Córdoba (1) Cátedra de Patología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Misericordia, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. (2)

Durante la infección por *C. albicans*, huéspedes inmunocomprometidos por el estrés desarrollan una deficiente respuesta inflamatoria y severas alteraciones histopatológicas y funcionales a nivel hepático. Dado que el TNF α es clave en el balance metabólico e inflamatorio del organismo en la etapa inicial de una infección, realizamos un estudio comparativo en 3 grupos experimentales: ratas infectadas con 3 x 10⁸ levaduras viables (Ca; n=7), ratas infectadas y estresadas durante 3 días (CaE; n=6) y ratas tratadas con una única dosis i.p. de anti-TNF α (4 mg/rata) 6 horas antes de la infección (CaT; n=10). Al cabo de 3 días se observó que el tratamiento con TNF α revirtió la pérdida de peso provocada por la infección (p< 0.02 vs. Ca y CaE) y mejoró los niveles de glucemia (p< 0.009 vs. CaE) aunque sin alcanzar los valores de ratas sólo infectadas (p< 0.017 vs. Ca). El mayor número de UFC obtenidas en hígado en el grupo CaT se correlacionó con una pérdida en la capacidad funcional de las células del peritoneo, sitio de ingreso y primer control de la diseminación del patógeno, evidenciado por una disminuida producción de ON (p< 0.01 vs. Ca), marcada reducción en el porcentaje de células interferon gamma+ (Ca= 28 ± 5,7; CaE 20 ± 5,1; CaT= 6,3 ± 1,5) (p< 0.03) y CD11b/c +CMH tipo II + (Ca=86%; CaE=89%; CaT=58%) (p< 0.03). La completa neutralización de TNF α sólo empeoró levemente el perfil de esteatosis y pérdida de glucógeno observada en los animales Ca, por lo cual la marcada esteatosis y completa pérdida de glucógeno presente en los animales CaE no puede ser explicada por la disminuida producción de TNF α que presentan estos animales. Estos resultados demuestran que la ausencia de TNF α no es responsable del desequilibrio metabólico observado en los animales inmunosuprimidos por el estrés sin embargo explicaría eficientemente la pobre respuesta inflamatoria desarrollada por estos animales luego de la infección por *C. albicans*.

- 234. (540) ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA Y HEPATITIS POR VIRUS C: EXPANSIÓN OLIGOCLONAL EN EL INFILTRADO DE CÉLULAS MONONUCLEARES.** FERREYRA SOLARI NAZARENA (1), FAINBOIM HUGO (2), GALOPPO CRISTINA (3), LEVI DIANA (4), CHERNAVSKY ALEJANDRA (1)

Hospital de Clínicas "José de San Martín" (1) Hospital General de Infecciosas "F.J. Muñiz" (2) Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez" (3) Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo (4)

Establecimos previamente la presencia de infiltrados mono/oligoclonales en el hígado de pacientes con Hepatitis Autoinmune tipo I (HAI-I) que refleja expansión local de linfocitos frente a autoantígeno/s putativo/s (Medicina, Vol64 2004). La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), caracterizada histológicamente por necroinflamación, esteatosis macro/microvacuolar y fibrosis variable, así como la hepatitis persistente por virus C (HCV) son hepatopatías crónicas caracterizadas también por la presencia de infiltrados de células mononucleares. Objetivo: investigar la naturaleza clonal de los infiltrados linfocitarios s en biopsias de pacientes con EHNA y HVC mediante el análisis de reordenamientos de TCR γ (cadenas γ y del receptor antigénico de LT). Pacientes y Metodología: Ocho pacientes adultos (HCV crónica), 5 adultos y 4 niños (EHNA) y 10 muestras de hígado humano control. Se obtuvo ADN genómico por digestión enzimática de las biopsias con proteinasa K, extracción con fenol y precipitación etanólica. Se realizó un análisis basado en amplificación en cadena de la

polimerasa (PCR), utilizando un diseño de PCR multiplex con un panel de 4 oligonucleótidos de regiones variables y 3 de joining que detectan en conjunto todos los reordenamientos de TCR γ . Se amplificó una región del gen DR01 como control. Las bandas de amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa 2% y poliacrilamida 8%. Resultados: Se describe un infiltrado mono/oligoclonal en 7/8 biopsias de HVC y policlonal en 8/9 EHNA (4/5 pacientes adultos y 4/4 pacientes pediátricos). Se describe un patrón policlonal en 10/10 muestras de hígado control. Conclusión: Diferentes mecanismos conducen al establecimiento de hepatopatías crónicas. Al igual que en el hígado control, el infiltrado hepático de células mononucleares en EHNA es inespecífico (policlonal) mientras que por el contrario, la presencia de virus C induce expansión linfocitaria selectiva (mono/oligoclonal) en HCV crónica.

235. (357) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTES A DROGAS. YOKOBORI NOEMÍ(1), GEFFNER LAURA(1), SCHIERLOH PABLO(1), ALEMÁN MERCEDES(1), RITACCO VIVIANA(2), VESCOVO MARISA(3), GARCÍA ANA(3), LÓPEZ BEATRIZ(2), BARRERA LUCÍA(2), DE LA BARRERA SILVIA(1), SASIAIN MARÍA(1)

Il Hema "M. R.Castex", Academia Nacional de Medicina(1) Servicio de Micobacterias, Anlis-Malbran(2) Servicio de Tisioneumonología, Hospital Muñiz(3)

La tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB) es causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistentes, por lo menos, a isoniazida y rifampicina. En Argentina, se han detectado casos de MDR-TB causados por cepas autóctonas (cepas Muñiz, M, 410, 228 y Rosario, Rb). Por genotipificación (RFLP, IS6110) se clasificaron en cepas de alta y baja infectividad y/o virulencia: las cepas M y Rb presentan alta infectividad/virulencia, mientras que las cepas 410 y 228 no fueron transmitidas por más de una década. La inducción de apoptosis en macrófagos (MACs) es necesaria para la generación de respuesta protectora contra micobacterias, facilita la presentación cruzada de antígenos a linfocitos T CD8+ y muerte de la bacteria intracelular. Por lo tanto los objetivos de nuestro estudio son: caracterizar la capacidad de las cepas Rv y M de inducir apoptosis y producir citoquinas en las células huésped (MACs) y determinar la capacidad de inducir proliferación celular. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de dadores sanos y pacientes con TB o MDR-TB. La obtención de MACs se realizó por adherencia. A los 7 días fueron pulsados con Mtb (cepas H37Rv, M y 410), analizándose marcadores de superficie y evaluándose la capacidad de inducir apoptosis con Anexina V/ioduro de propidio por citometría de flujo. Los resultados demostraron que la cepa Rv induce mayor apoptosis que la M a 1 y 4 horas (% AV+IP- a 1h: 45 \pm 12 vs 36 \pm 11, $p < 0.05$) no se observando estas diferencias a las 18 horas. No se observaron diferencias significativas en los marcadores de superficie. Los ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina 3H, demuestran que la cepa M en controles normales PPD+ induce menos activación que Rv y 410 ($p < 0.05$). La producción de TNF- α inducida por la cepa M en MACs está significativamente disminuida con respecto a la Rv. Estos resultados sugieren que la cepa M es más virulenta (inhibición de apoptosis) y menos antigénica (proliferación).

236. (107) ANEMIA INFECCIOSA EQUINA: PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR DURANTE LA ETAPA ASINTOMÁTICA DE LA ENFERMEDAD. BAILAT ALEJANDRA (1), SOUTULLO ADRIANA (1) (2), VEAUTE CAROLINA (1), GARCIA MARIA INES (1), RACCA ANDREA (1), MALAN BOREL ILEANA (1)

Cat. de Inmunología Básica - Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas - Universidad Nacional del Litoral (1) Lab. de Inmunología - Dirección de Sanidad Animal - Ministerio de la Producción de la Provincia de Santa Fe. (2)

El Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) causa una enfermedad crónica, con episodios febriles recurrentes asociados con viremia y anemia. Este lentivirus presenta dos glicoproteínas de envoltura, gp90 y gp45. En células mononucleares de sangre periférica (PBMC) proveniente de caballos asintomáticos infectados espontáneamente con el VAIE (AIE+), así como de animales serológicamente negativos (AIE-); se analizó la expresión de ARNm codificante para IFN γ y se evaluó la linfoproliferación de dichas células frente al péptido sintético gp90 (29aa), el cual imita una región conservada de la proteína viral. Se determinó además la expresión de ARNm codificante para IFN γ luego del estímulo específico e inespecífico in vitro de células de animales infectados con el virus. Los niveles de ARNm para IFN γ fueron determinados mediante RT-PCR semicuantitativa y los resultados expresados con relación de la intensidad de banda de β -actina. Se hallaron mayores niveles en el grupo AIE+ (0,79 \pm 0,12; n=14) respecto a los encontrados para el grupo AIE- (0,22 \pm 0,10; n=11) ($p=0,002$). Los índices de proliferación (IP) obtenidos frente al péptido gp90, evaluados mediante incorporación de BrdU luego de 96 h de cultivo, fueron mayores para los animales AIE+ (4,42 \pm 1,59; n=4) respecto a los de AIE- (1,50 \pm 0,27; n=4) ($p=0,02$). Todas las muestras analizadas tuvieron valores de IP inespecífica frente a FHA mayores a 10. Los resultados de la expresión de ARNm para IFN γ en PBMC de animales AIE+ estimuladas in vitro durante 4 h, fueron, para tres de las cuatro muestras analizadas, de 0,094; 0,073; 0,089 para gp90 y 0,964; 1,173; 0,427 para FHA. La existencia de actividad linfocitaria específica y de un aumento en la producción de IFN γ en caballos durante el período asintomático de la infección, sugeriría una participación activa de la respuesta inmune celular en el control de la replicación viral que se manifiesta en esta etapa de la enfermedad.

237. (335) CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES T CD4+CD25+ EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS MULTI-RESISTENTE (MDR-TB). GEFFNER LAURA, YOKOBORI NOEMÍ (1), SCHIERLOH PABLO (1), ALEMÁN MERCEDES (1), GARCÍA ANA (2), RITACCO VIVIANA (3), VESCOVO MARISA (2), LOPEZ BEATRIZ (3), BARRERA LUCÍA (3), ABBATE EDUARDO (2), SASIAIN MARÍA (1), DE LA BARRERA SILVIA (1)

Il Hema, Academia Nacional de Medicina (1) Servicio de Tisioneumonología, Hospital Muñiz (2) Servicio de Micobacterias, Anlis-Malbrán (3)

En Argentina se han detectado brotes de MDR-TB causados por cepas autóctonas (cepa Muñiz, M) y casos únicos causados por cepas que no prosperaron a la comunidad (4110 y 228). En MDR causada por cepas Beijing (USA, Europa) se ha observado alta producción de IL4 e IL10, citoquinas que favorecen la expansión de linfocitos T reguladores (Tr). El objetivo de este trabajo fue evaluar en pacientes MDR-TB (n=5) e individuos normales PPD+ (N, n=6), la presencia de subpoblaciones T CD4+CD25+ en células mononucleares (CM) aisladas de sangre periférica (SP) o CM cultivadas con H37Rv (Rv), M y 410. Se determinó la presencia de linfocitos CD4+CD25 totales (25Tot), T activados (CD4+CD25-low, 25L) y Tr definidos como CD4+CD25-high (25H) y CD4+Foxp3+. Los resultados se expresaron como % de células 25+ en células CD4 totales (frecuencia). Los resultados muestran un aumento de la frecuencia de 25Tot (31 \pm 7, $p < 0.05$), 25L (24 \pm 6, $p < 0.05$) y 25H (5 \pm 1) en SP de pacientes MDR-TB comparado con N (25Tot=10 \pm 2; 25L=8 \pm 2, 25H=3 \pm 0.5). Se confirmó que 25H eran Tr por expresión de Foxp3, encontrándose frecuencias aumentadas en MDR-TB ($p < 0.05$). No se observaron diferencias en el % de CD4 totales (MDR=45 \pm 2, N=51 \pm 3). Además se observaron diferencias entre MDR y N en respuesta a Rv, M y 410: en MDR-TB se encontró un ligero aumento de 25L con Rv (31%), M (6%) y 410 (25%) sin alteración de la frecuencia de Tr con ninguna de las cepas (0-2 %). En N se observó un aumento de 25L con Rv (175%), M (125%) y 410 (150%) y aumento de Tr con Rv (20%) y disminución con M (-20%) y 410 (-20%). Estos resultados sugieren una activación de CD4+ y una expansión in vivo de Tr en pacientes MDR-TB que no es significativamente modifica-

da por el cultivo in vitro. Por el contrario en controles normales PPD+, Rv induce activación (25L) y expansión de Tr mientras que M y 410, si bien activan (25L) reducen la frecuencia de Tr, sugiriendo una modulación diferente de la respuesta inmune por las cepas MDR.

238. (731) SÍNTESIS DE CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN) Y NEUTRÓFILOS (PMN) DE PACIENTES TUBERCULOSOS (PTB) ESTIMULADAS (E) CON M. TUBERCULOSIS INACTIVADO (Mtb i) Y FILTRADO DE CULTIVO (FC). SELENSCIG DANTE ALEJANDRO (1), FIORENZA GLADYS LUCÍA (1), MARTINEL LAMAS DIEGO JOSÉ (1), FARRONI MIGUEL ANGEL (2), BOGUÉ CRISTINA RAQUEL (2), DLUGOVITZKY DIANA GRACIELA (1)

Facultad de Ciencias Médicas Univ. Nac. Rosario (1) Hospital I. Carrasco - Rosario (2)

La respuesta inmune bien regulada debidamente depende de la adecuada producción de citocinas, relacionada a la vez con la activación celular. Estudiamos la eficacia del estímulo de M. tuberculosis inactivado (Mtb i) y Filtrado de Cultivo de M. tuberculosis (FC) en la síntesis de citocinas por CMN y PMN de PTB. Se estudiaron 12 PTB de ambos sexos y edades variables (35 ± 14.5 SD) del Hospital I. Carrasco y 12 sujetos normales (Co) con las mismas características de sexo y edad que PTB. El diagnóstico de tuberculosis se hizo a través de exámenes clínicos, radiológicos y bacteriológicos. M. tuberculosis se identificó en esputo o material de biopsia, por tinción de Zielh-Nielsen y cultivo en Lowenstein Jensen. Se separaron las CMN y PMN a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque y se resuspendieron 5.10^3 cel/ml en RPMI 1640 de CMN y PMN de PTB y Co. Se rotularon 2 Basal (B), 2E1 y 2E2 procediendo igual con PMN. Se colocó en los tubos B 250 ul de células (5.10^6 /ml) más 5 ul de RPMI 1640, en los tubos E1 250 ul de células CMN y 5ul Mtb i (conc 10^6 de la Escala de Mc Farland), y en los E2 se agregó 250 ul de células (CMN) + 20 µg/ml de FC Mtb. Los tubos B y E de PTB y Co se incubaron 20 horas a 37° C. Se centrifugó y separó 250 ul de sobrenadantes de cultivo (s.c) que se conservó en tubos Eppendorf, a -20°C para realizar las IL12 e IL4 por ELISA (R determinaciones de TNFA, &D). Resultados (se presentan sólo algunos) pg/ml ($x \pm S.E$): IL12: en CMN: PTB: B = 3.46 ± 0.69 ; E1 = 5.78 ± 1.42 ; E2 = 13.38 ± 1.80 , p < 0.05. Co: B = 2.05 ± 0.85 ; E1 = 2.27 ± 0.77 ; E2 = 2.88 ± 1.37 , D.N.S. PTB vs Co: B: p < 0.05, E1: p < 0.05, E2: p < 0.05. TNF en CMN: PTB: B = 3265.84 ± 448.04 ; E1 = 4358.71 ± 166.56 , E2 = 4201.66 ± 289.49 , p < 0.05. Co: B = 357.71 ± 188.46 , E1 = 367.28 ± 257.73 , E2 = 1537.81 ± 1954.32 . Estos datos sugieren que M. tuberculosis inactivado y más aún los Ags proteicos de F.C. son eficaces para estimular producción de citocinas por CMN y PMN, noción de importancia en la preparación de vacunas.

239. (300) ROL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PD-1 EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA M. TUBERCULOSIS. ALVAREZ IVANA BELEN (1), JURADO JAVIER (1), QUIROGA MARIA FLORENCIA (1), PASQUINELLI VIRGINIA (1), MUSELLA ROSA M. (2), CASTAGNINO JORGE P. (2), ABBATE EDUARDO (2), DESTEFANO GASTON (2), DE LA BARRERA SILVIA (3), GARCIA VERONICA (1)

Departamento de Microbiología - Facultad de Medicina - UBA (1) Servicio de Tisiopneumología, Hospital FJ Muñiz (2) Departamento de Inmunología, Academia Nacional de Medicina (3)

La tuberculosis (TB), enfermedad crónica causada por M. tuberculosis (Mtb), permite correlacionar protección y enfermedad limitada con un exclusivo ataque mediado por células. Tanto las células NK (NK), como los linfocitos T (LT) son importantes en la respuesta al Mtb. La activación de LT depende de señales intracelulares iniciadas por TCR y modulada por señales coestimuladoras y de receptores negativos. La actividad NK es regulada por señales positivas o negativas vía receptores de citoquinas y moléculas coestimuladoras. La proteína PD-1 es una

molécula coestimuladora expresada en LT activados, que actúa como regulador negativo de la activación de LT, y posee dos ligandos, PD-L1, PD-L2. Se demostró alta expresión de PD-L1 en NK expuestas a IFN- γ , sugiriendo que las NK PD-L1+ mediarían la activación de LT. En este estudio investigamos la expresión de PD-L1 en NK de pacientes con TB clasificados como altos respondedores (AR, alta inmunidad celular) y bajos respondedores (BR, débil inmunidad a Mtb). Se estimularon las células con Mtb con/sin IL-15, IL-18 o IFN- γ y posteriormente se marcaron para CD56, CD3, y PD-L1, analizándose por citometría de flujo. En AR, Mtb incrementó las células NK+ PD-L1+ (p < 0.01), incremento aún mayor al estimular con Mtb+ IL-15 (p < 0.001). El IFN- γ y la IL-18 aumentaron levemente PD-L1 en NK estimuladas con Mtb. Contrariamente, en BR sólo se observó un leve aumento de PD-L1 en NK + Mtb +/-IL-15. Cuando las NK de TB (seleccionadas con bolillas magnéticas) se expusieron a LT en presencia de Mtb, se observó una proliferación significativa (medida por incorporación de timidina tritiada). Al adicionar anticuerpo anti-PD-L1 a células NK, previo al cultivo con LT se observó una inhibición de la proliferación por Mtb, indicando que el antígeno modularía la vía de señalización NK-LT. Así, nuestros datos sugieren que la vía de señalización PD-1/PD-L1 podría tener implicancia en la regulación de las respuestas inmunes durante la infección por Mtb.

240. (282) CONTRA-BALANCE ENTRE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADORAS E INHIBITORIAS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE IFN-GAMMA CONTRA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. QUIROGA MARIA FLORENCIA (1), JURADO JAVIER (1), PASQUINELLI VIRGINIA (1), ALVAREZ IVANA BELEN (1), MUSELLA ROSA M. (2), CASTRO ZORRILLA LILIANA (3), ABBATE EDUARDO (2), ROLDAN NICOLAS (2), CHULUYAN EDUARDO (1), GARCÍA VERÓNICA (1)

Departamento de Microbiología - Facultad de Medicina - UBA (1) Servicio de Tisiopneumología, Hospital FJ Muñiz (2) Departamento de Inmunología, Instituto de Tisiopneumología "Raúl Vaccarezza" (3)

Varias proteínas de señalización modulan positiva o negativamente la activación de linfocitos T (LT) durante la respuesta inmune. Nosotros determinamos la participación conjunta de moléculas de señalización inhibitorias (SAP y CD31) y activadoras (SLAM) en la regulación de la producción de IFN- γ en tuberculosis. Los pacientes con tuberculosis fueron divididos en altos respondedores (AR, fuerte respuesta inmune contra M. tuberculosis) y bajos respondedores (BR, débil respuesta inmune al patógeno). M. tuberculosis (5 días de estimulación) incrementó significativamente la expresión de CD31 (citometría de flujo, p < 0,05) en BR, paralelamente con un marcado aumento de SAP (Western blot), mientras que los niveles de SLAM (citometría de flujo) no cambiaron frente a estimulación antígeno-específica y no se detectó producción por ELISA. En contraste, la estimulación antigénica en AR marcadamente de IFN- γ disminuyó la expresión de SAP y CD31, e incrementó significativamente los niveles de SLAM (p < 0.001) e IFN- γ (p < 0.001). Al señalar conjuntamente vía CD31 y el TCR observamos una significativa inhibición del IFN- γ en AR (p < 0,001), efecto también observado al adicionar CD31 recombinante a células en cultivo con antígeno. Asimismo, los LT SLAM+ se redujeron al 50% pero se observó un marcado incremento de SAP en células de AR estimuladas con M. tuberculosis luego de señalización vía CD31. Por inmunoprecipitación detectamos una fuerte asociación SAP-CD31 sólo en pacientes BR luego de 5 días de estimulación antigénica, paralelamente con una baja producción de IFN- γ . En contraste, no se observó unión SAP-CD31 en individuos AR, los cuales produjeron niveles significativos de IFN- γ contra M. tuberculosis. En conjunto, la expresión de las moléculas inhibitorias SAP y CD31 correlaciona en forma inversa con la producción de IFN- γ en pacientes con tuberculosis, mientras que la expresión de SLAM se asocia en forma directa a la secreción de IFN- γ por los mismos individuos.

241. (666) RESPUESTA AGUDA Y CRÓNICA CONTRA YERSINIA ENTEROCOLITICA O:3 EN PULMON DE RATONES DEFICIENTES EN IL-12P40. GUTIERREZ JESICA, DI GENARO MARIA SILVIA, GOMEZ NIDIA NOEMÍ

Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. UNSL. San Luis.

Yersinia enterocolitica es una enterobacteria que afecta al hombre y a los roedores y podría causar infección sistémica con formación de abscesos en hígado, bazo y pulmón. Interleuquina-12 (IL-12) juega un rol crítico en la inmunidad protectora contra Y. enterocolitica. No se conoce el impacto en pulmón de la infección con esta bacteria. Además, el efecto de la deficiencia de IL-12 sobre la respuesta inmune en pulmón luego de la infección con Y. enterocolitica no ha sido previamente estudiado. El objetivo fue determinar indicadores de injuria en lavados broncoalveolares (LBA) y analizar la histoarquitectura pulmonar en los diferentes estadios de la infección con Y. enterocolitica en pulmón de ratones IL-12p40^{-/-} (KO) y wild-type (WT) tanto en la fase aguda como crónica de la infección. Ratones WT y KO fueron infectados por vía intragástrica con $2 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ UFC de Y. enterocolitica O:3. A los 3 y 21 días post infección (pi) los ratones fueron sacrificados. Desde los LAB se llevó a cabo la tipificación de las poblaciones celulares y se determinó lactato deshidrogenasa (LDH) (Amador et al.) y nitritos por el método de Griess. Otro grupo de ratones se utilizó para histología. Únicamente a los 21 días pi se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en el número de linfocitos del LBA de ratones KO. A los 3 y 21 días LDH (U/L) aumentó significativamente en WTpi y KOpi respecto de WT ($p < 0,01$) y a los 3 días los nitritos (iM) aumentaron ($p < 0,01$) en los grupos WTpi y KOpi respecto de los ratones WT sin infección. El estudio histopatológico de pulmón mostró a los 3 y 21 días pi infiltraciones celulares en ambos grupos. En conclusión el pulmón sufriría injuria ante la infección por Y enterocolitica que estaría marcada por una infiltración celular importante. Además, la deficiencia en IL-12p40 afectaría mecanismos de defensa contra Y. enterocolitica en pulmón.

242. (195) BRUCELLA ABORTUS INDUCE PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS Y APOPTOSIS EN ASTROCITOS MURINOS. GARCIA SAMARTINO CLARA, PASQUEVICH KARINA, BARRIONUEVO PAULA, ZWERDLING ASTRID, CASSATARO JULIANA, GUIAMBARTOLOMEI GUILLERMO

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)

La brucelosis es una zoonosis causada por bacterias del género Brucella. Estas bacterias invaden células del sistema retículo endotelial, siendo secuestradas en lugares específicos del cuerpo, como en sistema nervioso central. B. abortus es capaz de inducir en distintos tipos celulares la secreción de citoquinas inflamatorias como IL-1 β , TNF α e IL-6. La neurobrucelosis se presenta con síntomas y signos inflamatorios. Esta respuesta inflamatoria puede llevar a la astrogliosis induciendo proliferación y apoptosis de los astrocitos. En este trabajo evaluamos si B. abortus o algunos de sus componentes son capaces de inducir la secreción de citoquinas inflamatorias en astrocitos murinos. Para ello se realizaron cultivos primarios de astrocitos obtenidos a partir de cerebro de ratones BALB/c de 1-3 días de vida. Los mismos se estimularon durante 24 hs con B. abortus muerta por calor (HKBA), LPS de B. abortus (LPSBru) y una lipoproteína de B. abortus (Omp19), y se determinó la producción TNF α , IL-1 β e IL-6 mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Como control se utilizaron LPS de E. coli y un lipohexapéptido sintético. HKBA indujo la producción de las 3 citoquinas estudiadas de manera dosis-dependiente. LPSBru, no indujo producción de citoquinas. Sin embargo Omp19 indujo la secreción de citoquinas inflamatorias. También se determinó la capacidad de HKBA para inducir apoptosis en astrocitos. La misma fue evaluada por citometría de flujo por medio de la técnica de AnexinaV/Ioduro de Propidio, luego de 24 hs de cultivo. HKBA indujo apoptosis en astrocitos de manera dosis dependiente. Los niveles de apoptosis fueron similares a los alcanzados con un estímulo apoptótico fi-

siológico como el TNF α . Estos resultados demuestran que B. abortus es capaz de inducir citoquinas y apoptosis en astrocitos, dos de los signos característicos de la astrogliosis. También indican que las lipoproteínas serían uno de los componentes responsables de estas respuestas.

243. (320) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA LOS ANTÍGENOS Tc13 DE TRYPANOSOMA CRUZI EN UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO. GARCIA GABRIELA ANDREA, ARNAIZ MARIA ROSA, ESTEVA MÓNICA INÉS, LAUCELLA SUSANA, IBARRA SILVIA, GARAVAGLIA PATRICIA ANDREA, RUIZ ANDRÉS MARIANO

Instituto Nacional Parasitología "Dr. Mario Fatała Chaben"

Publicaciones recientes sugieren que el antígeno Tc13Tul de Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, está involucrado en desarrollo de patología. La familia Tc13 posee repeticiones EPKSA en su extremo C-terminal. Con el objeto de establecer el rol de los antígenos Tc13 in vivo, se propuso evaluar la respuesta humoral y celular contra los mismos durante la infección por T. cruzi y luego de la inmunización con el antígeno Tc13Tul recombinante. A tal efecto, se utilizaron ratones BALB/c en distintas fases de la infección o inmunizados con MBP-Tc13Tul (o MBP como control). En ratones crónicamente infectados la IgM anti-Tc13Tul fue mayor a la anti-EPKSA ($p=0.0026$). El dosaje de IgG anti-EPKSA superó al anti-Tc13Tul en la etapa aguda ($p < 0.0475$) pero ambos fueron similares en la fase crónica de la infección. Los sub-tipos predominantes fueron IgG1 e IgG2a. En la fase aguda, el 75% de los ratones tuvo IgG2a anti-EPKSA mayor que anti-Tc13Tul. En la fase crónica, el 50% de los animales no presentó IgG2a anti-EPKSA. La respuesta de DTH contra Tc13Tul fue positiva hasta los 90 dpi, mientras que EPKSA no generó respuesta. Los bazos de ratones crónicamente infectados o inmunizados con Tc13Tul no secretaron IFN-g al estimarse con Tc13Tul. Los ratones inmunizados con Tc13Tul mostraron respuesta de anticuerpos y DTH positiva contra un lisado de parásitos ($p < 0.05$) pero la parasitemia no disminuyó luego del desafío con tripomastigotes. En la inmunización con Tc13Tul no indujo cambios histológicos evidentes; no obstante, en ratones en etapa aguda de la infección previamente inmunizados se observaron infiltrados inflamatorios difusos en corazón, mientras que los grupos controles presentaron linfocitos aislados. En base a los resultados obtenidos se concluye que los antígenos Tc13 no cumplen un rol protector de la infección. El aumento de la miocarditis observado en los animales inmunizados con Tc13Tul cursando la etapa aguda de la infección reforzaría su participación en la patogénesis de la enfermedad.

244. (410) SUSTANCIAS ANTIINFLAMATORIAS DISMINUYEN EL DAÑO ENDOTELIAL INDUCIDO POR STX EN PRESENCIA DE LPS Y NEUTRÓFILOS HUMANOS. LANDONI VERÓNICA, D'ATRI PAOLA, NEGROTTO SOLEDAD, RAMOS VICTORIA, FERNÁNDEZ GABRIELA, SCHATTNER MIRTA, PALERMO MARINA, ISTURIZ MARTÍN

Academia Nacional de Medicina

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda. Típicamente, se desarrolla en niños como una enfermedad vascular luego de diarreas sanguinolentas. El SUH es causado habitualmente por bacterias Gram negativas con serotipos de Escherichia coli productores de toxinas Shiga (Stx). La presencia de Stx parece ser necesaria pero no suficiente para el desarrollo de SUH, hecho que requeriría, además, de estímulos proinflamatorios. Previamente demostramos que agentes como LPS son necesarios para inducir toxicidad endotelial dependiente de Stx, y la presencia de neutrófilos (PMN) amplifica ese daño. Esto explicaría la correlación entre el mal pronóstico en SUH y la neutrofilia aso-

ciada a la enfermedad. El objetivo de este trabajo es determinar los efectos de sustancias antiinflamatorias como IL10, IL13 y TGF β en el daño endotelial inducido por Stx en presencia de LPS y PMN. Células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) fueron pretratadas con distintas citoquinas. Luego se lavaron e incubaron 24 hs con LPS y Stx. Al final de la incubación se retiraron los estímulos y se co-cultivaron con PMN pretratados con las citoquinas. Los efectos citotóxicos sobre las HUVEC se evaluaron a las 24 hs por recuento de células con microscopio invertido (n=3). Los resultados, expresados en porcentaje de daño con respecto al control \pm SD, fueron los siguientes: HUVEC+Stx+LPS: 49 ± 2 vs HUVEC+IL10+Stx+LPS: 28 ± 3 ($p < 0.05$); (HUVEC+LPS+Stx)+PMN: 90 ± 3 vs (HUVEC+IL10+LPS+Stx)+(PMN+IL10): 34 ± 9 ($p < 0.05$). Efectos similares fueron obtenidos utilizando IL13 y TGF β . Los resultados muestran que las citoquinas antiinflamatorias son capaces de reducir el daño endotelial inducido por Stx+LPS como así también la amplificación del daño causado por PMN. En conclusión, los resultados sugieren que el control de los mecanismos inflamatorios podría ser una vía adecuada para atenuar el daño de endotelios renales que se observa en el SUH.

245. (681) CÉLULAS EPITELIALES DE PRÓSTATA HUMANA EXPRESAN TLR4 Y RESPONDEN A UN ESTÍMULO INFLAMATORIO ACTIVANDO NF-KB. GATTI GERARDO, RIVERO VIRGINIA, MACCIONI MARIANA

CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC

Trabajos previos en nuestro grupo demuestran que la línea epitelial de próstata de rata, MAT-LU, expresa TLR4 y CD14 intracelularmente y no en la superficie. Aún así, es capaz de responder al LPS, activando genes de quemoquinas, induciendo iNOS y secretando óxido nítrico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si las células epiteliales prostáticas humanas responden de forma similar a un estímulo inflamatorio clásico como es el LPS bacteriano. Con ese fin, se analizó por citometría de flujo y RT-PCR si la línea celular de próstata humana DU 145 expresa TLR4 y CD14. Pudimos observar que células DU 145 expresan los transcritos de TLR4 y CD14 y también las proteínas correspondientes a los mismos. Al ser estimuladas con LPS, las células DU 145 responden activando NF- κ B e incrementando la expresión del transcripto de IL6. Debido a que la localización de TLR4 intracelular supone una internalización del LPS para que se inicien así las señales de activación, se realizaron experimentos de captación del mismo, utilizando LPS-Alexa488 y midiendo la fluorescencia captada a distintos tiempos por citometría de flujo y microscopía. Se observó la presencia de células DU 145 y MAT-LU LPS Alexa488+ a partir de los 30 min de incubación. Cuando los mismos experimentos se realizaron en ausencia de suero bovino fetal, fuente de CD14 soluble, el porcentaje de células LPS Alexa488 + disminuyó en un 50% para ambas líneas. Futuros experimentos se diseñarán con el objetivo de conocer el sitio de reconocimiento e inicio de la señalización de LPS-TLR4 en ambas líneas epiteliales. Nuestros resultados indican que las células epiteliales prostáticas humanas, DU 145, presentan un fenotipo susceptible al LPS ya que expresan TLR4 y CD14, pudiendo así actuar como sensores tempranos en una infección.

246. (545) INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO Y TAMAÑO DE MELANOMAS MURINOS INDUCIDOS POR LA INYECCIÓN DE CÉLULAS B16/F10 ESTIMULADAS CON LPS. SIMONELLA LUCIO ESTEBAN, ANDREANI VIRGINIA, GATTI GERARDO, RIVERO VIRGINIA, MACCIONI MARIANA

CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

El rol del TLR en la tumorigénesis es todavía poco conocido. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la línea celular de adenocarcinoma prostático MAT-LU expresa TLR4 y es capaz de responder ante su ligando LPS, activando

numerosos genes de quemoquinas tales como IP10, RANTES y MIP1a, induciendo iNOS y secretando óxido nítrico. Estas células generan tumores prostáticos al ser inyectadas s.c. en ratas singénicas Copenhagen. Si las mismas son estimuladas con LPS previamente a ser inyectadas, inducen tumores cuyo crecimiento y tamaño son significativamente menores. El objetivo de este trabajo fue conocer si la estimulación vía TLR4 tiene algún efecto en el modelo de melanoma murino B16/C57BL6. Para ello, se analizó por citometría de flujo y RT-PCR si células B16/F10 expresan TLR4 y CD14. Como control de expresión y de activación, se utilizó la línea celular de macrófagos murinos RAW267. Pudimos observar que células B16/F10 expresan los transcritos de TLR4 y CD14 y también las proteínas correspondientes a los mismos, las cuales se localizan constitutivamente en el citoplasma y no en la superficie celular. Al ser estimuladas con LPS esta distribución celular no se vio modificada. En cambio, la expresión del transcripto de IL6 estudiada 6 hs post estimulación con LPS, aumentó casi 5 veces con respecto al basal. El tratamiento con LPS no alteró la viabilidad ni la proliferación de las células medidas por Azul de Trypan y por incorporación de Timidina Tritiada respectivamente. Cuando células B16 tratadas con LPS durante 48 hs fueron inyectadas s.c. en ratones C57BL6, se observó un retardo en el crecimiento y disminución en el tamaño de los tumores. Resultados preliminares sugerirían que la sobrevida de los animales portadores de tumores inducidos por células B16 tratadas con LPS se encontraría aumentada. Nuestros resultados confirman que la señalización vía TLR4 tendría un efecto inhibitorio en el posterior desarrollo del tumor.

247. (599) EFECTO DE LACTOBACILLUS CASEI EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A UN PATÓGENO OPORTUNISTA EN UN MODELO DE DESNUTRICIÓN EN RATÓN. VILLENA JULIO, RACEDO SILVIA, AGÜERO GRACIELA, ALVAREZ SUSANA

Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA-CONICET

La desnutrición es una importante causa de inmunodeficiencia y las infecciones oportunistas pueden ser severas en estos pacientes. La adición de *Lactobacillus casei* (10^9 céls/ratón-2d) a una dieta de renutrición normaliza, en 7 días, la respuesta inmune de ratones desnutridos frente a una infección neumocócica. En este trabajo estudiamos si la administración de *L. casei* (Lc) a ratones albino suizos, desnutridos por déficit proteico, mejora las defensas frente a una infección por *Candida albicans*. Ratones desnutridos fueron renutridos durante 7d con dieta balanceada sola (DB) o adicionada con Lc (10^9 céls/día/ratón). El d 8 los animales fueron desafiados por vía intraperitoneal con *C. albicans* (10^6 céls/ratón). Ratones normales (N) y desnutridos (D) fueron desafiados del mismo modo. Se midió sobrevida y, los d 1, 3 y 5 post-infección, se determinó: peso corporal; cultivo de hígado (H) y bazo; hemocultivo; recuento total y diferencial de leucocitos en sangre y activación de células fagocíticas en sangre (peroxidasa) y cavidad peritoneal (Nitro blue de tetrazolium-NBT). Las dietas de renutrición incrementaron significativamente el peso de D, (N=22,3 \pm 0,6g; D=9,2 \pm 0,6g; B=18,3 \pm 0,5g; B+Lc=21,4 \pm 0,5g). Los D fueron más susceptibles que los N a la infección (H: N=2,1 \pm 0,3UFC/g; D=6,3 \pm 0,4) y el grupo alimentado con B+Lc indujo disminución significativa ($p < 0,05$) de patógenos en órganos y en sangre (H: B=4,8 \pm 0,5; B+Lc=2,0 \pm 0,5). Sólo el grupo B+Lc mostró leucocitosis con neutrofilia similar al N en respuesta a la infección, con diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los grupos D y B (Leuc: D=5,9 \pm 0,5; B+Lc=8,3 \pm 0,6 G/l). Dicho grupo evidenció diferencias significativas en la activación de células fagocíticas con respecto a B (% NBT+: D=25,1 \pm 0,9; B=37,4 \pm 0,9; B+Lc=43,6 \pm 3,2). La sobrevida fue del 42% para D, 50% para B y 100% para B+Lc y N. De acuerdo a estos resultados la adición de *L. casei* a una dieta de renutrición normaliza la respuesta frente a *C. albicans*.

248. (652) RESPUESTA DIFERENCIAL DE LINFOCITOS B DE LA INMUNIDAD INNATA A LA ESTIMULACION VIA CD40.

MERINO MARIA CECILIA, AMEZCUA VESELY MARIA CAROLINA, ACOSTA RODRIGUEZ EVA VIRGINIA, GRUPPI ADRIANA

Dpto de Bioquímica Clínica. FCQ-UNC

La interacción CD40-CD40L ha sido involucrada en fases tardías de la respuesta inmune, protagonizada por linfocitos (Li) T activados que cooperan con LiB convencionales promoviendo su activación y el cambio de isotipo de Inmunoglobulina (Ig). En este trabajo estudiamos la respuesta de LiB que participan en la inmunidad innata (LiB1 y LiB de zona marginal (ZM)) frente a anti-CD40, evaluando como afecta la interacción CD40-CD40L a células de la respuesta humoral temprana. Observamos que LiB1 peritoneales, obtenidos por selección negativa utilizando Acs anti-Thy1.2 y anti-F4-80 adosados a perlas magnéticas, responden al estímulo con anti-CD40 (4 µg/ml, durante 48 h) con escaso incremento de IL-10, nula producción de IL-4 y no se diferencian a células plasmáticas típicas. Sin embargo secretan al cultivo niveles detectables de IgM e IgG. Interesantemente, los LiB1 se diferencian a células secretantes de anticuerpos cuando son estimulados vía TLR-4 o TLR-9 (CD5- CD19- IgM intracelular+) y consecuentemente producen niveles muy elevados de IgM. Por su parte, en trabajos previos, demostramos que LiB de ZM, obtenidos por selección positiva mediante cell sorting responden a la estimulación con anti-CD40 produciendo, respecto del basal, 10 veces más de IL-10 y tres veces más de IgM. En este trabajo demostramos que este aumento de IgM se correlaciona con un incremento en la expresión de Blimp-1, factor de transcripción involucrado en la diferenciación a célula plasmática. Posiblemente el estímulo vía CD40, sobre LiB1, otorgue señales de sobrevida que no alcanzan a diferenciar totalmente a la célula. Además observamos que, al igual que los LiB1, los LiB de ZM no responden a anti-CD40 produciendo IL-4 como sí lo hacen los LiB convencionales. En conclusión las distintas subpoblaciones de LiB maduros responden en forma diferencial a la estimulación vía CD40. La relevancia de este hallazgo in vivo es motivo de futuros estudios.

249. (478) INFECCIÓN DE CÉLULAS PROSTÁTICAS POR CHLAMYDIA MURIDARUM INDUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE TLR2 Y TLR4, SIN MODIFICAR LA EXPRESIÓN DE TLR5. MACKERN OBERTI JUAN PABLO, MACCIONI MARIANA, RIVERO VIRGINIA E.

Inmunología, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

La prostatitis es una enfermedad urológica muy común causada por infecciones ascendentes. Hasta el presente poco se conoce respecto a cómo la próstata responde a una infección por Chlamydia spp. Estudios recientes han indicado que los receptores tipo TOLL reconocen componentes microbianos manteniendo un rol fundamental en la iniciación de la respuesta inmune. Previamente hemos reportado que Chlamydia muridarum (Cm) es capaz de infectar y activar células epiteliales prostáticas (CEP) de rata las cuales responden secretando mediadores inflamatorios. El objetivo de este trabajo es evaluar si la infección con esta bacteria induce cambios en la expresión de TLR4 y TLR2 y TLR5. Para cumplimentar este objetivo utilizamos la línea de CEP MAT-LU y cultivos primarios de CEP obtenidos en nuestro laboratorio siguiendo protocolos ya descriptos. Al realizar estudios de microscopía confocal utilizando anticuerpos anti TLR2, TLR4, TLR5 y anti LPS chlamydial en células infectadas y no infectadas observamos un incremento en la expresión de los receptores TLR2 y TLR4 en las células infectadas y principalmente en las vecindades de la inclusión chlamydial (IC). Cuando evaluamos MyD88 observamos que también se encuentra relacionada a la IC suponiendo un activo rol en el señalamiento. Al evaluar la expresión de TLR5 (receptor no relacionados a componentes presentes en Cm hasta el presente), observamos una distribución supranuclear en células no infectadas que se mantuvo invariable en células infectadas. Como conclusión podemos afirmar que CEP incrementan la expresión de TLR4 y TLR2 en las vecindades de la IC y con esto reconocerían PAMPs chlamydiales. La falta de cam-

bios a nivel de la expresión de TLR5 refuerza la hipótesis de que algunos de los TLRs más involucrados a la infección por Chlamydia (TLR4, TLR2) serían reclutados en la vecindad de la inclusión, sugiriendo que estos TLRs podrían estar involucrados en la señalización activa desde esta localización intracelular.

250. (198) ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA TOLERANCIA AL LIPOPOLISACÁRIDO SOBRE LOS NEUTRÓFILOS PERIFÉRICOS. LOPEZ MARIA FLORENCIA, RAMOS MARÍA V., LANDONI VERÓNICA I., FERNÁNDEZ-BRANDO ROMINA J., BENTANCOR LETICIA V., REARTE BÁRBARA, ISTURIZ MARTÍN A., PALERMO MARINA S., FERNÁNDEZ GABRIELA C.

División Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

La tolerancia al LPS consiste en una hiporespuesta asociada a una incapacidad de los macrófagos de producir citoquinas, y es causada por la exposición a dosis bajas y repetidas de esta misma molécula. Aquí investigamos los efectos de la tolerancia al LPS sobre los PMN. Para ello, ratones recibieron 4 dosis diarias de 5 µg/ratón LPS (0, 24, 48 y 72h, tol, n=12) o salina (norm, n=12), y luego ambos grupos fueron desafiados con 100 µg/ratón de LPS (tol des y norm des). El número de PMN en periferia justo antes y 2h después de cada inoculación se determinó por recuento diferencial y la expresión de la molécula de adhesión CD11b por citometría de flujo. Los ratones normales presentaron un aumento del número de PMN luego de cada inyección con salina asociado al estrés de la inoculación. Luego de 2h de la 1° dosis de LPS el número de PMN disminuyó, con un posterior rebote (neutrofilia) 24h más tarde. Luego de la 2° dosis de LPS (26h) también se observó neutropenia y posterior neutrofilia, pero las posteriores dosis no provocaron variaciones en el número de PMN (PMN/mm³: 0h: norm = 1019±146, tol = 1231±141; 2h: norm = 2341±369, tol = 350±159*; 24h: norm = 1275±242, tol = 2720±511*; 26h: norm = 2465±496, tol = 1045±156*; 48h: norm = 1342±241, tol = 2175±539*; 50h: norm = 2133±305, tol = 1850±391; 72h: norm = 1096±139, tol = 1292±152; 74h: norm = 1975±325, tol = 1053±145; *p< 0.05 vs norm). El desafío con LPS provocó neutropenia en los animales normales pero no en los tolerantes (PMN/mm³: norm des = 435±101, tol des = 1069±208#, #p< 0.05 vs norm des). En los tolerantes la expresión del CD11b en los PMN resultó menor a la de los normales (intensidad media de fluorescencia (IMF): norm=316±16, tol=189±22*, *p< 0.05 vs norm). Luego del desafío, la expresión del CD11b aumentó 2.5 veces en los animales normales y sólo 1.6 veces en los tolerantes (norm des=798±134*, tol des=305±247#, *p< 0.05 vs norm, †p< 0.05 vs tol, #p< 0.05 vs norm des). En un experimento preliminar observamos que el desafío con LPS indujo un estallido respiratorio menor en los animales tolerantes respecto al observado en los normales. El fenómeno de tolerancia al LPS no sólo afecta a los macrófagos, sino también a los PMN.

251. (96) EFECTO DE LA INTERLEUQUINA 10 (IL-10) SOBRE LA ACTIVACIÓN MEDIADA POR EL LIPOPOLISACÁRIDO EN NEUTRÓFILOS HUMANOS. FERNÁNDEZ GABRIELA CRISTINA, LANDONI VERÓNICA I., LÓPEZ MARÍA F., RAMOS MARÍA V., BENTANCOR LETICIA V., FERNÁNDEZ-BRANDO ROMINA J., ISTURIZ MARTÍN A., PALERMO MARINA S.

División Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

Los PMN son cruciales en procesos inflamatorios pero su excesiva activación puede provocar daño endotelial y tisular. Las citoquinas anti-inflamatorias constituyen un mecanismo de freno de la respuesta inflamatoria. Aquí determinamos los efectos de la IL-10 en la respuesta de PMN humanos al LPS (n=10). Los PMN fueron preincubados con medio, LPS (1 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml) y LPS+IL-10. Luego de 18 hs fueron tratados por 2 hs adicionales con LPS (100 ng/ml). La expresión de las moléculas CD11b,

CD66b y la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) fueron medidos por citometría de flujo y la producción de TNF- α usando las células L929. Los resultados fueron expresados considerando 100% al valor obtenido en las células sin tratar (basal). La preincubación con LPS produjo un aumento en todos los parámetros medidos. La IL-10 por sí misma no indujo variaciones respecto del basal pero disminuyó la activación mediada por el LPS (CD11b: LPS=179.6 \pm 16.1, IL-10+LPS=154.0 \pm 14.5*; CD66b: LPS=220.0 \pm 25.3, IL-10+LPS=136.1 \pm 10.1*; IROs: LPS=167.9 \pm 26.2, IL-10+LPS=93.0 \pm 12.4*; TNF- α LPS=121.0 \pm 4.3, IL-10+LPS=100.3 \pm 3.2*; *p< 0.05 vs LPS). La segunda exposición al LPS indujo un aumento de los parámetros medidos en los PMN sin tratar (medio/LPS) y un aumento aún mayor en los pretratados con LPS (LPS/LPS, efecto priming). La IL-10 sola arrojó valores similares a medio/LPS, pero la preincubación con LPS+IL-10 (LPS+IL-10/LPS) anuló el efecto priming del LPS (CD11b: medio/LPS=235.1 \pm 12.7*, LPS/LPS=289.5 \pm 13.6* \S , LPS+IL-10/LPS= 255.5 \pm 15.4* $\#$; CD66b: medio/LPS=243.8 \pm 25.8, LPS/LPS= 442.0 \pm 30.0* \S , LPS+IL-10/LPS=309.0 \pm 44.4* $\#$; IROs: medio/LPS= 279.6 \pm 58.0, LPS/LPS=376.2 \pm 59.8* \S , LPS+IL-10/LPS= 245.5 \pm 55.4* $\#$; TNF- α : medio/LPS=112.7 \pm 5.2, LPS/LPS= 132.0 \pm 6.7* \S , LPS+IL-10/LPS=100.2 \pm 4.5* $\#$; *p< 0.05 vs 1° dosis LPS, \S p< 0.05 vs medio/LPS, $\#$ p< 0.05 vs LPS/LPS). La IL-10 inhibe parcialmente la activación inducida por el LPS y anula el efecto priming asociado a una segunda exposición al LPS.

252. (711) LA RESPUESTA INMUNE A LA LUMAZINA SINTETASA DE BRUCELLA ABORTUS ES MODULADA POR EL RECEPTOR DE INMUNIDAD INNATA TLR4. BERGUER PAULA (1), MUNDIÑANO JULIANA (2), PIAZZON ISABEL (2), GOLDBAUM FERNANDO (1)

(1) *Laboratorio de Inmunología Estructural y Molecular, Fundación Instituto Leloir.* (2) *ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina.*

BLS es una proteína altamente inmunogénica. Demostramos que activa células dendríticas in vitro induciendo el aumento de moléculas coestimuladoras, la secreción de citoquinas proinflamatorias y los ARNm de quemoquinas, siendo estos efectos dependientes de TLR4. El objetivo de este trabajo es analizar las alteraciones inducidas in vivo por BLS en el sistema inmune y su dependencia de TLR4. Se inocularon ratones BALB/c y C.3H/4Jps-d (LPSd) –que no expresan un TLR4 funcional– con 50mg de BLS en la almohadilla plantar derecha y PBS en la izquierda. Los resultados se expresan como media \pm SD (n=6). En BALB/c BLS indujo aumentos significativos en el n° de células en el ganglio poplíteo drenante a las 24h (6.5 \pm 0.2vs2.7 \pm 0.6 x10⁶). Mediante citometría de flujo encontramos aumentados significativamente los % de células dendríticas, de linfocitos B y CD8+ (CD11c+: 5.7 \pm 1.2vs3.1 \pm 1.1; CD19+:2 9.4 \pm 3.2vs24.1 \pm 3.3; CD8+: 22.0 \pm 1.6vs18.2 \pm 0.8) y los % de linfocitos B y CD8+ activados (CD69+/CD19+:58.3 \pm 7.8vs17.0 \pm 0.9; CD69+/CD8+:-9.8 \pm 0.4 vs 4.8 \pm 1.0). Ninguno de estos eventos fue observado en ratones LPSd, determinando así su dependencia de TLR4. A las 48h se obtuvieron resultados similares, observándose además aumentos en el %CD44hi/CD8+ en BALB/c (38.2 \pm 1.9vs26.1 \pm 1.5) y no en LPSd. Se analizó por RT-PCR semicuantitativa el nivel de ARNm de IL-4 en ganglios poplíteos de BALB/c y LPSd a las 48h, encontrándose niveles significativamente mayores en LPSd. Al estudiar la respuesta humoral en LPSd inoculados ip con 100mg de BLS se encontró un alto título de IgG anti-BLS, similar al de BALB/c. Sin embargo, la relación de títulos IgG1/IgG2a anti-BLS resultó mayor en LPSd que en BALB/c (8 \pm 0.8vs2 \pm 0.5) sugiriendo un mayor predominio de respuesta TH2 en ausencia de TLR4 funcional. Los resultados indican que BLS induce importantes alteraciones en células dendríticas, linfocitos B y CD8+ dependientes de TLR4. La falta de un TLR4 funcional aumenta parámetros característicos de respuestas TH2 frente a BLS.

253. (657) CRUZIPAÍNA, UN ANTÍGENO INMUNODOMINANTE DEL TRYPANOSOMA CRUZI, INDUCE EL ESTALLIDO

RESPIRATORIO E INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE TLR2 EN ESPLENOCITOS DE RATONES C57BL/6. GUIÑAZÚ NATALIA, BECERRA CECILIA, PELLEGRINI ANDREA, CARRERA-SILVA ANTONIO, CANO ROXANA, ALBESA INES, GEA SUSANA

CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, UNC

Previamente reportamos que la inmunización con cruzipaina (Cz), desprovista de actividad enzimática, induce en la cepa C57BL/6 (B6) un perfil Th1 con activación clásica de macrófagos, mecanismo que controla la infección parasitaria. Considerando que las especies reactivas del oxígeno (ROS) y receptores de la inmunidad innata como los tipo toll (TLRs) son claves en la defensa contra parásitos, estudiamos si Cz es capaz de inducir el estallido respiratorio y la expresión de TLR2 y/o TLR4 en células totales de bazo (CTB). Se utilizaron ratones B6 inmunizados con Cz+CFA (GI), OVA+CFA (GC) y normales (GN). El estudio de la producción de ROS por quimioluminiscencia utilizando luminol reveló que Cz exógena induce el estallido respiratorio en CTB obtenidas en fresco de todos los grupos de ratones, GN: 24.65 \pm 2.01; GC: 28.23 \pm 1.73; GI: 31.41 \pm 2.28 unidades relativas de luz (URL). Los valores basales con luminol fueron GN: 3.23 \pm 0.45; GC: 6.81 \pm 1.62; GI: 9.58 \pm 1.5 URL. Cuando CTB fueron estimuladas por 2h con Cz se observó un aumento en la producción de ROS (relación URL Cz/medio) de 8,3 veces para el GI y 6,6 veces para el GC. La co-incubación con superóxido dismutasa, catalasa o L-NMMA disminuyó parcialmente la producción de ROS, mientras que el agregado de tirón -scavenger del anión superóxido- la neutralizó totalmente. Además, se observó por citometría de flujo un incremento en el porcentaje de esplenocitos TLR2+ en el GI luego de la estimulación con Cz vs medio, 27 \pm 2 vs 15 \pm 2% (p< 0.05) y en células F4/80+ TLR2+, 83 \pm 1 vs 57 \pm 4% (p< 0.05). Se reveló por Western blot un aumento de TLR2 a las 24h post cultivo con Cz mientras que la expresión de TLR4 no sufrió cambios significativos en los tiempos estudiados. En conclusión, Cz induce la producción de ROS en CTB de todos los grupos estudiados y favorece la expresión de TLR2 en esplenocitos del GI. Este receptor potenciaría el estallido respiratorio y sería un eslabón entre la inmunidad innata y adaptativa.

254. (721) EL BENZNIDAZOL REGULA EN FORMA DIFERENTE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN MACRÓFAGOS DE LA LÍNEA RAW 264.7. RUFFINO JUAN PABLO (1), REVELLI SILVIA (1), SERRA ESTEBAN (2), PASCUTTI MARÍA FERNANDA (1) (2)

Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR (1). IBR-CONICET, Fac. de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR (2).

El BZL se utiliza actualmente como parasiticida en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. En trabajos previos, hemos demostrado que este compuesto posee además actividad antiinflamatoria al inhibir la producción de mediadores como NO, IL-6 e IL-1 β , inducida por LPS en la línea de macrófagos murinos RAW 264.7. En dicho trabajo, las células se incubaron en forma simultánea con BZL y LPS. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el efecto inhibitorio del BZL también se extiende a otras funciones efectoras del macrófago. Primero estudiamos en mayor profundidad el efecto del BZL sobre la producción de NO. Para ello, células RAW 264.7 se incubaron con BZL en concentraciones de 5 μ M a 1 mM durante 2 y 24 hs y luego se estimularon con LPS. Como control se incubaron las células con BZL y LPS en forma simultánea. La producción de NO se evaluó por el método de Griess en los sobrenadantes (SN) de cultivo a las 24 hs. Se observó que el BZL inhibió la producción de NO inducida por LPS en forma dosis-dependiente en los tres casos. Conc. nitrato (μ M) en SN de células pre-tratadas con BZL durante 24 hs (media \pm d.s., n=3): Control= 2.2 \pm 0.2; LPS=78.4 \pm 5.0; LPS+BZL 0.1 mM=30.2 \pm 0.9; LPS+BZL 1mM=19.0 \pm 2.0. Luego se estudió el efec-

to del BZL sobre la producción de superóxido (O₂⁻). Las células se incubaron con BZL 0.1 y 1 mM durante 2 y 24 hs o en forma simultánea y fueron estimuladas con PMA o Zymosan opsonizado durante 2 hs. La producción de O₂⁻ se evaluó por reducción de NBT. La estimulación con los inductores llevó a un aumento de 3 a 5 veces en la reducción de NBT, y en ningún caso el tratamiento con BZL modificó estos niveles. Células pre-tratadas 2 hs con BZL y estimuladas con PMA (DO a 630 nm, media±d.s., n=3): Control= 0.22±0.00; PMA=0.94±0.02; PMA+BZL 0.1 mM=1.04±0.05; LPS+BZL 1mM=0.92±0.04. Los resultados muestran que el BZL inhibe la producción de NO pero no la de ERO en las células RAW 264.7, probablemente a través de la inhibición de NF-κB.

255. (726) LOCALIZACION DIFERENCIAL DE LIGANDOS DE GALECTINAS EN MUCOSA DE INTESTINO DELGADO HUMANO. MERCER NATALIA, REY MARIA, TOSCANO MARTA, DRUT RICARDO, RABINOVICH GABRIEL, DO-CENA GUILLERMO

LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Ciudad de Buenos Aires Servicio de Patología, Hospital de Niños "Sor María Ludovica", La Plata

Las galectinas constituyen una familia de proteínas capaces de reconocer ligandos glucídicos en la superficie de diversos tipos celulares y en la matriz extracelular. Se ha encontrado que este proceso está involucrado en la homeostasis de la respuesta inmune e inflamatoria. Considerando los efectos anti-inflamatorios de galectina-1 especulamos que podría intervenir en la homeostasis de la respuesta inmune en la mucosa intestinal en condiciones fisiológicas y patológicas. Con el objetivo de estudiar el estado de glicosilación y los sitios de unión a galectinas en la mucosa del intestino delgado, se investigó la reactividad de lectinas de plantas (PNA y SNA) y galectina-1 en la mucosa de intestino delgado. Se seleccionaron 12 biopsias: 6 intestino delgado con conservación de la relación vellosidad/cripta (normales) y 6 con relación vellosidad/cripta < 0,5 (enteropatía grado IV, celíacos). Por aplicación de las técnicas de lectin-histoquímica e IHQ se observó para gal-1 reactividad en el citoplasma de células plasmáticas y neutrófilos de la lámina propia en ambos grupos, con mayor número de células positivas en los celíacos (9.2 ±1,6 vs. 26 ± 1,7 células/campo, p< 0,05). PNA mostró reactividad en grumos supranucleares en los enterocitos en ambos grupos y en el citoplasma de histiocitos de la lámina propia de celíacos (12 ± 3,6 vs. 18.5 ± 2,4 células/campo, p< 0,05). SNA mostró reactividad en el polo apical de los enterocitos y en el mucus de las células caliciformes en ambos grupos. Además, en el caso de los pacientes celíacos también se encontró un incremento del 50% en el número de células CD45RO positivas (p< 0,05). En conclusión, se detectaron ligandos para gal-1, PNA y SNA en diferentes tipos celulares y se observó una correlación con el incremento de elementos linfoplasmocitarios en las muestras patológicas. Esta metodología podría constituir una herramienta útil para caracterizar el fenotipo de la mucosa intestinal en base a la distribución de ligandos de lectinas.

256. (359) SLAM: MARCADOR DIFERENCIAL EN LA ENFERMEDAD CELÍACA ACTIVA. GUILLEN LAURA, PERIOLO NATALIA (1), BARBOZA MARCOS (1), NIVELONI SONIA (2), MORENO MARIA LAURA (2), MAURIÑO EDUARDO(2), BAI JULIO (2), CHERŃAVSKY ALEJANDRA(1)

División de Inmunogenética. Hospital de Clínicas(1) Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo (2)

Introducción: La enfermedad celíaca (EC) está mediada por linfocitos T (LT) efectores y de memoria que involucra principalmente un componente autoinmune humoral T-dependiente. SLAM (molécula de señalización y activación linfocitaria) se expresa constitutivamente en LT memoria (CD45RO+). La presencia o ausencia de SAP (proteína asociada a SLAM) es un factor que modula el balance Th1/Th2. El sistema SLAM/SAP está alterado en diversas patologías autoinmunes. Objetivos: Estudiar la pobla-

ción periférica de memoria (LTCD3+CD45RO+) en pacientes celíacos (Cel) y controles (Co), y caracterizar posibles subpoblaciones en base a la expresión diferencial de SLAM. Materiales/ Métodos: Por criterios serológicos e histológicos incluimos individuos adultos: 14 Co con trastornos intestinales excluyendo EC, y 10 pacientes Cel. Obtuvimos células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por Ficoll-Hypaque a partir de 10 ml de sangre heparinizada. Por citometría de flujo, se evaluó la expresión de SLAM en la subpoblación de LT de memoria (CD3+CD45RO+) en condiciones basales. Para el análisis estadístico utilizamos el test de Mann-Whitney. Resultados Los Cel presentaron mayor porcentaje de LTCD3+CD45RO+(p<0.0010). Confirmamos que SLAM se expresa exclusivamente en LTCD45RO+ en Cel (13.52% CD3+SLAM+, 14.33%CD45RO+SLAM+) y en Co (18.14% CD3+SLAM+, 19.08% CD45RO+SLAM+). La expresión de SLAM (LTCD3+CD45RO+) es significativamente menor en Cel vs Co (p=0.0079). Conclusiones: SLAM permite distinguir dos subpoblaciones de memoria periférica y puede ser considerado un marcador diferencial en EC activa. Deberá confirmarse si la disminución de la subpoblación CD3+SLAM+ en compartimiento periférico se correlaciona con su localización diferencial en el ID.

257. (330) EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA CD30 EN LA ENFERMEDAD CELÍACA ACTIVA PERIOLO NATALIA (1), GUILLÉN LAURA (1), NIVELONI SONIA (2), MORENO MARÍA LAURA (2), MAURIÑO EDUARDO (2), BAI JULIO (2), CHERŃAVSKY ALEJANDRA (1)

División de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. (1) Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo. (2)

Introducción: El antígeno CD30, miembro de la familia del receptor de TNF-α es una molécula coestimuladora que se expresa luego de la activación de linfocitos T (LT) αβ y γδ de memoria. Funciona como regulador fisiológico del balance Th1/Th2, y en el mantenimiento de la memoria en LT. Se desconoce su participación en la enfermedad celíaca (EC), patología autoinmune multisistémica mediada por LT. Objetivo: evaluar la expresión de CD30 en el principal órgano blanco de la EC (intestino delgado: ID), y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en celíacos activos (Cel) y controles (Co). Materiales/ Métodos: por criterios serológicos e histológicos incluimos individuos adultos: 10 pacientes Cel, y 10 Co con trastornos intestinales excluyendo EC. Obtuvimos CMSP por Ficoll-Hypaque a partir de 10 ml de sangre heparinizada. Por citometría de flujo, se evaluó utilizando anticuerpos monoclonales específicos, la expresión de CD30 en subpoblaciones de L T (CD3+): en células de memoria (CD45RO+) y activadas (CD25+), en condiciones basales y durante 5 días post-estimulación inespecífica con anti-CD3. Para el análisis estadístico utilizamos el test de Mann-Whitney. Por inmunohistoquímica analizamos biopsias de ID (secciones finas) de 4 Cel y 6 Co con anticuerpo anti-CD30. Resultados: En estado basal, un mayor porcentaje de LTCD3+CD45RO+ en Cel (p < 0.0010 vs. Co) no se acompaña de una mayor activación de LT (LTCD3+CD25+) ni se detecta expresión de CD30. En Cel y Co anti-CD3 induce la máxima expresión de CD30 luego de 3 días de activación(LTCD3+CD45RO+CD30+ y LTCD3+CD25+CD30+, p=ns) que luego de 5 días se mantuvo sólo en Cel (LTCD3+CD45RO+CD30+, p=0.0238, LTCD3+CD25+CD30+, p=0.0025). Detectamos linfocitos de lámina propia CD30+ tanto en Cel como Co. Conclusiones: CD30 es un marcador diferencial de la EC en CMSP pero no en el ID. Su función permitiría correlacionarlo con el desbalance Th1/Th2 característico de la EC.

258. (116) ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE LUEGO DE LA INMUNIZACIÓN CON VACUNA DTPW EN RATONES BALB/C PRE-TRATADOS CON E. FAECALIS CECT7121. CASTRO MARISA (1), MOLINA MATÍAS (1), CECI MÓNICA (2), SPARO MÓNICA (2), MANGHI MARCELA (1)

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr. Ricardo Margni / Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (1) Centro de Estudios Bioquímicos, Tandil (2)

Las bacterias que impactan al sistema inmune estimulando la producción de citoquinas han sido propuestas como inmunomoduladoras. En nuestro laboratorio se estudia a *Enterococcus faecalis* CECT7121, una cepa no patógena que es segura para el consumo, que luego de su administración intragástrica (ig) coloniza el tracto intestinal de ratones BALB/c, y que estimula en los macrófagos peritoneales en cultivo la producción de IL-12, IL-6 e IL-10. En este trabajo se estudió el efecto adyuvante e inmunomodulador de *E. faecalis* CECT7121 sobre la respuesta generada por inmunización con la vacuna DTPw. Grupos de ratones BALB/c (n:5, 8 sem.) fueron pretratados o no (ig) con *E. faecalis* CECT7121 (3.10e8 UFC/ml, 200 ul) los días -3, -2, -1 y nuevamente los días 13, 14 y 15. Los días 0, 7 y 21 ambos grupos de animales (control y pretratados) fueron inmunizados (sc) con DTPw. Dos grupos no inmunizados, pretratado o no (ig) con *E. faecalis* CECT7121, fueron agregados al estudio. Se analizó: implantación de *E. faecalis* CECT7121 en intestino, nivel de anticuerpos anti-tetánicos y anti-diftéricos (ELISA), proliferación de células de bazo (incorporación de ³H Timidina) y presencia de citoquinas INFg, IL-5, IL-6 e IL-12 en los sobrenadantes de cultivo (ELISA) luego de estímulos con toxoides diftérico y tetánico. En los animales pre-tratados con *E. faecalis* CECT7121 e inmunizados (Ei/DTPw), tanto los niveles de proliferación específica como los de INFg e IL-6 fueron mayores que en los animales no tratados (SF/DTPw) (p< 0.05). No se observó diferencia significativa en los niveles de IL-5 e IL-12. Tampoco se observaron variaciones significativas en los niveles de anticuerpos anti-tetánicos y antidiftéricos totales ni en la relación IgG1/IgG2a. Los grupos no inmunizados mostraron niveles similares al basal en todos los parámetros. Nuestros resultados ponen en evidencia que *E. faecalis* CECT7121 tiene efecto adyuvante y actúa como modulador pro-Th1 de la respuesta antitetánica y antidiftérica.

259. (569) RESPUESTA TEMPRANA A LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE CPG EN LOS TEJIDOS LINFÁTICOS ASOCIADOS A LA MUCOSA INTESTINAL. ALIGNANI DIEGO, MALETTO BELKYS, LISCOVSKY MIRIAM, RANOCCHIA ROMINA, GORLINO CAROLINA, MORÓN GABRIEL, PISTORESÍ MARÍA CRISTINA

CIBICI. Facultad de Ciencias Químicas. UNC

CpG, administrado por vía oral, es un efectivo adyuvante inductor de respuesta inmune Th1. Sin embargo, los efectos tempranos producidos por CpG en la mucosa intestinal, que son determinantes en el resultado final de la inmunización por vía oral, no han sido descriptos. Por ello, nuestro objetivo es estudiar el comportamiento de las diferentes poblaciones celulares en tejidos linfáticos asociados a la mucosa intestinal a tiempos cortos después de la administración oral de CpG en ratones BALB/c. Luego de 24 horas de la administración de CpG, y la posterior estimulación in vitro con CpG, se observa un aumento en la secreción de IL12 (pg/ml) en: Placas de Peyer (PP)(PBS: 4536±360; CpG: 6622±540), y ganglios linfáticos mesentéricos (GM) (PBS: 2066±230; CpG: 3277±320). Además, se encontró un aumento en la celularidad en PP (PBS:0,73±0,04, CpG:1,6±0,5 (x10⁶ cel)) pero no en GM. Mediante citometría de flujo, encontramos que la administración de CpG indujo un ligero aumento en el porcentaje de linfocitos B de GM respecto al grupo que recibió PBS (21% vs 16%), acompañado de un incremento en la expresión de CD86 (MFI: 13 PBS vs. 21 CpG) y MHC-II (MFI: 471 PBS vs. 650 CpG). También se observó un aumento en el porcentaje de células dendríticas CD11c+ CD8á low CD11b+ en los animales que recibieron CpG respecto al grupo PBS (74±2% vs. 62±4%) y una disminución en el porcentaje de células CD11c+ CD8á+ CD11b low (25±1% vs. 32±1%), acompañado de un incremento en la expresión de CD86 en la población de células CD11c+. Nuestros resultados indican que la administración oral de CpG induce la movilización y activación de linfocitos B y células dendríticas CD11c+ CD8á low CD11b+ en ganglios mesentéricos. Estos estudios nos permiten comenzar a establecer las bases celulares de la acción de CpG como adyuvante a nivel de la mucosa intestinal.

260. (577) DETECCIÓN DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE QUIMOQUINAS EN EPITELIO INTESTINAL ABSORPTIVO Y EPITELIO ASOCIADO A FOLÍCULOS EMPLEANDO MICROSCOPIA DE DISECCIÓN. RUMBO MARTIN, SIRARD JEAN CLAUDE

LISIN Facultad de Ciencias Exactas, UNLP Institut Pasteur Lille, France

La homeostasis del sistema inmune de mucosas es mantenida por una compleja serie de interacciones, siendo crítica la precisa distribución histológica de distintas poblaciones del sistema inmune. El epitelio intestinal es capaz de producir distintas quimoquinas y mediadores de la respuesta inmune. Su producción en distintas regiones del epitelio intestinal es presumiblemente diferente, sin embargo ha sido poco documentada. Nuestro objetivo fue analizar la expresión de quimoquinas por el epitelio intestinal en el eje cripta-vellosidad y en epitelio asociado a folículos (FAE). Se analizaron ratones BALB/C hembras de 5 a 7 semanas de edad. Se seleccionaron distintas regiones del epitelio absorptivo (criptas y vellosidades) o del FAE empleando un microscopio de disección Leica DM-LB siguiendo un protocolo optimizado para preservar la integridad del RNA. Se obtuvo el RNA total y se determinaron los niveles de expresión por RT y PCR en tiempo real. Como tejido no epitelial se analizaron folículos de las Placas de Peyer (FPP). Los genes analizados mostraron distinto patrón de expresión. CX3CL1 y CCL15 mostraron una expresión en tejido epitelial (FAE, cripta y vellosidad) entre 15 y 25 veces superior a la observada en folículo linfoide. CCL25 mostró aumento de expresión en criptas y FAE de alrededor de 30 veces con respecto a su expresión en FPP, siendo indetectable en el epitelio vellositario. CXCL12 se expresa en forma detectable en epitelio vellocitario y en FPP. Entre los genes expresados exclusivamente en una región se encuentran CCL20 y CCL9 (FAE, incremento de 52 ± 8 y 21,2 ± 3,8 veces respectivamente), B-defensina 1 y (cripta, incremento de 1200±300 veces) y CXCL13 (FPP, incremento de 25,4±3,0 veces) siendo baja o indetectable en otras regiones. El epitelio juega un papel en el reclutamiento diferencial de poblaciones de células a distintos sitios histológicos contribuyendo al normal funcionamiento del sistema inmune de mucosas.

261. (287) CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TOLEROGÉNICA DE UN POLISACÁRIDO EN NÓDULOS LINFOIDES MESENTÉRICOS: SUBPOBLACIONES Y CITOQUINAS. PORPORATTO CARINA, CANALI MARÍA MAGDALENA, CORREA SILVIA GRACIELA

CIBICI-CONICET. Inmunología. Dpto Bioquímica Clínica. Fac. Cs. Químicas. Univ. Nac. de Córdoba

La inmunidad intestinal tiene la característica única de desarrollar continuamente tolerancia oral hacia antígenos de la dieta y la flora comensal. En la inducción de este fenómeno natural es esencial el microambiente de los nódulos linfoides mesentéricos (NLM) participando además poblaciones de células dendríticas (CD) inmaduras, células regulatorias y citoquinas. Mientras que la tolerancia hacia antígenos proteicos ha sido ampliamente estudiada, la respuesta intestinal hacia polisacáridos biocompatibles abundantes en la naturaleza, no ha sido caracterizada aun. Nuestro objetivo fue estudiar en NLM los eventos que ocurren luego de la administración oral, a ratas Wistar, de 1, 3 y 5 mg de Quitosano (Q), un polisacárido utilizado como transportador de proteínas y péptidos en mucosas. Al cabo de 16 hs de la ingesta observamos un aumento dosis dependiente en el % de células CMH clase II+ CD103+ CD4+ y CMH clase II+ CD103+ CD4- (p< 0.05), en tanto que la población de CD CD103+ mostró una incrementada producción de IL10 ex vivo (p< 0.05) (FACS). El efecto de la ingesta de Q sobre células T de NLM se evaluó en cultivos estimulados con 5 µg/ml de ConA luego de la tinción con CFSE (FACS) encontrándose una menor proliferación (p< 0.05) y una reducción del 10 al 30% en los niveles de IFNγ en sobrenadantes de cultivo (p< 0.05). Por otra parte, la administración de Q por 5 días previos a la ingesta de un antígeno proteico

(colágeno tipo II) se asoció a un significativo incremento en la población de células T CD4+CD25+CTLA-4+ en NLM ($p < 0.05$). El aumento en subpoblaciones de CD y la mayor producción de citoquinas regulatorias se asocia a una supresión en la capacidad proliferativa de células T en NLM y a una menor producción de citoquinas inflamatorias. Estos eventos contribuirían al incremento en poblaciones regulatorias observada luego de la ingesta de un antígeno proteico, lo cual favorecería la inducción de tolerancia oral en NLM.

ENDOCRINOLOGÍA III

- 262. (85) ¿POR QUÉ LOS PERTURBADORES ENDOCRINOS PUEDEN PRODUCIR EFECTOS CONTRARIOS DE ACUERDO A LA DOSIS? ACCIÓN DEL BISFENOL A SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA HIPOTALÁMICO.** MONJE LUCAS, VARAYOUD JORGELINA, MUÑOZ-DE-TORO MÓNICA, LUQUE ENRIQUE H., RAMOS JORGE G.

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

El BPA es un perturbador endocrino con actividad estrogénica de amplia distribución en el medioambiente. Nos propusimos investigar los mecanismos transcripcionales que median la alteración de la expresión del REa en el hipotálamo de hembras expuestas al BPA. Crías hembras se inyectaron vía sc con aceite (control), 20mg/kg (BPA20) y 0.05mg/kg (BPA05) de BPA desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta DPN7 y se sacrificaron los DPN8 y 21. Por real-time PCR se determinó la abundancia relativa de transcritos provenientes de los promotores OS, ON, O, OT, E1 y el ARNm total del gen del REa en el hipotálamo anterior. Además en DPN21 se evaluó estradiol sérico por RIA y el patrón de metilación de los promotores activos del gen del REa por análisis de restricción de ADN bisulfitado. En todos los grupos los promotores activos fueron el O, OT y E1. En DPN8 la dosis alta de BPA (BPA20) disminuyó la transcripción del REa ($p < 0.001$) mientras que la dosis baja (BPA05) la aumentó ($p < 0.05$). La menor transcripción del REa observada en los animales BPA20 se debió al silenciamiento parcial de los promotores O y OT, mientras que el aumento del ARNm del REa en las ratas BPA05 se debió a un aumento de la actividad del promotor E1 ($p < 0.05$). Dos semanas después de finalizada la exposición al BPA (DPN21) ambos grupos tratados presentaron un aumento en la transcripción del REa a través de un incremento de la actividad de los promotores O y OT ($p < 0.01$). No se detectaron cambios en los patrones de metilación en ninguno de los promotores activos estudiados ni en los niveles séricos de estradiol. Este trabajo demuestra que el BPA activa distintos promotores de un gen estrogénico-sensible de acuerdo a la dosis de exposición y al momento en que se realiza la evaluación. Este podría ser un mecanismo válido para explicar los diferentes y muchas veces contradictorios efectos reportados en la literatura sobre la actividad de los perturbadores endocrinos en dosis altas y bajas.

- 263. (87) DESARROLLO DE UN TEST DE ALTA SENSIBILIDAD PARA LA DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ESTROGÉNICA IN VIVO DE PERTURBADORES ENDOCRINOS.** RAMOS JORGE G., VARAYOUD JORGELINA, MONJE LUCAS, BOSQUIAZZO VERÓNICA L., DURANDO MILENA, LOWER MELINA, SANTAMBROSIO NOELIA, BERNHARDT TANIA, MUÑOZ-DE-TORO MÓNICA, LUQUE ENRIQUE H.

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

La necesidad de desarrollar ensayos biológicos in vivo para detectar actividad hormonal de sustancias químicas se ha incrementado en los últimos años debido a la alta exposición de los animales y el hombre a perturbadores endocrinos (PEs). El objetivo del presente trabajo es desarrollar un test molecular ba-

sado en PCR competitiva para la detección de actividad estrogénica in vivo de PEs. Dicho test se basa en la detección de cambios en la transcripción de genes estrogénico-sensibles en útero de ratas expuestas a sustancias hormonalmente activas. Ratas adultas ovariectomizadas fueron inyectadas (sc) durante 3 días con: aceite de maíz (vehículo); 17 β estradiol (E2) (20 ug/kg), el polimerizante bisfenol A (BPA) (200 mg/kg) y el plaguicida endosulfán (ENDO) (6 mg/kg). Cuatro horas después de la última inyección se extrajo el útero y se determinó: 1- el peso húmedo (ensayo uterótico clásico para evaluar actividad estrogénica), 2- la expresión del gen estrogénico-sensible vascular endothelial growth factor (VEGF) mediante RT-PCR competitiva (test ultrasensible). Para obtener el fragmento de ADN competidor para PCR se realizaron amplificaciones a baja temperatura de hibridación con los mismos primers que se usan en la reacción definitiva, utilizando como molde ADN de fago lambda. El ensayo uterótico dio positivo para los animales tratados con E2 y BPA ($p < 0.01$), pero no para los tratados con ENDO. Utilizando el test ultrasensible detectamos que tanto E2, BPA como ENDO aumentaron significativamente la expresión del ARNm de VEGF, en relación al control tratado con vehículo ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la detección del ARNm de VEGF por PCR competitiva es una metodología útil y sensible para la evaluación de la actividad de compuestos hormonalmente activos. Se completará la validación de la metodología propuesta investigando dosis ambientalmente relevantes de PEs sobre la expresión de VEGF y otros genes estrogénico-sensibles tales como lactoferrina y C3.

- 264. (426) ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN RATONES KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2.** GARCÍA TORNADÚ ISABEL ANDREA (1), GUIDA MARÍA CLARA (1), ARANY EDITH (2), CHAMSON ASTRID (2), DIAZ-TORGA GRACIELA (1), HILL DAVID (2), BECU-VILLALOBOS DAMASIA (1)

IByME-CONICET (1) LHRI. London, Ontario, Canadá (2)

Demostriamo que ratones deficientes de receptor dopaminérgico tipo 2 (KO) tienen un menor peso corporal, lo que correlaciona con bajos niveles de GH e IGF-1 séricos los primeros dos meses de vida. Además presentan hiperprolactinemia crónica y desarrollan tumores hipofisarios en forma espontánea. Tanto GH como PRL tienen efectos sobre la función pancreática de las células β y sobre el metabolismo de la glucosa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la regulación metabólica de la glucosa en ratones KO machos adultos. Los animales KO ayunados presentan una glucemia más elevada que su contraparte WT. A su vez, los niveles séricos de insulina se encuentran disminuidos (KO=0.065 \pm 0.013; WT=0.123 \pm 0.022 ng/ml; $p < 0.05$), presentando un menor contenido total de insulina en páncreas. Los estudios de IHQ demuestran que tanto el área total de los islotes así como también el área total de células β es menor en los animales KO respecto a los WT ($P < 0.01$ y $P < 0.05$), en concordancia con un menor HOMA β cell. In vivo, en el test de tolerancia a la glucosa los KO presentan una glucemia más elevada a los 30 min (321 \pm 20; WT=290 \pm 18 mg/dl; $p < 0.05$) que se correlaciona con una menor respuesta en la secreción de insulina (KO=0.060 \pm 0.001; WT=0.190 \pm 0.023 ng/ml; $p < 0.01$). El test de tolerancia a la insulina y el HOMA IR no mostraron diferencias, indicando que la sensibilidad a la insulina se mantiene. Podemos concluir que los animales KO tienen alterada la función del páncreas con menor contenido de insulina. Esto se refleja en niveles mayores de glucemia, y menores de insulina tanto basales como frente a glucosa, sin modificaciones en la sensibilidad a insulina. Estos hallazgos estarían relacionados a la deficiencia neonatal de GH que impide un correcto desarrollo de los islotes pancreáticos. Por otro lado, la ausencia de un aumento de sensibilidad a la insulina que se da en otros modelos de ratones enanos podría estar relacionada con los altos niveles de PRL.

- 265. (542) EGF INDUCE LA EXPRESIÓN DE ACIL-COA TIOESTERASA MITOCONDRIAL-I Y LA LIBERACIÓN DE**

AA EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10. CASTILLA MARIA DEL ROCIO, GDALETA MARIANA, DUARTE ALEJANDRA, PODESTÁ ERNESTO J.

Fac de Medicina. UBA

El transporte de colesterol en la mitocondria es un evento importante para la regulación de la síntesis de esteroides, para la biogénesis mitocondrial y por ende para la proliferación celular. Este transporte en células blanco esta regulado por las hormonas esteroideogénicas (LH, ACTH y AII) y es el paso limitante y universal en la síntesis de esteroides. En esta regulación intervienen el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR) y la proteína StAR (steroidogenic acute regulatory protein). A su vez la expresión de StAR es regulada por ácido araquidónico (AA), intermediario obligatorio en la acción de las hormonas esteroideogénicas. En células de Leydig MA-10 el transporte de colesterol también esta regulado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF). El objetivo del presente trabajo es estudiar la participación del AA en el mecanismo de acción de EGF. Nosotros hemos descripto que la liberación de AA esta controlada por la acción concertada de dos enzimas, una acil-CoA sintetasa (ACS4) y una acil-CoA tioesterasa mitocondrial (Acot2). En el mecanismo de acción de LH y ACTH estas hormonas inducen a ACS4 y regulan la actividad de Acot2 por fosforilación y llegada de sustrato. En el presente trabajo nosotros demostramos que EGF es capaz de inducir a Acot2 e incrementar la liberación de AA en la mitocondria. Células MA-10 en presencia de 10 nM EGF durante una hora, produjeron un incremento de 3 veces en los niveles de Acot2 analizados por western-blot. Cuando se estudió la liberación de AA utilizando [14C]-AA mediante TLC, se observó que EGF estimula un $29\% \pm 3$ la liberación de AA en las mitocondrias, sitio de acción de PBR y StAR. Estos resultados demuestran por primera vez la inducción de Acot2 por EGF y la regulación de los niveles intramitocondriales de AA en el mecanismo de regulación del transporte de colesterol y la síntesis de esteroides.

266. (612) FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE COLESTEROL. DUARTE ALEJANDRA, CASTILLO ANA FERNANDA, CASTILLA ROCIO, PAZ CRISTINA, PODESTA ERNESTO J., CORNEJO MACIEL FABIANA

Departamento Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

Recientemente se describió que la inhibición del transporte mitocondrial de electrones con antimicina A (AcA) y que la inhibición de la síntesis mitocondrial de ATP con oligomicina (Oly) producen la inhibición de la esteroideogénesis y de la inducción de la Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein en células de Leydig de la línea MA-10. Sin embargo no se conoce el mecanismo de esta inhibición. Previamente, hemos demostrado que la inducción de la proteína StAR está controlada por la liberación de ácido araquidónico (AA) mitocondrial y su metabolización a productos lipoxigenados. Es lógico postular que la disrupción de la función mitocondrial podría inhibir la inducción de StAR por afectar la liberación o metabolización del AA. Así, el objetivo de este trabajo fue estudiar si el AA exógeno puede revertir el efecto de los disruptores de la función mitocondrial. Para ello células de Leydig MA-10 fueron incubadas en presencia o ausencia de AcA y Oly (1 μ M) en presencia de diferentes concentraciones de cAMP por diferentes tiempos en ausencia o presencia de AA exógeno (300 μ M). Tanto a la hora como a las 3 hs de estimulación, AcA produce una inhibición de más del 90% en la síntesis de esteroides, medida como la concentración de progesterona (P4) en el medio de cultivo (por RIA). Esta inhibición es revertida por el agregado exógeno de AA: P4 (media \pm DS, en ng/ml): Control = $3,1 \pm 0,6$; cAMP (0,5 mM) = 55 ± 2 ; cAMP + AcA = $5,5 \pm 0,4$ ($p < 0,001$ vs cAMP); cAMP + AcA + AA = 50 ± 5 ($p < 0,001$ vs cAMP + AcA). Oly produce la misma inhibición que AcA y su efecto también puede ser revertido por el agregado de AA exógeno. La reversión por agregado de AA también se observa cuando se eva-

lúa la inducción de StAR por western blot. Estos resultados indican que la disfunción mitocondrial afecta la inducción de StAR y el paso limitante en la síntesis de esteroides por inhibición de la liberación de AA o su metabolización a productos lipoxigenados.

267. (491) EL ESTRADIOL PRODUCE UN EFECTO PROAPOPTOTICO RAPIDO EN CELULAS ADENOHIPOFISARIAS. ZÁRATE SANDRA, EIJO GUADALUPE, JAITA GABRIELA, RADL DANIELA, ZALDIVAR VERÓNICA, PISERA DANIEL, SEILICOVICH ADRIANA

CIR, Facultad de Medicina, UBA

La unión del estradiol (E2) a receptores asociados a la membrana plasmática desencadena cascadas de señalización que impactan en diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación y supervivencia celular. En nuestro laboratorio, hemos demostrado que la apoptosis inducida en la adenohipofisis por estímulos como el TNF- α , el LPS o el FasL varía a lo largo del ciclo estral, siendo mayor en proestro que en diestro. También hemos demostrado que el E2 sensibiliza a las células adenohipofisarias, especialmente lactotrofos y somatotrofos, a dichos factores proapoptóticos, como así también induce apoptosis per se sobre somatotrofos. Estudios previos de nuestro laboratorio sugieren que la incubación por tiempos largos con E2 o estren, un ligando sintético del receptor para estrógenos sin actividad transcripcional clásica, induce apoptosis de células adenohipofisarias. En el presente trabajo estudiamos la posible participación de receptores de membrana para E2 en la inducción de apoptosis de células adenohipofisarias mediante el uso de E2-BSA, un compuesto impermeable a la membrana plasmática. Evaluamos el porcentaje de apoptosis (determinado por Anexin-AV y citometría de flujo) en cultivos de células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas incubadas en presencia de E2 (10-9M) o E2-BSA (10-9M) durante 2 h. Ambos compuestos aumentaron el porcentaje de células apoptóticas (C: $14.7 \pm 1.57\%$, E2: $32 \pm 1.49\%$, E2-BSA: $28.7 \pm 1.9\%$ $p < 0.01$, ANOVA). También determinamos la apoptosis de células adenohipofisarias por TUNEL. Ambos compuestos indujeron apoptosis en dichas células (C: 1.2%, E2: 2.8%, E2-BSA: 3.4% $p < 0.001$, χ^2). Estos resultados indican que tanto el E2 como el E2-BSA en tiempos cortos de incubación inducen apoptosis en células adenohipofisarias y sugieren que el efecto proapoptótico del estradiol en dichas células podría deberse, al menos en parte, a la activación de receptores asociados a membrana plasmática.

268. (514) EFECTOS DE INSULINA Y SU INTERACCIÓN CON ESTRADIOL SOBRE LAS CÉLULAS LACTOTROPAS: PARTICIPACIÓN DE PKC EPSILON, ERK 1/2 Y PIT-1. GUTIÉRREZ SILVINA, DE PAUL ANA LUCÍA, PETITI JUAN PABLO, ALVIN GABRIELA, ORGNERO ELSA MARGARITA, TORRES ALICIA INÉS

Centro de Microscopía Electrónica. FCM. UNC

La Insulina (Ins) promueve proliferación de las lactotropas, mientras que la coincubación con Estradiol (Es) induce efectos antimitogénicos. Los mecanismos moleculares involucrados no han sido completamente dilucidados. Objetivo: Determinar la participación de enzimas implicadas en procesos proliferativos adenohipofisarios (PKC ϵ y ERK1/2) y el factor de transcripción pituitario (Pit-1), en los efectos de Ins y Es sobre la actividad proliferativa y biosintética de lactotropas. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata hembra fueron tratados con Ins (1-10-100ng/ml) y/o Es (1-10-100nM) por 48h. Se utilizó genisteína (Ge 25 μ M) y bisindolymaleimide I (BIM 0.5-2 μ M), inhibidores de receptores tirosina-quinasa y de PKC respectivamente. Se valoró la proliferación de lactotropas por doble detección inmunocitoquímica de BrdU y prolactina (PRL). Se cuantificó la expresión del receptor de Ins (InsR), PKC ϵ , ERK 1/2 fosforilada, ERK total, Pit-1, PRL y β actina por Western Blot. Análisis estadístico ANOVA-Tukey. Ins aumentó significativamente la proliferación de lactotropas y la expresión de PKC ϵ y Pit-1. La incubación con Ge o BIM redujo el número de lactotropas marcadas con BrdU ($p <$

0.001). La interacción Ins/Es indujo un efecto antiproliferativo sobre las lactotropas, disminuyendo la expresión de PKC ϵ y Pit-1 ($p < 0.01$). Los niveles de ERK1/2 se mantuvieron invariables en todos los modelos. Ins incrementó significativamente la expresión de InsR y la coincubación Ins/Es no modificó los niveles de los mismos. La PRL intracelular aumentó un 25% con Ins ($p < 0.01$) y un 75% en presencia de Ins/Es ($p < 0.001$). Nuestros resultados evidenciaron que Ins estimuló la biosíntesis de PRL y la proliferación de lactotropas a través de mecanismos dependientes de PKC ϵ y Pit-1 e independientes de ERK1/2. La interacción Ins/Es ejerció un efecto sinérgico sobre el contenido de PRL hipofisaria y acciones antimitogénicas sobre las lactotropas en las que participaría PKC ϵ y Pit-1.

GENÉTICA III

269. (76) DESARROLLO DE UN MODELO TEÓRICO DE EVOLUCIÓN MOLECULAR. ETAPA 2: MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE PROCESOS EVOLUTIVOS EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA EVOLUCIÓN. MARTINEZ ERIKA, ARGIBAY PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Bs. As.

La simulación de mecanismos por los que podría operar la evolución molecular de organismos permitiría obtener mayor conocimiento en temas de interés bio-médico diverso desde biología básica hasta la comprensión de mecanismos como la resistencia a antibióticos o la variabilidad antigénica. En una primera etapa presentamos en esta Reunión Científica Anual un modelo de generación y selección de genomas artificiales (SAIC 2005). El objetivo del presente trabajo es: Desarrollar un modelo teórico de evolución molecular que, aplicando mecanismos evolutivos conocidos, permita la emergencia de genomas biológicamente plausibles. Materiales y Métodos: El presente trabajo se basa en el escenario evolutivo propuesto por Woese (Proc Natl Acad Sci USA 1998 Jun 9;95(12):6854-9). En lenguaje turbopascal sobre Delphi, se generó una población completamente al azar formada por 10000 entidades pro-genéticas (EG), de 639 pares de bases cada una. En la generación de cada EG se utilizaron los cuatro tipos de caracteres equivalentes a bases nitrogenadas. En forma repetitiva, se llevo a cabo la búsqueda de secuencias que presenten características compatibles con el criterio de "gen", y la simulación de procesos evolutivos de transferencia horizontal y mutaciones al azar. El objetivo fue que a través de esta simulación emerjan genes en una situación biológicamente plausible. Resultados: El programa permanece en un modo de "evolución" continua, registrándose actualmente (5 meses de evolución) la aparición de una población formada por 4315 entidades resultantes de un proceso de selección en el cual el número total de EG emergentes disminuyó notablemente. De estas EG, la de mayor longitud posee 20442 pares de bases. Conclusión: Se simuló en forma biológicamente plausible una situación de evolución molecular. El modelo muestra una tendencia a que con el incremento en el número de iteraciones disminuye el número total de EG, mientras que por otra parte aumenta el tamaño de las EG resultantes.

270. (200) DETECCIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA POR MICROSATÉLITES DE ADN DE LA CEPA C57BL/6. DABROWSKI GRACIELA PATRICIA (1), REDAL MARIA ANA (1), VIEIRO MERCEDES (1), MOCETTI ESTEBAN (2), HERRERO EMILIANA (1), ARGIBAY PABLO (1)

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Bs. As (1) Anatomía Patológica del Hospital Italiano de Bs. As (2)

Introducción: La determinación de la calidad genética de los animales de laboratorio, es la base para la obtención de resultados confiables y reproducibles. La estabilidad de los microsatélites

es un método de determinación de la pureza genética de las líneas consanguíneas. Nuestro objetivo fue chequear la estabilidad genética de la cepa de ratón C57CL/6 a lo largo de tres generaciones nacidos en nuestro bioterio. Método: Para garantizar la homocigosis se establecen sistemas de apareos que aseguran un coeficiente de consanguinidad $> 98,6\%$. Se utilizaron ratones adultos de ambos sexos de las generaciones 4, 5 y 6 del núcleo fundador de la cepa C57BL/6. La extracción de sangre se realizó por el método de punción cardíaca. La sangre con EDTA se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Se purificó el ADN por métodos convencionales y se amplificó por PCR con primers específicos para cada microsatélite estudiado: D13Mit26, T62, T10, T1, D11Mit4, D16Mit5, D17Mit6. Se verificó la presencia de producto amplificado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. Para determinar la estabilidad del microsatélite se realizó otra electroforesis en gel de metafora al 3,5% en TBE, que detecta diferencias de hasta 2 Pb. Se realizaron los controles positivos y negativos correspondientes. Resultados: Para cada uno de los microsatélites analizados se observó, a lo largo de las generaciones: 4, 5 y 6, la presencia de una única banda de igual peso molecular equivalente a los valores de referencia. Se demostró que los animales mantuvieron la estabilidad genética dado que no se halló más de una banda en ninguno de los microsatélites. Conclusión: La metodología aquí descrita es reproducible y permitiría detectar contaminaciones genéticas. Esto sería un aporte a la estandarización genética de los animales; condición necesaria como punto de partida para establecer la confiabilidad de los resultados en los ensayos experimentales.

271. (208) AUSENCIA DE ASOCIACIÓN ENTRE DNA MITOCONDRIAL Y METILACIÓN DEL DNA EN LOS PROMOTORES DEL TFAM Y PPARG EN RECIÉN NACIDOS CON PESO ANORMAL. GEMMA CAROLINA (1), SILVIA SOOKOIAN (1), JORGE ALVARIÑAS (2), SILVIA GARCÍA (1), LAURA QUINTANA (2), DIEGO KANEVSKY (1), CLAUDIO GONZALEZ (3), CARLOS JOSE PIROLA (1)

IDIM (1) Policlínico Bancario - Unidad de Nutrición (2) Facultad de Medicina UBA - Departamento de Farmacología (3)

La regulación de la biogénesis mitocondrial involucra la acción coordinada de varios genes, entre ellos se encuentran el factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) y el factor de transcripción PPARg. Recientemente demostramos en una población de 72 recién nacidos, 45 con normopeso y 27 con peso anormal para la edad gestacional según percentilo (16 bajo peso y 11 alto peso) que el contenido de DNA mitocondrial (mtDNA) expresado por la relación mtDNA/ DNAnuclear (Rel) se encuentra disminuido en los recién nacidos de peso anormal vs. normopeso. Postulamos que la Rel podría estar relacionada a polimorfismos en los genes que regulan la biogénesis mitocondrial y además al estado de metilación en los promotores de estos genes, para lo cual nos propusimos: 1- relacionar el hallazgo de la Rel en esta población con un SNP (A/G rs 12247015) en el gen Tfam y con el polimorfismo Pro12Ala en el gen PPARg y 2- evaluar cambios en la metilación de los promotores de ambos genes y su asociación con la Rel. Se purificó DNA de cordón umbilical y para estudiar la metilación se realizó PCR en tiempo real luego de someter al DNA genómico a la presencia o ausencia de la enzima sensible a metilación HpaII. La Rel (media \pm ES) no fue significativamente diferente para los distintos genotipos del Tfam: AA:22 \pm 5, n=19; AG:23 \pm 5, n=38; GG:23 \pm 7, n=11 ni tampoco para los genotipos de PPARg: Pro/Pro:23 \pm 3, n=57; Ala/Pro+Ala/Ala:22 \pm 8, n=15. Los niveles de metilación en los promotores del gen Tfam y PPARg no mostraron correlación significativa con los niveles de la Rel. Conclusiones: En la regulación de la biogénesis mitocondrial, intervienen tanto genes nucleares como mitocondriales. Los polimorfismos rs 12247015 y Pro12Ala del gen Tfam y PPARg respectivamente, así como el estado de metilación en la región promotora de estos genes estudiada en este trabajo, no parecen ser los mecanismos por los cuales se producen cambios en el contenido de mtDNA en esta población.

272. (361) DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA: ESTUDIO MOLECULAR DEL MÓDULO RCCX MEDIANTE SOUTHERN-BLOT UTILIZANDO SONDAS DE LOS GENES CYP21, C4 Y TNX. FERNÁNDEZ CECILIA SOLEDAD, BUZZALINO NOEMÍ, ONETO ADRIANA, STIVEL MIRTA, BELLI SUSANA, PASQUALINI TITANIA, CHARREAU EDUARDO, ALBA LILIANA, GOIN MERCEDES, DAIN LILIANA

Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET y Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS), División Endocrinología Hospital Durand, Servicio de Pediatría Hospital Italiano, Laboratorios Beta

El módulo RCCX está compuesto por los genes RP1, C4, CYP21 y TNX, y se encuentra generalmente duplicado en tandem en humanos. Como consecuencia, los cromosomas poseen 2 genes C4, un gen CYP21A2 y un pseudogen CYP21A1P con 98% de homología entre ambos. El CYP21A2 codifica para la enzima 21-hidroxiilasa siendo su deficiencia la principal causa de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC). La complejidad de esta región y la elevada homología entre gen y pseudogen provoca mutaciones tales como deleciones, duplicaciones, macro y micro conversiones génicas. En un trabajo previo estudiamos las 10 mutaciones puntuales más frecuentes del gen mediante PCR en una muestra de pacientes. El objetivo de este trabajo fue discriminar entre la presencia de mutaciones en homocigosis, deleciones y/o macroconversiones así como rearreglos del módulo RCCX. Se realizó Southern-blot a partir de ADN genómico de una muestra preliminar de 20 afectados de las formas clásicas y no clásicas de la deficiencia y de 5 familiares. El ADN fue digerido con las enzimas Taq I y Bgl II. Para obtener el patrón de restricción de Taq I, la membrana se hibridizó simultáneamente con una sonda del cADN del gen CYP21A2 y sondas de C4 y TNX las cuales fueron obtenidas por PCR a partir de ADN genómico. Para Bgl II se utilizó la sonda de cADN de CYP21A2. Del análisis de los 41 cromosomas no relacionados, se encontró una deleción del módulo conteniendo al gen y 7 macroconversiones, de las cuales 4 involucran sólo la región 5' del gen. Hallamos 12 cromosomas trimodulares con duplicación del módulo del pseudogen, y 3 cromosomas monomodulares por deleción del módulo del CYP21A1P. Además observamos un patrón de bandas compatible con una posible deleción del pseudogen que no involucraría al C4. Consideramos que los resultados obtenidos mediante la utilización de 2 enzimas de restricción y 3 sondas, aporta mayor información para una interpretación más precisa de los eventos moleculares ocurridos en el locus.

273. (472) DEFICIENCIA AISLADA DE HORMONA DE CRECIMIENTO: DIAGNOSTICO MOLECULAR Y EVALUACION ENDOCRINOLÓGICA. MARINO ROXANA, RAMIREZ PABLO, CIACCIO MARTA, CHALER EDUARDO, RIVAROLA MARCO A, BELGOROSKY ALICIA

Servicio de Endocrinología. Hospital Garrahan

La frecuencia de la deficiencia de hormona de crecimiento (GH) varía entre 1/4000 y 1/10000. Un alto porcentaje de casos de deficiencia de GH (5-30%) puede deberse a causas genéticas. Se han definido cuatro de tipos de deficiencia aislada de GH en base al modo de herencia, deficiencia hormonal y análisis molecular. Éstas incluyen dos formas de herencia autosómica recesiva (IA y IB), una de herencia autosómica dominante (II) y una ligada al X (III). En este estudio reportamos un análisis clínico y molecular del gen GH-1 en 16 pacientes argentinos (12 familias) con deficiencia aislada de GH. Se realizó el estudio molecular del gen GH-1 en un grupo de pacientes con baja talla (SDS < -2), niveles séricos de GH por debajo del límite de corte luego de la estimulación con dos tests farmacológicos y reducida velocidad de crecimiento. Se descartaron lesiones orgánicas por RMN. El gen GH-1 fue analizado por secuenciación automática luego de la amplificación por PCR del gen completo para detectar mutaciones puntuales o por análisis de digestión con enzimas

de restricción (Bgl I, Hae II, Sma I) de productos de PCR de secuencias que normalmente flanquean el gen GH-1 para detectar deleciones de diferente tamaño. Describimos la presencia de la deleción de 6,7 Kb en estado homocigota en 3 pacientes (2 familias) con deficiencia aislada de GH IA (16,7%). En 5 pacientes (4 familias) con deficiencia aislada de GH (II) encontramos dos mutaciones puntuales diferentes (R183H 3/12, 25% y Thr24Ala 1/12, 8,3%). En 6 familias no se encontró ninguna mutación. Estos resultados nos llevan a concluir que R183H tendría una alta frecuencia en nuestra población. En el 50% de pacientes no relacionados no encontramos ninguna alteración molecular. Estos hallazgos muestran la necesidad de ampliar el estudio a regiones promotoras del gen GH-1 u otros genes candidatos para encontrar las causas moleculares de la deficiencia aislada de GH como fue reportado en otras poblaciones.

274. (513) ESTUDIO DE ALELOS NO CARACTERIZADOS EN UN GRUPO DE PACIENTES CON DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA. MINUTOLO CAROLINA, BUZZALINO NOEMÍ, BELLI SUSANA, ONETO ADRIANA, STIVEL MIRTA, PASQUALINI TITANIA, CHARREAU EDUARDO, ALBA LILIANA, DAIN LILIANA

Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS) y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, División de Endocrinología, Hospital Durand Servicio de Pediatría, Hospital Italiano; Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET

El 90% de los casos de hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), desorden autosómico recesivo, se debe a la deficiencia de 21-hidroxiilasa. Si bien la mayor parte de las mutaciones se deben a conversiones génicas entre el gen CYP21A2 y el pseudogen CYP21A1P, fueron descritas alrededor de 90 mutaciones adicionales. En trabajos previos analizamos la presencia de las 10 mutaciones más frecuentes y hallamos una mutación novel en un paciente. Con el objeto de completar la caracterización molecular de aquellos individuos en los que resta determinar al menos un alelo, se estudiaron por secuenciación los exones 1, 6, 8 y 10, y la región promotora/regulatoria cercana (P/R) en 22 pacientes: 5 con la forma clásica (CI) y 17 no clásica (NCI) de 20 familias no relacionadas. En la región P/R se halló un posible cambio A/C en un paciente NC con genotipo aún no caracterizado. Todos los cromosomas analizados presentaron la variante -4 C. En el exón 1, no observamos mutaciones noveles y 13 cromosomas portan la variante normal deleción L10. A excepción de 2 cromosomas, todos presentaron la variante L39 TTG, y salvo 3, la variante P45 CCA. En los exones 6 y 8 no detectamos mutaciones y verificamos la presencia de los polimorfismos ya descritos. En un paciente CI con sólo un cromosoma genotipificado I172N, se detectó una deleción de 2G en el exón 10 no descrita previamente. Este cambio se ubica en una región de la proteína altamente conservada entre diferentes especies, involucrada en la unión al hemo. En conclusión, no hemos hallado hasta el presente polimorfismos no descritos en los pacientes analizados. Sin embargo, teniendo en cuenta estos resultados y estudios previos, de nuestro laboratorio, 2 pacientes presentan mutaciones noveles que sugerimos serían causa de la patología. La implicancia biológica del cambio observado en la zona P/R será analizada en individuos controles a efectos de descartar que se trate de una variante polimórfica poblacional.

275. (672) PRESENCIA DE DOBLE REARREGLO MOLECULAR DEL GEN BCL-2 EN LINFOMAS FOLICULARES. NORIEGA MARÍA FERNANDA, DE BRASI CARLOS, NARB AITZ MARINA, RODRÍGUEZ ANDREA, SLAVUTSKY IRMA

Academia Nacional de Medicina

La t(14;18)(q32;q21), que determina el rearreglo BCL-2-IgH, se encuentra asociada al 60-85% de los linfomas foliculares (LF), siendo sus puntos de ruptura más frecuentes MBR-IgH (60% de los casos) y mcr-IgH (25%). La presencia de doble rearreglo molecular MBR-IgH y mcr-IgH es un evento de muy baja frecuen-

cia en este tipo de linfomas, con muy escasas referencias en la literatura de casos esporádicos. En este trabajo se presenta la distribución de los rearrreglos moleculares del gen BCL-2 en 110 pacientes con LF (50 mujeres; edad media: 54,1 años; rango: 29-82 años), estableciéndose su proporción acorde al grado de LF y al índice pronóstico internacional (FLIPI). El ADN genómico obtenido de sangre periférica y médula ósea fue analizado por PCR anidada y de larga distancia. Se observó la siguiente distribución de puntos de ruptura: 52 (47%) con MBR-IgH, 28 (25,5%) con mcr-IgH, 5 (4,5%) con doble rearrreglo MBR y mcr y 25 (23%) sin rearrreglo. Los pacientes con doble rearrreglo presentaron una edad media (43,8±7,7 años) significativamente más baja que los restantes grupos ($p < 0,03$), el 80% de los mismos mostró grado 1 de LF y FLIPI de bajo riesgo. Los restantes pacientes mostraron una similar distribución de puntos de ruptura en los grados 1 (MBR-IgH: 65% y mcr-IgH: 25%) y 2 (50% y 30%, respectivamente), en tanto que el 60% de los casos con grado 3a fueron BCL-2 negativos, con diferencias significativas respecto de grado 1 ($p < 0,02$). La distribución por FLIPI mostró una mayor proporción de pacientes con riesgo intermedio (46% y 47%) y alto (29% y 37%) para MBR y mcr positivos, respectivamente. La presente constituye la primera correlación de pacientes con doble rearrreglo en MBR y mcr con las características clínicas de LF, indicando asociación con factores pronóstico de bajo riesgo. Si bien no es claro el origen de esta doble alteración, la misma indicaría la presencia de un tumor biclonal originado probablemente a partir de un nuevo rearrreglo en el clon original.

276. (589) DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES DEL GEN FLT3 EN NEOPLASIAS MIELOIDES: SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS Y LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA). BELLÍ CAROLINA, VÍA GABRIEL, CHIARAMELLO VERÓNICA, FUNDIA ARIELA, VAZQUEZ LORENA, ARROSSAGARAY GUILLERMO, BENGIÓ RAQUEL, LARRIPA IRENE

Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, BIOGEN, Hospital Central, Mendoza, Hospital Italiano, Buenos Aires

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 mutaciones puntuales del codón D835 en el exón 20. Ambas mutaciones producen una activación constitutiva alterando la proliferación e inhibiendo la apoptosis. Las mutaciones del FLT3 se encuentran reportadas con una frecuencia del 5% en SMD y del 30% en LMA. Se evaluaron 82 pacientes con SMD de novo: 39 AR, 9 AS, 19 AREB, 4 AREBt y 11 LMMC, al diagnóstico. Asimismo, se analizaron 13 pacientes con LMA: 2 M0-M1, 1 M1, 1 M2, 6 M3, 1 M4 y 2 LMA secundarias a SMD. La detección de la DIT se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación y la posterior secuenciación de la banda anómala. Mientras que, la búsqueda de mutaciones D835 se realizó mediante RFLP utilizando la enzima EcoRV. El estudio de ambas mutaciones mostró que 2/82 pacientes con SMD presentaron mutaciones puntuales en el codón 835. Uno de ellos tenía un cariotipo normal, diagnóstico de AREB con pronta evolución a LMA. El otro era una AR sin cariotipo al diagnóstico, con evolución estable durante 2 años. En cuanto a la búsqueda de DITs, éstas fueron detectadas en 4/13 pacientes con LMA, 3 de los cuales presentaron cariotipo normal. Las DITs mostraron diferentes longitudes (27, 51, 60 y 90pb), diferentes puntos de inserción y diferentes regiones duplicadas, aunque todas pertenecían al exón 14 e incluían mutaciones puntuales en los sitios de inserción. Ninguno de los pacientes respondió al tratamiento y fallecieron, ya sea por recaída, falla durante la inducción del tratamiento o por resistencia al mismo. Estos resultados coinciden con la frecuencia publicada en la literatura. El hallazgo de las mismas aportaría un factor pronóstico adverso, un marcador molecular para realizar estudios de seguimiento clínico y un probable blanco terapéutico.

277. (518) DETECCIÓN DE TRES MUTACIONES NUEVAS EN FAMILIAS ARGENTINAS CON PORFIRIA VARIEGATA. GIUDICE JIMENA (1, 2), GRANATA XOANA (1, 2), PARERA VICTORIA ESTELA (1, 2), BATLLE ALCIRA (2), ROSSETTI MARÍA VICTORIA (1, 2)

Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA (1) y Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas - UBA (2)

Las Porfirias son enfermedades metabólicas que surgen por deficiencias de una de las enzimas del camino biosintético del Hemo. Como consecuencia de esta falla principal, parcial y primaria, ocurre una sobreproducción de intermediarios dando lugar a una sintomatología clínica característica para cada tipo de Porfiria. Se clasifican en hepáticas o eritropoyéticas según sea el lugar principal de manifestación de la falla enzimática o en agudas y cutáneas dependiendo del síntoma clínico prevalente. La Porfiria Variegata (PV) es un desorden autosómico dominante, se conoce como Porfiria hepática mixta ya que los pacientes pueden presentar síntomas agudos y/o cutáneos. El defecto molecular está localizado en el gen que codifica para la Protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) en el cual se han identificado más de 120 mutaciones diferentes. En 5 nuevas familias PV se detectaron, mediante PCR y secuenciación automática, 3 mutaciones aún no descritas y 2 previamente publicadas. De las mutaciones nuevas una es una delección, c.133delT, que produce corrimiento del marco de lectura y un codón stop 22 codones río abajo del nucleótido insertado (p.S45fsX67). Otra es una transversión, c.670T> G, que resulta en el cambio p.W224G y aunque no afecta un aminoácido conservado es la única alteración encontrada luego de secuenciar el gen completo. La otra transversión (c.995G> C) que produce el cambio p.G332A afecta un aminoácido involucrado en la unión con el sustrato y si bien la base mutada está presente en uno de los ESE'S predichos para esta enzima, los estudios de RT-PCR mostraron sólo la banda normal. Estas mutaciones están presentes en los familiares sintomáticos y ausentes en los asintomáticos y en 50 individuos normales. En otras 2 nuevas familias se detectó la inserción 1043insT, encontrada hasta ahora en 10 familias Argentinas PV aparentemente no relacionadas dando una prevalencia de alrededor del 40% (10/26), la mayor descrita hasta el momento para esta Porfiria.

INMUNOLOGÍA V

278. (235) TOXICIDAD VS CAPACIDAD ANTITUMORAL LUEGO DE LA EXPRESIÓN SISTÉMICA DE LOS CDNA PARA INTERLEUQUINA-12 (IL-12) E IL-18. RODRÍGUEZ GALÁN MARÍA CECILIA (1), REYNOLDS DELLA (2), WATANABE MORIHIRO (2), YOUNG HOWARD A. (2)

CIBICI-CONICET. Dpto. de Bioquímica Clínica. Fac. de Ciencias Químicas-Univ. Nacional de Córdoba Laboratory of Experimental Immunology. NCI-Frederick. National Institutes of Health (NIH) (2)

La acción simultánea de las citoquinas IL-12 e IL-18 potencia la producción de interferón gamma (IFN- γ). En modelos animales y en pacientes con cáncer, el uso de IL-12 e IFN- γ ha mostrado variada actividad antitumoral aunque con alta morbilidad. El costo de producción de estas proteínas y su baja tolerancia sistémica ha limitado su uso y nuevas alternativas dentro de la terapia génica están siendo consideradas. En el presente trabajo se indujo la expresión sistémica de los cDNAs para IL-12 y IL-18 mediante inyección hidrodinámica y se evaluó toxicidad y eficacia en distintos modelos de cáncer. Luego de la inyección se generaron altos niveles séricos de IL-12 y IL-18 ($p < 0,05$) con un pico de IFN- γ entre las 24-96 h. El tratamiento con cDNA para IL-18 resultó inocuo pero el cDNA de IL-12 sólo o con IL-18 indujo un efecto tóxico letal restringido a la cepa y edad de los animales. Ratones BALB/

c (resistentes) y C57BL/6 (susceptibles) de seis semanas tratados con IL-12 o IL-12+IL-18 mostraron 0% y 50-90% de mortalidad respectivamente. En cambio, ratones de ambas cepas mayores a 10 semanas presentaron 100% de sobrevida. En animales inyectados con el melanoma B16, el cDNA para IL-12 o IL-12+IL-18 redujo considerablemente el número y tamaño de las metástasis en hígado ($p < 0.05$) pero no en pulmón. Estos hallazgos se correlacionaron con una mayor capacidad lítica de leucocitos de bazo e hígado ($p < 0.05$). La depleción de células NK y NKT con el anticuerpo anti-NK1.1 no mejoró ni empeoró la toxicidad mediada por IL-12 mientras que en animales RAG -/- tratados con IL-12 o IL-12+IL-18 aumentó la sobrevida ($p < 0.05$). La expresión hidrodinámica del plásmido IL-12 sólo o combinado a IL-18 induce una fuerte respuesta antitumoral que resulta tóxica según la cepa y la edad de los animales. La toxicidad sería mediada por células T. Los beneficios en costo y mayor dosis tolerada avalan el uso de cDNAs de IL-12 e IL-18 como potencial terapia en cáncer.

279. (274) LA PORCIÓN PROTEICA DE LAS LIPOPROTEÍNAS OMP16 Y OMP19 DE BRUCELLA SPP. CONFIERE PROTECCIÓN EN AUSENCIA DE ADYUVANTES. PASQUEVICH KARINA ALEJANDRA, ESTEIN SILVIA MARCELA, ZWERDLING ASTRID, GARCÍA SAMARTINO CLARA, BARRIONUEVO PAULA, FOSSATI CARLOS ALBERTO, GIAMBARTOLOMEI GUILLERMO HERNÁN, CASSATARO JULIANA

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA) y Lab. de Inmunogenética, Htal Clínicas "José de San Martín", Fac. Medicina, UBA. Buenos Aires; Lab. de Inmunología y Biotecnología Fac. Cs. Veterinarias, UNICEN, Tandil

En nuestro laboratorio trabajamos en el desarrollo de una vacuna acelular contra la brucelosis. Omp16 y Omp19 son lipoproteínas de *Brucella* spp. e inducen protección frente a la infección con *B. abortus* en presencia de adyuvante de Freund. Como la porción lipídica de las lipoproteínas bacterianas tiene capacidad adyuvante per se, en el presente trabajo evaluamos la capacidad protectora de Omp16 y Omp19 en ausencia de adyuvantes y en presencia de $Al(OH)_3$. Para ello, se inmunizaron ratones BALB/c con Omp16 y Omp19 en su forma lipídica (L) con $Al(OH)_3$ o sin adyuvante (s/a), *B. abortus* S19 (cepa atenuada) o solución fisiológica (SF). Se evaluó la protección conferida frente al desafío con *B. abortus* virulenta con respecto al grupo control (SF) por recuento de unidades formadoras de colonias en el bazo. Omp16L y Omp19L indujeron niveles de protección significativos (** $p < 0.01$) con $Al(OH)_3$ o s/a. Luego estudiamos si la porción lipídica era la responsable de la actividad adyuvante intrínseca de Omp16 y Omp19. Se inmunizaron ratones BALB/c con Omp16L y Omp19L o sus versiones sin lipídica (S) s/a, *B. abortus* S19 o SF y se evaluó la protección conferida (ver tabla). Los resultados obtenidos indican que la porción proteica es la principal responsable de la capacidad adyuvante, ya que las proteínas S protegieron en igual grado ($p > 0.05$) que las L. Resultados preliminares, muestran que tanto las proteínas L como las S, son capaces de activar/madurar células dendríticas de ratón. Aunque, en diferentes rangos de concentración. La actividad adyuvante intrínseca de la porción proteica de Omp16 y Omp19 las convierte en las primeras proteínas de *Brucella* capaces de conferir protección en ausencia de adyuvante. Protección conferida frente al desafío por *B. abortus* por la inmunización con Omp16 y Omp19 lipídica (L) o no lipídica (S) en ausencia de adyuvantes.

vacuna (n=6)	log UFC/bazo	protección	log UFC/bazo	protección
SF	5.47 ± 0.13	0.00		
<i>B. abortus</i>	3.38 ± 0.23	2.09**		
Cepa 19S				
Omp16	4.01 ± 0.50 (L)	1.46** (L)	3.93 ± 0.38 (S)	1.54** (S)
Omp19	4.05 ± 0.56(L)	1.42** (L)	3.80 ± 0.23 (S)	1.67** (S)

280. (371) INMUNIZACIÓN NASAL DE RATONES JÓVENES CON PPPA EXPRESADA EN LACTOCOCCUS LACTIS INCREMENTA LA RESISTENCIA A LA INFECCIÓN POR STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE. VILLENNA JULIO, MEDINA MARCELA, VINTIÑI ELISA, RAYA RAÚL, ALVAREZ SUSANA

Centro de Referencia para Lactobacilos CERELACONICET

Demostremos previamente que *Lactococcus lactis* NZ 9000 posee actividad adyuvante, ya que al ser administrado por vía nasal aumenta la respuesta inmune contra *Streptococcus pneumoniae*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inmunización nasal de ratones jóvenes (más susceptibles que los adultos) con un antígeno de superficie del patógeno expresado en la pared celular de *L. lactis*. La bacteria láctica fue transformada con un vector de expresión que contiene el gen *pppA* de *S. pneumoniae* bajo el control del promotor *NisA* y expresa la proteína *PppA* (pneumococcal protective protein A) en su pared celular, al ser inducida con nisina. Ratones albino Suizos (3 semanas) fueron inmunizados tres veces a intervalos de 14 días por vía intranasal. Se empleó *L. lactis* *PppA* (10E8 cel/ratón) con (L+) o sin (L-) inducción previa, y solución fisiológica para el grupo control (C). Dos semanas después de la última inmunización se midió la producción de anticuerpos (Ac) específicos (IgA, IgG, IgG1 e IgG2a) en suero y en lavado broncoalveolar (BAL) y se evaluó sobrevida luego del desafío intraperitoneal con *S. pneumoniae* serotipo 14 (10E8 cel/ratón). El grupo L+ mostró una mayor resistencia a la infección neumocócica que los grupos controles, ya que el 70% de los ratones L+ sobrevivió al desafío con el patógeno mientras que el 100% de L- y C murieron entre los días 4 y 5 post-infección. La inmunización con L+ indujo producción de Ac específicos en BAL (IgA: L+=9,2±0,3 (mg/L), L- = no detectado (ND), C=ND; IgG: L+=5,5±0,5 (mg/L), L-=ND, C=ND) y en suero (IgG: L+=67,1±7,2 (mg/L), L-=ND, C=ND). Se observó además incremento en la producción local y sistémica de ambos isotipos de IgG (suero: IgG1: L+=33,6±0,9, IgG2a: L+=23,7±0,1). La inmunización con la cepa recombinante de *L. lactis* fue eficaz para proteger contra una infección con *S. pneumoniae*. Los anticuerpos producidos tendrían un papel importante en este efecto.

281. (582) LA MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS CON EL POLISACÁRIDO QUITOSANO: BASES PARA UNA ATRACTIVA TERAPIA ALTERNATIVA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES. PORPORATTO CARINA, CANALI MARÍA MAGDALENA, BIANCO ISMAEL DARIO, CORREA SILVIA GRACIELA

CIBICI-CONICET. Inmunología. Dpto Bioquímica Clínica. Fac. Cs. Químicas. Univ. Nac. de Córdoba. Centro de Excelencia en Productos y Procesos de la Provincia de Córdoba (CEPROCOR), Agencia Córdoba Ciencia SE.

Quitosano (Q) es un polisacárido con actividad adyuvante que promueve el transporte y la absorción de proteínas a través del epitelio. El objetivo fue caracterizar la actividad biológica de este candidato ideal para la inmunointervención en mucosas a nivel local y sistémico y su potencial aplicación como agente inductor de tolerancia oral. Ratas Wistar recibieron Q por vía oral y a las 16 hs determinamos en el epitelio intestinal un incremento en la expresión de ARNm para $TNF\alpha$, IL8 y CCL2, y una mayor frecuencia de células dendríticas MHCII+ CD103+ en placas de Peyer (PP) y nódulos mesentéricos (NLM) (IF y FACS, $p < 0.05$). En PP incrementó la expresión de ARNm para TGF β e IL4 y en NLM aumentó la producción ex vivo de IL10 (Elisa, $p < 0.05$). En este microambiente inducido por Q detectamos una mayor frecuencia de células CD3+ IL10+ en PP y NLM (FACS, $p < 0.05$). Utilizando Q:FITC demostramos que Q es tomado por células CD11b/c+ presentes en PP y NLM (FACS; $p < 0.05$). Cuando administramos Q asociado a colágeno tipo II (CII:Q) observamos una disminución en la producción de IL2, un aumento en IL10 en PP y bazo

(Elisa, $p < 0.05$) y un incremento en la expresión de ARNm para IL10, TGF β e IL4 en PP ($p < 0.05$). Las células con actividad reguladora CD3+ IL10+ y CD4+ CD25+ incrementaron en PP, NLM y bazo luego de la administración de CII:Q (FACS, $p < 0.05$). En un modelo de artritis determinamos la eficacia de la tolerización con CII:Q al observar un menor reclutamiento de células a nódulos drenantes, una menor incidencia de artritis y disminución en los niveles séricos de IgG2a anti-CII ($p < 0.05$). La mejoría en la patología podría estar relacionada al incremento en la población de células CD3+ IL10+ en bazo y nódulos drenantes (FACS, $p < 0.05$) observada en el grupo CII:Q. Q contribuiría a mantener la homeostasis intestinal, y a modular a nivel local y sistémico las respuestas inmunes hacia un antígeno proteico, favoreciendo la inducción de tolerancia oral en el modelo de artritis.

282. (638) EFECTOS DE INMUNOTERAPIAS ESPECÍFICAS SOBRE LOS NIVELES DE IGG ASIMÉTRICAS E IL-10 EN UN MODELO MURINO DE ALERGIA. APICELLA CAROLINA (1), GENTILE TERESA (1), CHIAPPETTA DIEGO (2), BREGNI CARLOS (2), DOKMETJIAN JOSÉ (1)

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr. Ricardo Margni-CONICET-UBA/Facultad de Farmacia y Bioquímica (1), Cátedra de Farmacotecnia I - Departamento de Tecnología Farmacéutica (2)

La inmunoterapia específica (ITE) en pacientes alérgicos se asocia con un marcado aumento de IgG4 con actividad bloqueante e incremento de IL-10. En este trabajo nos propusimos comparar el efecto de las ITE con Ovoalbúmina (OVA)-soluble, PLGA-OVA (D,L-lactic-coglicolic acid) y OVA polimerizada(pol) con glutaraldehído respectivamente, en ratones previamente sensibilizados con OVA. Para ello se determinaron los niveles séricos de IgG asimétricas (AABs) de características bloqueantes, de IgE y la relación IgG2a/IgG1, además en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos se determinó la concentración de IL-10. Para ello, hembras Balb/c ($n=20$) fueron sensibilizadas con 3 dosis ip de OVA adsorbida en Al(OH) $_3$. Después de verificar el estado alérgico mediante la prueba de anafilaxia cutánea y de la concentración de IgE sérica específica, los g PLGA-OVA ($n=5$), 3 dosis manimales fueron sometidos a ITE con 1 dosis sc de 50 g OVA soluble sc ($n=5$) μ g de OVA-pol sc ($n=5$) o 3 dosis de 50 μ de 50. Luego del tratamiento se determinaron los niveles séricos de IgG2a, IgG1, IgE (ELISA), el porcentaje de AABs (ELISA diferencial) y la concentración de IL-10 (ELISA de captura) sintetizada por los esplenocitos en un cultivo de (96 hs) desafiados con OVA. Se observaron mayores niveles de AABs en los ratones tratados con PLGA-OVA (40%) y OVA-pol (38%) vs. los no tratados (26%) ($p < 0.01$) y ($p < 0.05$) respectivamente. El grupo tratado con PLGA-OVA presentó la mayor relación IgG2a/IgG1(0.757 vs 0.543 del control $p < 0.01$). No se observó diferencia en los niveles de IgE entre los distintos grupos. La concentración de IL-10 fue significativamente mayor a la del control sólo para el cultivo de esplenocitos de ratones tratados con PLGA-OVA (1038.67, vs 520.10 pg/ml) $p < 0.05$. Los resultados sugieren que de los tratamientos estudiados, el uso de PLGA-OVA es el que presenta los mejores parámetros asociados a un desvío efectivo de la respuesta inmune característico del éxito de las terapias desensibilizantes.

283. (689) INHIBICION DE RECIDIVAS TUMORALES DESPUES DE LA EXTIRPACION DE UN FIBROSARCOMA MURINO MEDIANTE UN TRATAMIENTO COMBINADO DE DEXAMETASONA Y CELULAS DENDRITICAS ESTIMULADAS CON LISADO TUMORAL. CHIARELLA PAULA, VERMEULEN MONICA, BRUZZO JUAN, CAMERANO GABRIELA V, MAGLIOCO ANDREA F, DRAN GRACIELA I, VULCANO MARISA, BUSTUOABAD OSCAR D, RUGGIERO RAUL A

ILEX-CONICET-División Medicina Experimental. Academia Nacional de Medicina IHEMA

En la clínica, la extirpación quirúrgica de un tumor no suele ser curativa ya que tarde o temprano se producen recidivas loca-

les o distantes (metastasis) que causan la muerte de los pacientes. En nuestra experiencia previa la extirpacion del fibrosarcoma murino inmunogénico MC-C suele ser curativa cuando el tumor es < 2000 mm 3 . Sin embargo en este trabajo cuando MC-C tenía > 2000 mm 3 su extirpacion produjo recidivas locales en 30 de 31 casos. La aplicación de una vacuna basada en células dendríticas (DC) estimuladas con lisado de MC-C, 3 días después de la operacion, no mejoro la situacion exhibiéndose recidivas locales en 6 de 6 casos. Sin embargo, cuando pretratamos los ratones con dexametasona (DX) 3 días antes de la operacion y con DC estimuladas con lisado de tumor 3 días después de la misma, se observo una significativa reduccion en el numero de ratones con recidivas (2 de 8). El tratamiento solo con DX produjo una ligera disminucion en el numero de recidivas (19 de 25) mientras que el tratamiento solo con DX 3 días después de la operacion no dio ningun resultado (6 de 6 casos con recidivas). El numero de recidivas observado con el tratamiento combinado de DX mas DC estimuladas con lisado tumoral fue significativamente menor al observado en los otros grupos ($p < 0.001$ respecto de los controles, de los tratados solo con DC, y de los que solo recibieron DX después de la operacion; $p < 0.01$ respecto de los que sólo recibieron DX antes de la operacion). En trabajos anteriores hemos demostrado que el tratamiento con el agente antiinflamatorio DX revertía parcialmente el eclipse inmunológico y permitía que una vacuna basada en DC inhibiera el crecimiento de un tumor establecido. En esta presentación hemos extendido esta observación y hemos verificado que esta estrategia de tratamiento en dos pasos puede ser también útil para disminuir el número de recidivas locales después de la extirpacion quirúrgica de un tumor.

284. (470) LA ACTIVACIÓN VÍA TLR4 EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO MAT-LU, INDUCE UN CAMBIO EN EL FENOTIPO DE LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR. ANDREANI* VIRGINIA, GATTI* GERARDO, RIVERO VIRGINIA, MACCIONI MARIANA

*Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)- CONICET. Facultad de Cs. Químicas. UNC. *Ambos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.*

El rol del TLR en la tumorigénesis es poco conocido. Resultados previos indican que la línea celular de adenocarcinoma prostático MAT-LU expresa TLR4 y responde ante su ligando LPS, activando genes de quemoquinas y mediadores proinflamatorios. Estas células generan tumores prostáticos al ser inyectadas s.c. en ratas singénicas Copenhagen. Si las mismas son estimuladas con LPS antes de ser inyectadas, inducen tumores cuyo crecimiento y tamaño son significativamente menores. Dicha disminución no es debida a cambios ocasionados por LPS en la proliferación ni en la apoptosis celular. Esta diferencia en el tamaño tumoral, tampoco se observa en ratones nude, sugiriendo un rol del sistema inmune en este fenómeno. En este trabajo, estudiamos los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) inducidos por células MAT-LU tratadas (MAT-LU+LPS) o no (MAT-LU) con LPS. Se obtuvieron TILs mediante gradientes de centrifugación, y se estudiaron por citometría de flujo las poblaciones linfocitarias y sus estados de activación (CD3, CD4, CD8, NK, CD11b/c, CD71, MHCII, CD80). No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de las poblaciones linfocitarias ni en los niveles de activación estudiados en TILs provenientes de tumores MAT-LU + LPS, con respecto a los TILs de tumores MAT-LU. Linfocitos CD3+ fueron purificados de TILs provenientes de tumores de ambos grupos mediante perlas magnéticas. La expresión de IL10, IFN γ y Foxp3 se analizó por RT-PCR. Mientras que el 100% de los TILs CD3+ de tumores MAT-LU expresaron Foxp3, una menor expresión de este gen se observó en TILs CD3+ de tumores MAT LU+LPS (30%). Un fenómeno similar se observó al analizar la expresión de IL10. Contrariamente, la expresión del gen de IFN γ fue mayor en el grupo MAT-LU+LPS con respecto al grupo MAT-LU. Estos resultados indican un cambio en el fenotipo de los TILs presentes en el grupo MAT-LU+LPS, sugiriendo que la señalización vía TLR4 favorecería la respuesta antitumoral.

NEUROCIENCIAS II

- 285. (72) TRATAMIENTO CON AMITRIPTILINA EN ANIMALES SOMETIDOS A ESTRÉS CRÓNICO: EFECTO SOBRE CATECOLAMINAS E ÍNDICES DE ANSIEDAD.** COTELLA EVELIN M. (1), LEVIN GLORIA M. (2), SUÁREZ MARTA MAGDALENA (1)

Fac. Cs. Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba (1) Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET) (2)

El estrés se define como el conjunto de reacciones fisiológicas que preparan a un organismo para la acción y se lo ha citado como precipitante de enfermedades emocionales, especialmente depresión. El modelo de estrés crónico y variado (ECV) de Katz ha permitido evaluar las respuestas fisiológicas y comportamentales de animales en situaciones de estrés y también constituye un modelo de depresión que permite el estudio de antidepresivos de administración crónica. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tratamiento con el antidepresivo tricíclico amitriptilina sobre los niveles de catecolaminas plasmáticas e índices de ansiedad en animales sometidos a ECV. Se utilizaron ratas Wistar macho de 50 días al comienzo del protocolo. El ECV consistió en 5 estresores distintos durante 24 días. La droga se aplicó como solución oral con una jeringa, de la misma manera se aplicó la solución de excipientes (vehículo) a otro grupo. Los índices de ansiedad se midieron con el test de laberinto en cruz elevada, el día previo al sacrificio. En el grupo sin ECV tratado con vehículo, hubo disminución de los niveles de catecolaminas y de ansiedad ($p < 0,05$) respectivamente, comparado con el grupo control (intacto). Este efecto puede explicarse por la habituación del animal a la manipulación diaria que se logró con la administración de la solución de excipientes. A su vez se observó que la amitriptilina no provocó cambios en los niveles de hormonas al comparar con animales tratados con vehículo, tanto en situación con o sin estrés. Por otro lado se observó una disminución de la ansiedad en animales estresados y tratados con el antidepresivo ya que estos pasaron significativamente más tiempo en brazos abiertos ($p < 0,05$). En conclusión el antidepresivo tricíclico amitriptilina no afectó a los niveles de catecolaminas plasmáticas en situaciones de estrés, pero tuvo un efecto ansiolítico en esos animales que no estaría relacionado con la concentración de estas hormonas.

- 286. (219) HINCHANDO POR SINCRONIZAR EL RELOJ CIRCADIANO: EN UN EXTREMO LAS MKPS Y EN EL OTRO LAS MEKS DISPUTAN EL CONTROL DE LAS MAPKS EN EL NSQ.** PIZZIO GASTÓN ALFREDO, GOLOBEK DIEGO ANDRÉS

Universidad Nacional de Quilmes

En mamíferos el reloj circadiano se encuentra en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo. Este reloj puede ser sincronizado por luz a través del tracto retino-hipotalámico. Entre las señales activadas por la luz en los NSQ se encuentran las tres MAP quininas (MAPK) clásicas: ERK, JNK y p38, cuya actividad varía a lo largo del día. En este trabajo evaluamos si el control circadiano y fótico de las MAPK es por activación vía quininas (MEK1/2 y MEK3/6 específicas de ERK y p38 respectivamente) o por inactivación vía fosfatasa duales (MKP1/2 nuclear y MKP3 citoplasmática). Se utilizaron hámsteres bajo condiciones de luz:oscuridad L:O 14:10 h o de oscuridad constante O:O. Un grupo recibió pulsos de luz (10 min, 700 lux) en el día subjetivo (hora circadiana, CT, 6) o noche subjetiva (CT18, la hora en que la luz sincroniza al reloj). Se analizaron los efectos sobre la activación transcripcional de MKP1/2 y MKP3 por inmunohistoquímica y western blot, respectivamente, y la activación posttranscripcional de MEK1/2 y MEK3/6 por western blot. La expresión de MKP3 en los NSQ no presentó variación circadiana a CT6, CT13.5 y CT18 (ANOVA, $p > 0.05$). La fosfatasa MKP1/2 no presentó expresión basal bajo L:O u O:O, pero fue activada por pulsos de luz a CT18

(control: $4,6 \pm 3$ células, 30 min post-pulso 67 ± 9 células, 60 min post-pulso 163 ± 30 ; ANOVA: $p < 0.03$; 60 min post-pulso vs. Control: $p < 0.01$, prueba de Tukey) y no a CT6. La quinasa MEK3/6 se encuentran más fosforiladas y por lo tanto más activas durante el día (ZT6; $1,123 \pm 0,123$ u.a.) que en la noche (ZT18; $0,836 \pm 0,094$ u.a.). El estado de fosforilación de MEK1/2 no varió a lo largo del día. En conclusión, la regulación circadiana y fótica de MAPKs comprende tanto su activación por fosforilación como su inactivación por defosforilación a través de un proceso complejo que implica la participación de diversos tipos de fosfatasa y quinasa, así como la compartimentalización subcelular.

- 287. (234) EL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO AUMENTA LA SUPERVIVENCIA DE NUEVAS NEURONAS Y DISMINUYE LAS CÉLULAS PICNÓTICAS Y LAS NG2+ EN EL GIRO DENTADO DE RATONES DIABÉTICOS POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ).** BEAUQUIS JUAN, GARAY LAURA, LABOMBARDA FLORENCIA, GONZÁLEZ SUSANA, HOMO-DELARCHE FRANCOISE, DE NICOLA ALEJANDRO F, SARAVIA FLAVIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental - Fac de Medicina UBA, CNRS 7059 París, Francia

La diabetes mellitus se acompaña de numerosas alteraciones cerebrales que conforman la encefalopatía diabética y comparte otras encontradas en modelos de depresión. En trabajos anteriores hemos reportado que en ratones diabéticos por STZ, el tratamiento por 10 días con el antidepresivo fluoxetina (FXT, 10 mg/kg peso) era capaz de corregir la disminuida proliferación hipocampal y evitar la pérdida de neuronas del hilio del giro dentado (GD). En el presente trabajo, utilizando administración de bromodesoxiuridina (10 días antes del sacrificio, ip. 250mg/kg peso) y posterior inmunodetección en cortes de hipocampo, se encontró que el tratamiento con FXT aumentaba la supervivencia de nuevas células en ratones diabéticos (controles, $ctl: 718.7 \pm 99.1$, $ctl+FXT: 604.6 \pm 37.4$, diabéticos, $db: 432.3 \pm 73.5$ $p < 0.05$ vs ctl , $db+FXT: 1342 \pm 272.9$ células BrdU+/GD $p < 0.005$ vs db). Como indicador de muerte celular, en el grupo diabético se encontró mayor cantidad de células picnóticas en el GD que en los controles, las que fueron disminuidas por FXT ($ctl: 65.6 \pm 5.1$, $ctl+FXT: 56 \pm 18.86$, $db: 152 \pm 16.91$ $p < 0.01$ vs ctl , $db+FXT: 86.13 \pm 10.62$ células picnóticas/GD $p < 0.01$ vs db). Las células que expresan el proteoglicano NG2 son consideradas precursores gliales y el aumento del número estaría asociado a procesos degenerativos. En el hilio del GD de los animales diabéticos encontramos un incremento en el número de células NG2 y el tratamiento con FXT lo disminuyó a valores controles. Estos resultados aportan clara evidencia de las perturbaciones del hipocampo en la diabetes experimental -menor génesis y supervivencia neuronal en el GD, mayor muerte celular y presencia de precursores gliales- y muestran el efecto protector del tratamiento antidepresivo sobre estos parámetros. La desregulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y los altos niveles de glucocorticoides circulantes serían elementos cruciales del impacto de la enfermedad sobre el SNC a la vez que comunes denominadores de procesos depresivos.

- 288. (412) LA HIPOTERMIA PREVIENE LOS CAMBIOS A LARGO PLAZO INDUCIDOS POR LA ASFIXIA PERINATAL EN SINAPSIS NEOTRIATALES DE RATA.** CEBRAL ELISA, BOTTI VALERIA, SARACENO EZEQUIEL, AON LAURA, FERNANDEZ JUAN CARLOS, FERNANDO GATO, LOIDL FABIAN, VALVERDE G DE ANDRADE DEYSE, SAMPAIO GEORGE E, GIRALDEZ LISANDRO, COIRINI HECTOR, CAPANI FRANCISCO

IBYME-CONICET; Bioquímica Humana, Facultad de Medicina-UBA IBCYN; Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Universidade Federal Da Bahia, Salvador, Brasil

Un proceso hipóxico-isquémico produce daño en las proteínas que forman parte de la estructura sináptica produciendo altera-

ciones en su función y finalmente generando déficit neurológicos. Por otro lado la hipotermia es hasta el momento uno de los tratamientos mas efectivos para la injuria cerebral. En estos estudios nosotros reportamos alteraciones en la densidad post-sináptica (DPS) del neostriado de rata de 6 meses sometidos a diferente tiempo de perinatal asfixia (AP) usando la tinción con ácido fosfotúngstico (E-PTA) combinando microscopia electrónica en dos dimensiones y en tres dimensiones. Además se estudio el efecto de la hipotermia a 15°C sobre las alteraciones sinápticas. El análisis de la curva de tiempo de la injuria cerebral inducida por AP mostró un incremento temprano del espesor de la DSP empezando en los AP 10 min. (20% del control, $p < 0.01$) y llegando a su máximo en los AP 20 minutos (93% del control, $p < 0.01$). El análisis utilizando tomografía electrónica y reconstrucción en 3-D confirmó las observaciones hechas con microscopia electrónica convencional pero además mostró alteraciones en el marco proteico de las sinapsis con claros signos de desintegración. Utilizando inmunomicroscopia electrónica observamos un aumento de la ubiquinización de las densidades post-sinápticas asfícticas sugiriendo que la AP produce alteraciones en la conformación proteica de la sinapsis a largo plazo. Estos datos fueron confirmados con western blot. Utilizando el tratamiento hipotérmico todos los cambios observados fueron prevenidos. Estos datos sugieren que las sinápticas después de la AP estan altamente modificadas. Debido a que observamos la formación de proteínas ubiquitinizadas nosotros pensamos que el sistema ubiquitina-proteosoma falla en reparar las proteínas y finalmente estas se acumulan en las sinapsis dañandolas. Finalmente la reducción de la temperatura protege a las sinapsis del daño inducido por el insulto hipóxico-isquémico. (ANPCYT 15001; PRODOC/FAPESB 016/2004, FAPESB/CNPq 159/2003, CONICET 5784)

289. (413) EFECTO NEUROPROTECTOR DE ANEMO-POEGMA MIRANDUM (CATUABA) EN LA TOXICIDAD INDUCIDA POR LA ROTENONA EN NEUROBLASTOMAS NB-SY5Y. VALVERDE G. DE ANDRADE DEYSE, MADUREIRA DE OLIVEIRA DIEGO, SAMPAIO GEORGE EMÍLIO, SARACENO EZEQUIEL, BOTI VALERIA, FERNANDEZ JUAN CARLOS, GATO FERNANDO, COIRINI HECTOR, CAPANI FRANCISCO, GIRALDEZ LISANDRO

Laboratorio de Neuroquímica e Biología Celular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil Instituto Cajal, CSIC, Madrid, España IBCYN, Facultad de Medicina-UBA IByME-CONICET IBCYN, Departamento de Bioquímica, Facultad De Medicina, UBA

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto neuroprotector de un extracto de Anemopoegma mirandum (CATUABA), un árbol utilizado en la medicina popular brasilera, en un modelo experimental de la Enfermedad de Parkinson (EP) y que consiste en la aplicación del herbicida rotenona en cultivos de neuroblastomas humanos (NB-SY5Y). Los NB-SY5Y fueron cultivados a 37°C en DMEM/F12 durante 72 horas a una densidad de 20.000 células/pozo y luego tratadas por 48 horas con rotenona 300 nM y/o el extracto de CATUABA disuelto en dimetilsulfóxido a las concentraciones de 0.031; 0.625 y 1.25 mg/µl. La viabilidad celular fue cuantificada usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Los cambios en la morfología nuclear y celular fueron evaluados usando microscopia de contraste de fase. Para la cuantificación de la apoptosis fue utilizado Hoechst 33258. Condensación y/o fragmentación nuclear fueron los indicadores de células en estado apoptótico. Cuando los NB-SY5Y fueron tratados con rotenona 300 nM se observó una mortalidad del 35% respecto a los controles. Los estudios de Hoescsht 33258 mostraron retracción del cuerpo celular seguido de condensación y fragmentación de la cromatina nuclear. Cuando los NB-SY5Y fueron tratados con rotenona en presencia del extracto de CATUABA no se observó mortalidad celular o cambios morfológicos estadísticamente significativos con respecto a los controles. El extracto de catuaba no causo efectos citotóxicos significativos en las concentraciones estudiadas. Los resultados indicaron que los extractos de Anemopoegma mirandum (CATUABA) presentan

un posible potencial farmacológico para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson, siendo de interés el estudio de los mecanismos moleculares que participan en los efectos de neuro-protección observados. (PRODOC/FAPESB 016/2004, FAPESB/CNPq 159/2003, UBACYT M020, CONICET 5784, ANPCyT 15001)

290. (414) EVIDENCIA DEL DAÑO EN EL DNA DE CÉLULAS DE RATA TRATADAS CON EL PRO-OXIDANTE CATECOL SAMPAIO GEORGE EMILIO, GOMES COUTINHO LEONAM, DOS SANTOS EL-BACHÁ RAMON, GIRALDEZ ALVAREZ LISANDRO DIEGO, VALVERDE G. DE ANDRADE DEYSE, MADUREIRA DE OLIVEIRA DIEGO, CAPANI FRANCISCO, FASSARELLA AGNEZ LIMA LUCYMARIA, TABOSA DO EGITO ERYVALDO SÓCRATES

Instituto Cajal, CSIC. España, Madrid; Departamento de Biología Celular e Genética. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Brasil; Laboratorio de Neuroquímica e Biología Celular. Universidade Federal da Bahia. Salvador – Bahia, Brasil; IBCYN Facultad de Medicina-UBA; Laboratório de Sistemas Dispersos (Lasid). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – Brasil

El catecol es un agente genotóxico que induce daño del DNA por una vía oxidativa. Para estimar la toxicidad del catecol en el daño del DNA, células de cerebro de rata fueron incubadas a 37 °C durante 20 minutos con concentraciones crecientes de catecol. El estudio del cometa fue utilizado para analizar el daño del DNA siendo las células clasificadas de 0 a 4 de acuerdo al daño observado. La longitud de la cola fue medida para cuantificar la magnitud del daño. Los resultados sugieren que las células de cerebro de rata son sensibles a la toxicidad inducida por catecol en una forma dosis-tiempo dependiente como fue observado por el incremento de la longitud de la cola cuando las células fueron sometidas a una simple electroforesis alcalina. Además, un incremento es observado en la formación de los cometas de nivel 2 y 4. Cuando las células fueron tratadas en presencia de 10 mM de catecol, el daño en el DNA fue considerablemente mayor respecto a los controles negativos, representando un incremento de 200% en el daño, incluso con peróxido de hidrogeno usado como control positivo, cuando se observó un daño en el DNA de 150% respecto a los controles negativos. En el presente trabajo, el daño observado en el DNA puede ser debido probablemente a la generación de semiquinonas y quinonas reactivas (PRODOC/FAPESB 016/2004, FAPESB/CNPq 159/2003, UBACYT M020, CONICET 5784, ANPCyT 15001)

291. (415) GUARANA (PAULLINIA CUPANA) PRESENTA EFECTOS DE NEUROPROTECCION EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON. VALVERDE G. DE ANDRADE DEYSE, MADUREIRA DE OLIVEIRA DIEGO, SAMPAIO GEORGE EMÍLIO, CAPANI FRANCISCO, GIRALDEZ LISANDRO

Laboratorio de Neuroquímica e Biología Celular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil; Instituto Cajal, CSIC, Madrid, España; IBCYN Facultad de Medicina-UBA

El objetivo de este trabajo fue analizar si un extracto de GUARANA (Paullinia Cupana), presenta efectos neuroprotectores en un modelo experimental de la Enfermedad de Parkinson (EP) que consiste en la aplicación del herbicida rotenona en cultivos de neuroblastomas humanos NB-SY5Y. Los NB-SY5Y fueron cultivados a 37 °C en DMEM/F12 durante 72 horas en una densidad de 20.000 células/pozo y luego tratadas por 48 horas con rotenona 300 nM y/o el extracto de GUARANA disuelto en dimetilsulfóxido en las concentraciones de 0.031; 0.625 y 1.25 mg/µl. La viabilidad celular fue cuantificados usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Los cambios en la morfología nuclear y celular fueron evaluados usando microscopia de contraste de fase. Para la cuantificación de la

apoptosis fue utilizado Hoechst 33258. Condensación y/o fragmentación nuclear fueron los indicadores de células en estado apoptótico. El tratamiento con rotenona (300 nM) produjo 35% de mortalidad celular respecto a los controles. Los estudios de Hoecscht 33258 mostraron retracción del cuerpo celular seguido de condensación y fragmentación de la cromatina nuclear. Los NB-SY5Y tratados con rotenona en presencia del extracto de GUARANA no presentaron mortalidad o cambios morfológicos estadísticamente significativos con respecto a los controles. El extracto de GUARANA no produce efectos citotóxicos significativos en las concentraciones estudiadas. Los resultados mostraron que los extractos de GUARANA (Paullinia Cupana) presentan un posible potencial farmacológico para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson, siendo de interés el estudio de los mecanismos moleculares que participan en los efectos de neuroprotección observados (PRODOC/FAPESB 016/2004, FAPESB/CNPq 159/2003, UBACYT M020, CONICET 5784, ANPCyT 15001)

292. (474) MODULACIÓN A LARGO PLAZO DE LA ACTIVIDAD Y LA EXPRESIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA (TH) POR ENDOTELINA-1 Y -3 (ET1 Y ET3) EN HIPOTÁLAMO ANTERIOR Y POSTERIOR (HA E HP) DE RATA. PERFUME GUADALUPE, NABHEN SABRINA, BATISTONE AGUSTINA, HOPE SANDRA I., BIANCIOTTI LILIANA G., VATTA MARCELO S.

Cát. de Fisiología, (IQUIMEFA-CONICET) Fac de Farmacia y Bioq. UBA

Previamente mostramos que a largo plazo las ETs disminuyen en HA la actividad de TH por un receptor ETB y en HP la aumentan por un receptor atípico. Con el fin de continuar los estudios, determinamos las vías intracelulares involucradas en la respuesta de las ETs sobre la actividad y expresión de TH. Los HA e HP se incubaron durante 360 min en ausencia o presencia de ETs y de inhibidores de vías intracelulares. Se determinó la actividad de TH por método radioenzimático y los niveles de TH total y de los sitios fosforilados por Western Blot. Los resultados se expresan como % vs control \pm ES (ANOVA y test de Student-Newman-Keuls, * $p < 0.05$; $n = 5-8$). En HA, la disminución de la actividad de TH producida por ambas ETs 10nM se bloqueó en presencia de L-NAME 10uM (C:106.1 \pm 6.8 vs ET1:96.7 \pm 5.8 y ET3:101.9 \pm 3.0) y U73122 10uM (C:100.0 \pm 2.5 vs ET1:100.2 \pm 4.6 y ET3:101.07 \pm 3.5) (inhibidores de NOS y PLC, respectivamente). Las ETs disminuyeron los niveles de TH total (C:100.0 \pm 2.2 vs ET1:57.0 \pm 15.2* y ET3:54.1 \pm 6.1*), pSer19(C:100.0 \pm 1.8 vs ET1:81.4 \pm 5.9* y ET3:49.6 \pm 5.3) y pSer40(C:100.0 \pm 10.1 vs ET1:68.4 \pm 2.5* y ET3:41.9 \pm 6.8*) sin afectar pSer31(C:100.0 \pm 8.5 vs ET1:78.5 \pm 5.9* y ET3:79.2 \pm 1.7). En HP el aumento de la actividad de TH inducida por ETs se bloqueó en presencia de H-89 500nM (inhibidor de PKA) (C:100.0 \pm 2.0 vs ET1: 89.9 \pm 2.3 y ET3:111.1 \pm 2.0) y U73122 (C:100.0 \pm 9.1 vs ET1:110.7 \pm 5.2 y ET3:104.6 \pm 3.8). Las ETs aumentaron los niveles de TH total (C:100.0 \pm 0.8 vs ET1:150.4 \pm 13* y ET3:160.2 \pm 12*), pSer19 (C:100.0 \pm 7.5 vs ET1:131.3 \pm 6.3* y ET3:135.6 \pm 6.1*), pSer31 (C:100.1 \pm 6.4 vs ET1:132.8 \pm 3.5* y ET3:132.5 \pm 5.7*) y pSer40 (C:100.0 \pm 10 vs ET1:139.8 \pm 1.1* y ET3:183.0 \pm 3.4*). Concluimos que en HA las ETs disminuyen tanto la actividad de TH a través de la vía del óxido nítrico y los fosfoinosítidos así como los niveles de TH total, pSer19 y pSer40. En HP las ETs incrementan la actividad enzimática a través de la vía de la PKA y los fosfoinosítidos y aumentan la expresión de TH total y de los sitios fosforilados.

293. (480) PROGESTERONA (PROG) ATENUA LA RESPUESTA ASTROCITARIA A LA INJURIA Y LA EXPRESIÓN DE AQP4, UN MEDIADOR DEL EDEMA EN LA MEDULA ESPINAL LESIONADA. MOUGEL ANALIA VERONICA (1) (2), GONZALEZ SUSANA (1) (3), LIMA ANALIA (1), ROIG PAULINA (1), DE NICOLA ALEJANDRO (1) (2) (3)

IByME - CONICET (1) UBA - Facultad de Medicina (3) IUCS - Fundación H. A. Barcelo (2)

PROG tiene efectos neuroprotectores en modelos de trauma del sistema nervioso central. Tras la injuria traumática de la médula espinal (ME) se genera astrocitosis reactiva, aumenta la expresión de GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía) y pErk (extracelular regulated kinase), y se activa ERK/MAP (implicada en funciones importantes para el fenotipo glial reactivo). Además, la ME responde a la injuria con aumento del flujo de agua y edema; así las acuaporinas (AQP4) pueden desempeñar un rol fundamental en la homeostasis de la ME, expresándose en la astrogliá reactiva. Utilizando un modelo de transección espinal completa (TRX) y una dosis de PROG de 16 mg/kg, observamos: a) aumento del nº de astrocitos GFAP+ (TRX: $p < 0.001$ vs. control -CTL-), indicando astrogliosis reactiva que disminuye a valores normales con el tratamiento (TRX+PROG: $p < 0.001$ vs. TRX); b) reducción del 90% en la colocalización de GFAP/pErk con PROG (TRX+PROG $p < 0.001$ vs. TRX), indicando que pErk es una vía probable de señalización intracelular de PROG; c) aumento del nº de procesos vasculares AQP4+ (TRX $p < 0.001$ vs. CTL), que disminuye siguiendo el patrón de GFAP (TRX+PROG $p < 0.001$ vs. TRX), y aumento en la colocalización de GFAP/AQP4 en TRX (TRX: $p < 0.001$ vs. control -CTL- y CTL+PROG), que se reduce a valores normales con PROG (TRX+PROG $p < 0.001$ vs. TRX); d) la elevada expresión de AQP4 se correlaciona con un aumento del 5% en el agua contenida en la ME a 24 hs, y del 7% a 72hs pos-TRX (CTL $p < 0.001$ vs. TRX-24hs y TRX-72hs). En conjunción con datos previos, se sugiere que la atenuación por PROG de la respuesta astrocitaria a la injuria y de la expresión de AQP4, acompaña al aumento de la supervivencia y funcionalidad de motoneuronas. La disminución de la astrogliosis evitaría la formación de la cicatriz glial (obstáculo para la regeneración axonal), mientras que la disminución de AQP4 desempeñaría un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la ME.

294. (481) LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 (STX2) AFECTÓ LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA Y LA PROTEÍNA FIBRILAR GLIAL ÁCIDA (GFAP). BOCCOLI JAVIER, LOPEZ-COSTA JUAN J., PISTONE CREYDT VIRGINIA, IBARRA CRISTINA, LOIDL FABIÁN C., GOLDSTEIN JORGE

Lab. de Fisiopatología, Fac. Medicina, UBA; Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof Eduardo De Robertis", Facultad de Medicina, UBA

La toxina Shiga (Stx) producida por *Escherichia coli* enterohemorrágica causa colitis hemorrágica que puede derivar en Síndrome Hemolítico (SUH). Las muertes en la etapa aguda de la enfermedad en Argentina (2,4%) se debieron mayoritariamente a fallas neurológicas. Previamente demostramos que la administración icv de Stx2 altera la ultraestructura neuronal y glial observada por microscopía electrónica (Pistone Creydt y col., SAIC 2005, Medicina, 65 Supl. II, pp.136). El presente trabajo estudia la expresión de marcadores neuronales y gliales involucrados en dicha injuria. Microinyectamos en cerebros de ratas SD machos 250-300g via icv Stx2 purificada por cromatografía de afinidad en un título de 10E8 DC50 en células Vero. Luego de 8 días los animales fueron anestesiados y perfundidos para estudiar los niveles de expresión de la NOS, GFAP y la distribución de Stx2. La técnica de la NADPH-diaforasa mostró una disminución en el número de neuronas NOS positivas y en la actividad enzimática ($p < 0.01$) de la NOS en el cuerpo estriado y en la corteza cerebral, medidos por densitometría con el programa Scion image. Un efecto opuesto se encontró en el núcleo paraventricular hipotalámico ($p < 0.01$). Imágenes de microscopía confocal mostraron, en astrocitos hipertrofiados que contactaban neuronas Stx2 positivas, un aumento en la expresión de GFAP en hipocampo. En astrocitos también se observó la colocalización de la expresión de GFAP aumentado con la presencia de Stx2. Concluimos que el daño neuroglial causado por la acción icv de la Stx2 está asociado con cambios en la expresión y actividad de la NOS en neuronas y en la expresión de GFAP en astrocitos.

- 295. (565) AGENTES PORFIRINOGENICOS: SU ACCION SOBRE EL METABOLISMO DEL OXIDO NITRICO Y EL SISTEMA GLUTAMAERGICO.** LAVANDERA JIMENA VERÓNICA (1), FOSSATI MARIANA (2), AZCURRA JULIO (2), BATLLE ALCIRA (1), BUZALEH ANA MARIA (1,3)

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET- Hospital de Clinicas Jose de San Martín, Universidad de Buenos Aires (1) Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (2) Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (3)

La patofisiología del ataque agudo en las Porfirias se debería a efectos tóxicos de las porfirinas o sus precursores en el SNC y/o a niveles bajos de hemo como cofactor de la Óxido Nítrico sintetasa (NOS); siendo las drogas los principales desencadenantes. El ácido 5-aminolevulíco (ALA) estaría involucrado en las disfunciones neurológicas; además inhibe la captación de glutamato, afectando la neurotransmisión glutamaérgica. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de conocidas drogas porfirinogénicas sobre el metabolismo del óxido nítrico y el sistema glutamaérgico en ratones. Se midió actividad de NOS en citosol y mitocondria de hígado y encéfalo de ratones tratados con anestésicos, alilisopropilacetamida (AIA), etanol, griseofulvina (Gris) o ALA. Los niveles del receptor N-Metil-D-aspartico (NMDA) se determinaron en corteza y cerebelo por el ensayo de unión del ligando (3H)MK-801. La actividad de NOS varió según el xenobiótico utilizado. La anestesia crónica con Enflurano e Isoflurano incrementó 40-48% ($p < 0,05$) la actividad citosólica hepática ($VC=3,6\pm 0,8$ nmol/mg) y 35% ($p < 0,05$) la NOS mitocondrial de encéfalo ($VC=3,0\pm 0,5$ nmol/mg). El etanol aumentó 37% ($p < 0,05$) la actividad mitocondrial de encéfalo, sin alterar la enzima citosólica hepática. La Gris oral indujo 55% ($p < 0,05$) la NOS mitocondrial hepática ($VC=2,3\pm 0,6$ nmol/mg). Contrariamente, el ALA crónico redujo 30-50% ($p < 0,05$) la NOS hepática y 28% ($p < 0,05$) la actividad citosólica en encéfalo ($VC=4,3\pm 0,8$ nmol/mg). El etanol aumentó 40% los niveles de NMDA en cerebelo, mientras que AIA y la administración aguda de anestésicos y ALA disminuyeron 35-50% dichos valores. En conclusión, los resultados aquí descriptos junto con los obtenidos previamente indicarían que las drogas porfirinogénicas tendrían una amplia acción en cerebro afectando diversos metabolismos. Este hecho sería la razón por la cual es difícil establecer los mecanismos que conducen a las manifestaciones neurológicas presentes en la Porfiria.

- 296. (409) LAS NEUROTROFINAS MODULAN LA NEUROTRANSMISIÓN NORADRENÉRGICA A TRAVÉS DE DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.** RODRÍGUEZ FERMEPÍN MARTÍN, TRINCHERO MARIELA, BELTRÁN ANDREA, MINETTO JULIA, FERNÁNDEZ BELISARIO

Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

En trabajos anteriores demostramos que el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) y la Neurotrofina 4 (NT4) modulan la transmisión simpática en el hipotálamo de rata modificando la captación y liberación neuronal de noradrenalina (NA). En el presente trabajo estudiamos las vías de segundos mensajeros involucrados en esta modulación. Las técnicas de captación (Cap) y liberación estimulada (Lib Est) de NA se realizaron de acuerdo a la metodología desarrollada en nuestro laboratorio. La vía de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) se inhibió con LY 294002 (LY) y la de la fosfolipasa C (PLC) con U73122 (U). Los resultados ($X\pm ESM$) de captación de NA se expresan como dpm/ μ g de proteína y los de liberación estimulada como E/B. Se utilizó el test "t" y ANOVA con test a posteriori de Bonferroni y los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos. Resultados: la NT4 disminuyó la captación y la liberación estimulada de NA en la zona hipotalámica anterior (ZHA), estos efectos se revirtieron en presencia de LY y no de U (Cap: Control (C): $9,21\pm 0,86$; NT-4: $7,32\pm 0,54^*$ y NT4+LY: $10,02\pm 1,03\#$. Lib Est: C: $2,03\pm 0,32$; NT4:

$1,56\pm 0,32^*$ y NT4+LY: $2,11\pm 0,09\#$). Por su parte el BDNF aumentó la captación y disminuyó la liberación estimulada de NA en la ZHA, efectos revertidos por U y no por LY (Cap: C: $7,10\pm 0,51$; BDNF: $8,83\pm 0,76^*$ y BDNF+U: $6,71\pm 0,41\#$. Lib Est: C: $2,56\pm 0,18$; BDNF: $1,55\pm 0,02^*$ y BDNF+U: $1,98\pm 0,18\#$). * $P < 0,05$ vs C, # $P < 0,05$ vs NT4 y $\$ P < 0,05$ vs BDNF. Conclusión: el BDNF y la NT4 se unen al receptor TrkB, sin embargo las vías de segundos mensajeros que activan son diferentes; esto explicaría el efecto opuesto sobre la captación de NA. Dado que la liberación de NA es un proceso regulado por múltiples pasos, es factible que ambas NT generen el mismo efecto por diferentes señales intracelulares. Las NT modularían la transmisión noradrenérgica hipotalámica regulando la disponibilidad de NA en el espacio sináptico frente a un determinado estímulo.

- 297. (646) CAMBIOS DE LA INMUNOREACTIVIDAD PARA EL FACTOR NEUROTROFICO DEL CEREBRO (BDNF) POR PROGESTERONA (PROG) EN MEDULA CERVICAL DE WOBBLER (WR), MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE MOTONEURONA.** GONZALEZ DENISELLE MARIA CLAUDIA (1) (2), GARAY LAURA INES (1) (2), GONZALEZ SUSANA LAURA (1) (2), LIMA ANALIA (1), ROIG PAULINA (1), DE NICOLA ALEJANDRO FEDERICO (1) (2)

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET (1), Facultad de Medicina, UBA (2)

La PROG ejerce efectos neuroprotectores en la injuria y degeneración del sistema nervioso central. Estos efectos podrían depender de la regulación de la mielinización sobre glia o acción sobre diversos parámetros neuronales. Estudios recientes señalan a las neurotrofinas como mediadoras de la acción hormonal. Previamente, demostramos que PROG modula positivamente la expresión del ARNm para BDNF en motoneuronas de Wr. Aquí, estudiamos los efectos de PROG sobre la expresión y distribución de la proteína en médula cervical. Se realizó inmunofluorescencia para BDNF y analizó por microscopía confocal. Experimentalmente, un grupo de ratones Wr recibió un pellet de PROG de 20 mg x 60 días y, un grupo de controles y Wr permaneció libre de tratamiento. Observamos que PROG indujo una redistribución subcelular de BDNF: mientras que controles y Wobbler no tratados presentaron predominio de neuronas con marca perinuclear e intranuclear de BDNF, la PROG en Wr incrementó un 220% las neuronas con gránulos citoplasmáticos BDNF+. Se cuantificó el n° de neuronas que presentaron gránulos citoplasmáticos en imágenes de 6 planos obtenidas en el eje Z (control: 61.50 ± 0.63 células/mm², Wr: 68.22 ± 10.94 céls/mm², p: NS; Wr+PROG: 151.5 ± 11.24 céls/mm²; $p < 0.01$ vs control y $p < 0.001$ vs Wr). Las motoneuronas que regulan la función muscular a nivel C3-C5 se identificaron por marcación con el transportador retrógrado fluorogold y colocalización con BDNF. En Wr, el 21% de las neuronas son fluorogold/BDNF+, mientras que en controles y Wr+PROG se observó una colocalización del 27%. Además, las motoneuronas se reconocieron por inmunohistoquímica para colina-acetil transferasa (ChAT), enzima marcador de este tipo celular. Un 66% de las neuronas controles y 62% de Wr presentaron fenotipo ChAT/BDNF. Conclusiones: La modulación del factor neurotrófico en motoneuronas podría ser un mecanismo indirecto de neuroprotección de PROG en estas enfermedades devastadoras.

- 298. (677) REGULACIÓN GÉNICA DE LA ENZIMA CITOCROMO P450SCC POR ESTRÓGENO Y PROGESTERONA EN HIPOTÁLAMO MEDIO BASAL DE LA RATA HEMBRA.** GIULIANI FERNANDO, CABRERA RICARDO

LINCE-IMBECU-CONICET

Citocromo P450scc (P450scc) es la enzima limitante de la vía neuroesteroidogénica presente en neuronas y glia en el SNC. Previamente demostramos que los neuroesteroidos modulan la actividad neuroglial involucrada en la activación de neuronas LHRH, por lo que serían importantes reguladores de la función reproductiva en la rata hembra. Poco se conoce acerca del con-

rol de la expresión génica de las enzimas neuroesteroidogénicas y en particular de la P450scc por parte de las hormonas gonadales. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión diferencial de P450scc posterior a la administración de estrógeno (E2), progesterona (Pg) y durante los distintos estadios del ciclo estrual de la rata hembra. Para ello se midieron por RT-PCR semi-cuantitativa los niveles de ARNm de P450scc en hipotálamo de ratas hembras de la cepa Sprague Dawley ovariectomizadas (OVX), OVX impregnadas con E2 (OVXE) y OVX impregnadas con E2 y Pg (OVXEP), como también de ratas en proestro (P), estro (E), diestro 1 (D1) y diestro 2 (D2). Los valores se normalizaron en relación a ciclofilina, se expresaron como unidades ópticas relativas y se analizaron estadísticamente con ANOVA1 y Student-Newman Kewls. La expresión génica de P450scc aumentó en el grupo OVX con respecto a OVXEP (0.26 ± 0.03 vs 0.43 ± 0.04 ; $p < 0.05$) y OVXE con respecto a OVXEP (0.26 ± 0.03 vs 0.57 ± 0.08 ; $p < 0.01$). No hubo diferencias entre los diferentes estadios estruales. Concluimos que las hormonas gonadales endógenas guardarían una estrecha relación en el control de la neuroes-teroidogénesis hipotalámica, aumentando la expresión génica de P450scc inducida por E2 o inhibiendo en el caso de Pg. Dicha expresión dependería de las concentraciones circulantes E2 de y Pg ya que no hubo modificaciones en función de los niveles hormonales gonadales del ciclo estrual. El control de la expresión génica de la neuroesteroidogénesis en el hipotálamo sería limitado por la acción de las hormonas gonadales durante el ciclo reproductivo de la rata hembra.

299. (295) ONTOGÉNESIS DE JNK, P38 Y ERK EN EL SNC.
VACOTTO MARINA, FISZER DE PLAZAS SARA

Instituto de Biología Celular y Neurociencias

Durante el desarrollo del SNC las vías de señalización presentes tienen relevancia tanto en la correcta neurotransmisión, como en la sensibilidad diferencial de cada uno de los estadios en relación a las alteraciones del medio externo. Las vías de JNK y p38 pueden desencadenar muerte celular programada (MCP) cuando son activadas por stress externo, mientras que la cascada de ERK es activada en respuesta a factores de crecimiento y mitogénicos produciendo división y proliferación celular. El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar el perfil de expresión de las MAPK'S JNK, p38 Y ERK en su forma activa fosforilada (relativizada a su forma nativa), durante el desarrollo embrionario del lóbulo óptico (LO) de pollo. A tal fin, se desarrollaron desde el día embrionario (DE) 10 al 20 determinaciones de Western Blot en fracciones citosólicas de LO. Las determinaciones muestran que se produce un incremento dual en la expresión de P-JNK en el DE 12 y DE 18 ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, $n=4$, respectivamente), sin alteraciones en los niveles de JNK en todos los DE analizados. Por otro lado, la expresión ontogénica de P-p38 revela que no hay alteraciones en los estadios tempranos (DE 10 a 14) y que comienza a disminuir significativamente a partir del DE 16 alcanzando el máximo en el DE 20 ($p < 0.01$, $n=4$), sin modificaciones de los niveles de p38 nativa. Los niveles de P-ERK son altos sólo en el DE 16, siendo los niveles de ERK nativa significativos en los DE 16, 18 y 20 ($p < 0.01$ en todos los DE). En conclusión, los resultados sugieren que las 2 MAPK'S proapoptóticas evaluadas se comportan diferente en el desarrollo del SNC, siendo en los estadios tempranos más significativa la presencia de P-JNK correlacionando con una marcada remodelación celular, y en contraparte en los estadios medios a tardíos se estaría inhibiendo la actividad P-p38. El análisis de los niveles de P-ERK activa sólo en el DE 16 sugiere su participación en los procesos de proliferación celular.

ONCOLOGÍA IV

300. (74) INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE NEOPLASIAS DE MAMA POR EL VIRUS POLIOMA. GOLDSCHMIDT EZEQUIEL, SANJUAN NORBERTO

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA

El cáncer de mama constituye una de las causas principales de muerte en ginecología. Para la mejor comprensión de su patogenia se han desarrollado modelos experimentales inducidos por hormonas o por factores fisicoquímicos. En este trabajo hemos estudiado el desarrollo de neoplasias de mama en ratones hembras inducidas por el virus polioma. Ratones C3H/BIa de menos de 24 horas de edad fueron inoculados en forma subcutánea con 500.000 ufp de la cepa A2 de polioma mientras que un grupo control sólo recibió el sobrenadante de cultivos celulares no infectados. A los 10, 25 y 40 días post-infección (pi) y cuando se detectaron neoplasias macroscópicamente, se sacrificaron varios grupos de animales y se diseccionaron las glándulas mamarias Nº 4. Con una de las mamas se realizó una preparación de "glándula mamaria completa" mientras que con la otra se realizó la caracterización histológica y se detectó la presencia de polioma por inmunocitoquímica contra la proteína mayor de la cápside viral, VP-1. En las ratonas infectadas, a los 10 días pi se observaron bifurcaciones en los ductos con adenosis. A los 25 días aumentaron las ramificaciones y se observó hiperplasia ductal. A los 40 días los ductos presentaron aspecto arborescente y lesiones polipoideas intraductales. En el 100% de los animales infectados se desarrollaron posteriormente adenocarcinomas moderadamente diferenciados de mama, que en ningún caso fueron detectados en los controles. El antígeno viral fue detectado en las neoplasias en todos los animales con lesiones. Ninguna de estas lesiones fueron observadas en los grupos de control. Se concluye que polioma permite desarrollar un modelo de cáncer de mama altamente reproducible que facilita el estudio de cada uno de los estadios evolutivos de esta enfermedad.

301. (75) RELACIÓN ENTRE LA REPLICACIÓN RENAL, LA DISEMINACIÓN Y LA INDUCCIÓN DE NEOPLASIAS POR EL VIRUS POLIOMA MURINO. NICO ANGELES, SANJUAN NORBERTO

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, UBA

En los virus oncogénicos con DNA uno de los mayores interrogantes es la relación entre la replicación viral y la inducción de neoplasias. Luego de su inoculación en ratones neonatos existen cepas altamente oncogénicas de polioma y otras que no lo son. Se acepta que las cepas altamente oncogénicas son aquellas que primeramente replican en el ratón mientras que las no oncogénicas no pueden diseminarse en el animal. Sin embargo, esto dista mucho de haber sido demostrado. En este trabajo hemos comparado los patrones de diseminación viral y de replicación en su mayor órgano de amplificación (el riñón) de una cepa altamente oncogénica y una no oncogénica de polioma. Se inocularon ratones C3H BiDa por vía subcutánea con la misma dosis infectante de la cepa altamente oncogénica A2 o de la cepa no oncogénica RA. Desde el día 5 post infección (pi) hasta el día 55 pi se tomaron muestras de sangre y de orina de los ratones y se diseccionaron los riñones, que fueron procesados para su estudio histológico, inmunocitoquímico y ultraestructural. La detección de viremia y viruria se realizó por adsorción sobre cultivo de células NIH 3T3 y posterior IFI. Sorprendentemente, ambas cepas replicaron en los túbulos contorneados proximales y distales, los colectores y los túbulos de Henle, así como en el intersticio de la médula renal. Ambas cepas provocaron viruria desde el día 15 pi hasta el fin del experimento, pero sólo la altamente oncogénica provocó viremia. Ultraestructuralmente los virus fueron detectados en el sistema de endomembranas y como cuerpos de inclusión en las células renales. No obstante, sólo la cepa altamente oncogénica indujo sarcomas renales en el 13% de los animales mientras que la RA no lo hizo. Se concluye que no hay relación directa entre la amplificación renal y la capacidad oncogénica de polioma y que pueden existir determinantes moleculares de replicación diferentes a los asociados con la oncogénesis.

302. (78) EXPRESIÓN DE PPGALNAC T6 EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEZA Y CUELLO EXPRESIÓN DE PPGALNAC T6 EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEZA Y CUELLO. RABASSA MARTÍN ENRIQUE,

BEROIS NORA, MAZAL DANIEL, UBILLOS LUIS, OSINAGA EDUARDO, CROCE MARÍA VIRGINIA, SEGAL AMADA.

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP; Depto. de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

El inicio de la O-glicosilación de las proteínas es el resultado de la actividad de las ppGalNAc transferasas de las que se han descrito más de 20 isoenzimas diferentes. Estas son potenciales marcadores tumorales ya que alteraciones en la glicosilación se asocian con la adhesión celular, invasión y metástasis. El gen de la ppGalNAc T6 ha sido recientemente clonado y su papel en el fenómeno neoplásico es desconocido. Objetivo: Estudiar la expresión de ppGalNAc T6 en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC), lesiones preneoplásicas y mucosa normal de la misma localización. Se empleó inmunohistoquímica (IHQ) estándar y el anticuerpo monoclonal (AcMo) T6.3 que reconoce específicamente ppGalNAc T6. Se incluyeron muestras de 117 pacientes con CECC, 11 recurrencias, 9 lesiones preneoplásicas y 6 controles de individuos normales. Por otra parte, se estudió la expresión en las líneas celulares: HEP2 (cáncer de laringe) y MCF7 (cáncer de mama) por inmunocitoquímica (ICQ). Resultados: 49/117 (41,9%) de los tumores primarios fueron positivos, 6/6 (100%) de los normales, 8/9 (88,9%) de las lesiones preneoplásicas y 4/11 (36,4%) de las recurrencias. Se detectó una importante disminución de la expresión en lesiones neoplásicas (correlación de Kendall; $p < 0,05$) respecto de la mucosa normal y las lesiones preneoplásicas. En todos los casos la expresión fue citoplasmática. El análisis de las diferencias respecto de la edad, sexo, localización y estadio clínico demostró una pérdida de la expresión de ppGalNAc T6 en tumores con invasión ganglionar (correlación de Spearman, $p < 0,05$). Las líneas celulares dieron resultados positivos con el AcMo T6.3 mediante ICQ con un patrón de expresión citoplasmático. Conclusiones: Se constató una menor expresión de la ppGalNAc T6 en el CECC respecto del epitelio normal y displásico, la cual se asocia con una mayor diseminación ganglionar.

303. (79) MUCINAS Y ANTÍGENOS CARBOHIDRATOS EXPRESADOS POR TEJIDOS EPITELIALES NORMALES DE MAMA Y TRACTO DIGESTIVO. CROCE MARÍA VIRGINIA, ISLA-LARRAIN MARINA, RABASSA MARTÍN, CRESPO MARINA, COLUSSI ANDREA, LACUNZA EZEQUIEL, SEGAL-EIRAS AMADA

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

Se determinó la expresión de mucinas y epitopes carbohidratos asociados en epitelios normales de mama y tracto digestivo. Materiales y Métodos: se obtuvieron muestras tisulares de 18 biopsias normales de mama, 35 de colon, 9 de estómago y 8 de cavidad oral. Los epitopes carbohidratos se estudiaron con los siguientes anticuerpos monoclonales (MAbs): KM93, anti sialil-Lewis x; KM380, anti-Lewis x; C14, anti-Lewis y; 83D4, anti-Tn; anti-sTn y anti-TF reactivo con Gal-GalNAc. Las mucinas se estudiaron con C595, anti tandem repeat del core proteico de MUC1, dos anticuerpos reactivos con la cola citoplásmica de MUC1: CT2 Mab y CT33, un anticuerpo policlonal; PMH1 (anti-MUC2), CLH2 (anti-MUC5AC), CLH5 (anti-MUC6) y un policlonal reactivo con MUC4. Las relaciones entre las variables fueron analizadas estadísticamente mediante chi cuadrado con corrección de Fisher. Se halló que Lewis x está muy expresado en todos los epitelios (72% en mama, 74% en colon, 100% en estómago y 50% en cavidad oral). En contraste, los haptenos T, Tn and sTn se observaron en unas pocas muestras de distintas localizaciones. Lewis y no se detectó en colon pero se halló expresado en el 88% de muestras gástricas y sLewis x se halló principalmente en cavidad oral. Respecto a las mucinas, MUC1 fue expresada por todos los epitelios considerados aunque principalmente por el mamario (89%); MUC2 se observó principalmente en colon (91%), MUC5AC en estómago (33%) y MUC4 en cavidad oral (100%). Se halló una correlación

positiva entre sLewis x y Lewis y en mama ($p < 0,005$); en colon, entre sLewis x vs MUC5AC ($p = 0,005$) y en estómago se halló entre Tn vs MUC5AC ($p = 0,023$) así como Tn vs MUC2 ($p < 0,035$). Conclusiones: 1- Lewis x es el epitope carbohidrato más expresado por tejidos epiteliales normales de mama y tracto digestivo. 2- Lewis x no se halló correlacionado estadísticamente con ninguna de las mucinas estudiadas.

304. (247) LOS HALLAZGOS EN TUMORES MURINOS EXPERIMENTALES ¿SON EXTRAPOLABLES A LOS TUMORES HUMANOS? SPERONI LUCÍA, GASPARRI JULIETA, BUSTUOABAD OSCAR DAVID, MEISS ROBERTO PABLO

Universidad Nacional de Quilmes, Academia Nacional de Medicina

El máximo volumen tumoral compatible con la vida humana es de 10^{12} células, una masa de 1000 gs (1.8% del peso corporal). El propósito del trabajo fue analizar la masa y la necrosis de tumores murinos malignos. Se utilizaron ratones Balb/c y C57 para estudiar los tumores: C7HI (adenocarcinoma ductal de mama, $n = 27$), T2280 (tumor de mama por MMTV, $n = 6$), LB (linfoma T, $n = 27$), 2P-2 (linfoma B, $n = 15$), S-180 (sarcoma, $n = 10$), CEI (carcinoma epidermoide indiferenciado, $n = 11$), MC-C (fibrosarcoma, $n = 19$) y B16 (melanoma, $n = 16$). Los resultados mostraron que en el momento de la muerte el peso promedio en gramos del tumor era en C7HI, $8,7 \pm 4,8$; T228, $1,5 \pm 0,3$; LB, $7,7 \pm 6,9$; 2P-2, $7,8 \pm 3,1$; S-180, $8,9 \pm 6,5$; CEI, $15,3 \pm 4,5$; MC-C, $11,04 \pm 6,1$ y B16, $6,8 \pm 2,13$. Estos valores oscilaron entre 34-77% del peso corporal y la necrosis fue de un 28-56% del peso del ratón en aquellos tumores que lo superaban en un 50%. Se observó sobrevida en ratones con C7HI y MC-C con metástasis que ocupaban el 85% del pulmón (465mg, aprox. 1.8% del peso del ratón). La bibliografía cita por excepcionales la masa (en gs) de los siguientes tumores humanos: ganglioneuroma retroperitoneal, 230; coriocarcinoma, 270; leiomioma de esófago, 540; liposarcoma de colon sigmoide, 640; liposarcoma retroperitoneal, 730; schwannoma, 940; angiosarcoma renal, 1145; tumor rhabdoide maligno de hígado, 1240; carcinoma neuroendocrino de colon, 1300; seminoma, 1300; neuroblastoma congénito abdominal, 2350; condrosarcoma renal, 2500. La masa promedio alcanza 1.8-2% de la masa corporal y la necrosis se limita a focos. Nuestras observaciones sugieren que los hallazgos que devienen del cáncer experimental en ratones están alejados de la realidad del cáncer humano lo que haría imposible su extrapolación. En el cáncer la sobrevida no ha aumentado (N Engl J Med. 1997, 336: 1569) y no se espera que los índices mejoren (NIH publicación no 86-2880), hecho que parece fortalecer nuestra apreciación.

305. (254) EXPRESIÓN E INTEGRACIÓN DEL GENOMA DE HPV16 Y 18 EN CÁNCER DE CUELLO DE ÚTERO Y LESIONES DE ALTO GRADO. GIRGULSKY LUCIANA, LEIROS GUSTAVO, MAURO ELIDA, STELLA INES, GUGLIELMINETTI ARMANDO, EIGUCHI KUMIKO

Cat. Bioq. e Inmunología. Facultad de Medicina. USAL.; Servicio de Tocoginecología, Hospital Durand; Cat. Patología. Facultad de Medicina. USAL; Cat. Bioq. E Inmunología. Facultad de Medicina. USAL

Introducción: La sobreexpresión de E6/E7 de HPV de alto riesgo es necesaria para el mantenimiento del fenotipo maligno del carcinoma de cervix; y su regulación se vería alterada por el proceso de integración viral. Objetivos: Evaluar la expresión de E7 de HPV16 y 18 y su status de integración en cáncer de cuello uterino y lesiones de alto grado. Materiales y métodos: Se evaluaron 20 muestras de cáncer de cuello de útero y lesiones de alto grado de pacientes de la Ciudad de Buenos Aires. La detección de DNA de HPV fue realizada por PCR-Consensus, la expresión del oncogen E7 de HPV16 y 18 se detectó por RT-PCR y la integración viral por APOT. Resultados: De las 20 muestras analizadas, 19(95%) mostraron DNA de HPV, de las cuales 12(63%) expresaron E7 de HPV16, 5(26%) expresaron E7 de HPV18 y 2(10%) coexpresaron E7 de ambos tipos virales. De las

12 muestras que expresaron E7 de HPV16, 4(33.3%) expresaron transcriptos derivados de la forma episomal e integrada, 3(25%) derivados exclusivamente de la forma integrada y 5 no pudieron ser evaluados. En el caso de HPV18, las 5 muestras (100%) que expresaron E7 de HPV18 presentaron transcriptos derivados exclusivamente de la forma integrada. Discusión: En un estudio previo no detectamos expresión de E7 de HPV en lesiones de cervix de bajo grado. En el presente, las muestras que expresaron E7 de HPV16/18 presentaron transcriptos derivados de la forma integrada. En el caso de HPV16 este transcripto coexistió, en algunos casos, con el derivado de la forma episomal, mientras que HPV18 solo mostró el transcripto derivado de la forma integrada. Estos resultados sugerirían que la integración de HPV16 y 18 es un evento universal en cáncer de cuello uterino y lesiones de alto grado y que la coexistencia de genomas de HPV16 integrados y episomales podría ser resultado de cierta heterogeneidad tumoral con células presentando una u otra versión, restando evaluar si la evolución de la lesión selecciona clones derivados de la forma integrada.

306. (334) PAPEL DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN NEURAL NCAM SOBRE LA PROGRESIÓN TUMORAL DE CÉLULAS DE UN CARCINOMA MURINO DE PULMÓN LP07. CAMPODONICO PAOLA BERNADETTE, SACERDOTE DE LUSTIG EUGENIA, BAL DE KIER JOFFE ELISA, PURICELLI LYDIA, TODARO LAURA

Instituto de Oncología Angel H. Roffo

NCAM se expresa en sistema nervioso y en tumores como el de pulmón a células pequeñas. NCAM sufre el agregado de ácido siálico (PSA) en el desarrollo embrionario y en las primeras etapas postnatales. La sobreexpresión de PSA-NCAM en tumores neuroectodérmicos estaría asociada a su alto potencial invasivo. La línea LP07, surgió de un tumor de pulmón murino de origen epitelial con componente neuroendócrino. Anteriormente demostramos que el tratamiento de las células con un anticuerpo específico anti NCAM reduce el número y tamaño de las metástasis pulmonares experimentales y el crecimiento in vitro de LP07. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto del tratamiento con anti NCAM sobre propiedades relevantes en la progresión tumoral como migración, adhesión, actividad de proteasas asociadas a estos eventos y supervivencia. Determinamos mediante Western blot que LP07 expresa las isoformas de 80, 120 y 140 kDa de NCAM. Cada una de estas isoformas presentó al menos 3 variantes cuando se usa un anticuerpo anti PSA. El tratamiento con anti NCAM redujo la migración (ensayo de wound) (50% vs 85% del control, $p < 0,01$), la adhesión a plástico (46,3% de células adheridas vs 73,9% del control) y a diferentes sustratos de matriz extracelular como colágeno I ($57,07 \pm 9,7\%$ vs $93,7 \pm 5,2\%$ control) y fibronectina ($51,4 \pm 5,9\%$ vs $97,4 \pm 7,97\%$ control, $p < 0,05$). La incubación de las células LP07 durante 48 hs con anti NCAM redujo la actividad de la proteasa secretada uPA ($6,3 \pm 2,8$ vs $62,2 \pm 2,1$ UI/mg prot, NCAM vs control, $p < 0,05$). También se observó un marcado aumento del número de células apoptóticas con el mismo tratamiento (tratadas $14,0 \pm 1,40$ vs control $7,5 \pm 0,71$, $p < 0,05$). El tratamiento con anticuerpos específicos anti-NCAM genera un fenotipo menos maligno de las células de adenocarcinoma pulmonar LP07, a través de la modulación de varias etapas de la progresión maligna, como adhesión, motilidad, actividad proteolítica y supervivencia.

307. (352) METÁSTASIS EXPERIMENTALES EN PULMÓN DEL TUMOR LM3: ¿INFLUENCIA EL MOMENTO DEL PERÍODO ACTIVIDAD/REPOSO (OSCURIDAD/LUZ) DEL INÓCULO ENDOVENOSO EN EL NÚMERO Y/O TAMAÑO DE LAS METÁSTASIS OBTENIDAS?. COLOMBO LUCAS LUIS, RADESCA JORGE

Area Investigación, Inst. de Oncología Angel H. Roffo (UBA)

Introducción: Casi todos los sistemas fisiológicos tienen variaciones en su nivel de actividad con respecto al ritmo circadiano (día/noche) o de actividad/reposo. No se sabe todavía a qué hora

o momento de dichos períodos las células tumorales: a) sobreviven más en circulación b) se arrestan con mayor facilidad en el lecho capilar de un órgano (P. Ej: pulmón) c) se ve facilitado el desarrollo de las metástasis. Objetivo: Averiguar en cual momento de dichos períodos se ven favorecida o desfavorecida la formación de las metástasis experimentales en pulmón en el modelo de tumor mamario murino LM3. Material y Métodos: Ratones BALB/c de ambos sexos que estaban adaptados en 2 cuartos contiguos, cuyos ritmos de 12/12 hs de luz/oscuridad estaban desfasados 12hs, fueron inoculados en vena de cola con 200.000 células LM3, a mitad o inicio del período de luz u oscuridad (4 grupos de cada sexo por experimento con 5-6 ratones por grupo y sexo). Los ratones se sacrificaron a las 3 semanas y el número y tamaño de las metástasis pulmonares superficiales se determinó bajo microscopio estereoscópico. Resultados: En los 2 experimentos realizados, no se vieron diferencias entre los machos, pero sí entre las hembras, dando más metástasis y de mayor tamaño si se inoculan en el período de reposo (luz) ($p < 0,05$ en varios parámetros, como número de metástasis totales, número y porcentaje de metástasis $> 0,5$, > 1 , $> 1,5$ o > 2 mm de diámetro, etc.). Discusión: Estos 2 primeros experimentos no son definitivos, pues quedan todavía muchas preguntas por responder en experimentos futuros, pero todo induce a pensar que durante el período de reposo (luz) se vería facilitado algún paso de la cascada metastásica desde la entrada al torrente sanguíneo en adelante (no sabemos todavía cual es), y que eso sucede manifiestamente en hembras y no en machos (otros futuros experimentos deberemos realizar para investigar esa diferencia entre sexos).

308. (380) DETERMINACIÓN DE FACTORES DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DEL COMPUESTO EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER INDIFERENCIADO DE TIROIDES PARA CÁLCULOS DOSIMÉTRICOS EN LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT). DAGROSA ALEJANDRA (1), CHUNG YOONG SUNG(2), RILEY KENT (2), BINNS PETER (2), KAHL STEPHEN(3), PISAREV MARIO(1), CODERRE JEFFREY(2).

Comisión Nacional de Energía Atómica (1); Massachusetts Institute of Technology (2); University of California Los Angeles (3)

BNCT ha sido propuesta por nuestro laboratorio como una alternativa para el tratamiento de CIT. En estudios realizados previamente en distintos modelos in vitro e in vivo mostramos la efectividad de esta terapia utilizando como moléculas transportadoras de boro 10BPA y 10BPA combinado con 10BOPP. Para poder expresar la dosis física total absorbida por el tumor en las mismas unidades que utiliza la radioterapia convencional, de manera que estas puedan ser comparadas, cada componente de la dosis total debe ser multiplicado por un factor de efectividad biológica relativa (RBE). Este factor para el componente boro se denomina CBE y es específico para cada compuesto borado. Las células de la línea humana de CIT (ARO) en crecimiento fueron distribuidas en los siguientes grupos: neutrones; 3) BPA (5 ppm+ neutrones; 2) BOPP (10 ppm 10B) +1) BPA (10 ppm 10B) neutrones; 4) neutrones solos; 5) rayos X. Las células+ BOPP (5 ppm 10B) +10B) fueron irradiadas con el haz de neutrones térmicos del reactor experimental del $8.5 \cdot 10^9$ n/cm² seg) y recibieron dosis totales absorbidas de 0.83,=MIT (flujo 2.5, 4.2, 6.7 Gy con una incerteza del 5%. La fracción de sobrevivencia (FS) fue estudiada como efecto biológico. La irradiación con neutrones en presencia de boro-10 mostró una disminución en la viabilidad celular Este efecto fue mayor en las células incubadas con BPA que en aquellas incubadas con BOPP. Los CBEs del BPA y BOPP individuales y en combinación fueron calculados para dos diferentes valores de FS (0.02 y 0.07). Los resultados fueron los siguientes, RBE del haz: 1.2 ± 0.1 y 1.2 ± 0.1 , respectivamente; CBE del BPA: 3.0 ± 0.4 y 3.9 ± 0.5 ; CBE del BOPP: 1.6 ± 0.3 y 1.7 ± 0.3 ; y el CBE de BPA + BOPP: 2.4 ± 0.3 y 2.6 ± 0.4 Conclusiones: Los valores de CBE del BPA+BOPP serían aditivos. Estos son los primeros datos medidos de CBEs para CIT y serán de utilidad en futuros estudios clínicos.

309. (433) METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE TUMORES SÓLIDOS POR MICRODISECCIÓN LASER. LEVY ESTRELLA, BIANCHINI MICHELE, BRAVO ALICIA, FURMAN DAVID, VON EUW ERIKA, DOMENICHINI ENZO, PINSKY VICTOR, BARRIO MARCELA, MORDOH JOSÉ

Cio-Fuca; Hospital Eva Perón; Servicio de Patología -A. Fleming; Htal. M. B. de Martínez

El desarrollo y la aplicación de las técnicas de microdissección laser (MDL) ha generado un importante avance en el análisis molecular de tumores sólidos y su microambiente. En el presente trabajo hemos comparado alternativas de conservación de muestras de carcinoma de colon, mama y melanoma para MDL y posterior extracción de RNA y proteínas. Para conservar los tejidos se utilizó: i) fijación en formol y RNALater (Ambion) a temperatura ambiente y posterior inclusión en parafina o ii) congelación a -80°C y posterior inclusión en OCT-optimal cutting temperature. Luego se procedió a microdissecar dichas muestras utilizando un microscopio Leica Laser Microdissection "ASLMD". Los cortes-láser (CL) se colectaron en buffer de extracción para RNA (RNAqueous[®]-Micro) o en buffer RIPA para proteínas. El RNA y las proteínas extraídas fueron cuantificadas obteniéndose valores de aproximadamente 400 ng de RNA en CL correspondientes a 600 células y 1 μg de proteínas en CL conteniendo 2.500 células. El análisis posterior por RT-PCR y western blot, permitió evaluar transcritos y proteínas de diferentes tamaños y abundancia. Se obtuvieron resultados positivos en la amplificación de los transcritos $\beta 2\text{-m}$ y GAPDH en los tejidos mencionados. En el caso de transcritos menos abundantes y de expresión restringida como PAK6, FKBP6 y CSPG3, su detección dependió de la celularidad, tipo celular y tamaño del amplicón. Se logró establecer que el número mínimo requerido para la amplificación de un transcripto está entre 100 y 1.000 células; en el caso de las proteínas es necesario procesar un número mayor de células (de 1.000 a 10.000). Logramos extraer RNA de buena calidad de los CL fijados en formol previo tratamiento con RNALater, lo cual constituye una ventaja en cuanto a la preservación y estudio morfológico. En conclusión, este trabajo nos permitió establecer una metodología para analizar los componentes individuales de tejidos tumorales heterogéneos.

310. (523) ESTUDIO DEL LOVASTATIN COMO UN POSIBLE AGENTE QUIMIOPREVENTIVO EN EL DESARROLLO DE TUMORES DE MAMA EN RATONES CBI+. BOSCH CECILIA (1), SUÁREZ CRISTIAN (1), ROZADOS VIVIANA (1), HINRICHSEN LUCILA (1, 2)

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario (1) CIC-UNR, Universidad Nacional de Rosario (2)

Las estatinas, inhibidores de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa, se han relacionado con efectos quimiopreventivos potenciales; sin embargo, los resultados reportados son conflictivos. La línea CBI+, del bioterio del Instituto de Genética Experimental, actualmente en la generación 100 de cría selectiva, y con un coeficiente teórico de endocría superior a 0.99, se caracteriza por mostrar un 100% de incidencia de tumores de mama y una edad de detección del tumor muy temprana (mediana: 243 días), por lo que constituye un modelo interesante para analizar la efectividad del tratamiento con estatinas en la prevención del cáncer de mama. Nuestro objetivo fue evaluar el posible efecto quimiopreventivo del lovastatin (LOV) en este modelo de carcinogénesis espontánea de mama. Para ello ratonas hembras CBI+ fueron distribuidas en dos grupos experimentales: testigos (T) y tratados con una dosis de LOV de 1mg/ratón/día en el agua de bebida (L); el tratamiento se inició cuando los ratones tenían 140 días de edad. La presencia de tumores se evaluó por palpación 2 veces por semana hasta finalizar el experimento; la presencia de tumores se confirmó por histología. Para evaluar el efecto del tratamiento se midió semanalmente el peso corporal y se determinó la colesterolemia, después de 12 horas de ayuno, en dos momentos del tratamiento (días 0 y 42). No se observaron diferencias en

la incidencia, así como tampoco se observó un retardo en el desarrollo de tumores entre los grupos. No hubo diferencia significativa en los valores de colesterol (día 42, T: 1,05 mg/dl; L: 1.04 mg/dl). Estos resultados indican que en la dosis administrada el LOV no actuó como un agente quimiopreventivo en el desarrollo de tumores de mama murino. No podemos descartar que dosis o esquemas de administración diferentes pudieran tener un efecto protector en el desarrollo de tumores de mama en este modelo experimental.

311. (529) DETECCIÓN PRECOZ DE NEOPLASIA INTRATUBULAR INDIFERENCIADA DE CÉLULAS GERMINALES EN DISGENESIAS TESTICULARES. VENARA MARCELA, MUSSE MARIANA, CHEMES HECTOR

Centro de Investigaciones Endocrinológicas

La neoplasia intratubular de células germinales o carcinoma in situ (CIS), es la lesión inicial de los tumores germinales de adultos y se caracteriza por células atípicas intratubulares. Las disgenesias testiculares tienen riesgo aumentado de desarrollar tumores germinales. Es importante detectar el CIS en ellas, lo que no es fácil porque el fenotipo infantil no es tan característico como en el adulto. El OCT 3-4 es un factor de transcripción que se expresa en las células germinales fetales hasta la semana 37 de gestación y es marcador del CIS adulto y de los tumores germinales. Estos últimos son frecuentemente aneuploides. El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de OCT 3-4 y la ploidía (cantidad de ADN) en células germinales de testículos infantiles disgenéticos como posibles marcadores del CIS infantil no característico. Se estudiaron 43 testículos infantiles, correspondientes a disgenesia testicular (DT, n=29), diferenciación gonadal asimétrica (DGA, n=8) y hermafroditismo vero (HV, n=6) y se evaluaron histología, inmunolocalización de OCT3-4 y ploidía por análisis de imágenes. 24 testículos fueron aneuploides/OCT+ (uno de estos casos evolucionó posteriormente a seminoma bilateral), 7 fueron aneuploides/OCT neg, 6 diploides/OCT+ y 6 diploides/OCT neg. Los 4 controles normales fueron diploides/OCT neg. En resumen, el 56% de los casos fueron aneuploides/OCT+ y el 86% positivo para al menos 1 de los dos marcadores. Ambos marcadores fueron negativos en los controles. Las incidencias de aneuploidía y positividad para OCT fueron similares en las DT, DGA y HV. Concluimos que la presencia de aneuploidía y la positividad del OCT3-4 detectan alteraciones en un alto porcentaje de células germinales de testículos disgenéticos lo que sugiere la presencia de neoplasia germinal intratubular con riesgo de evolución a neoplasia germinal invasora. Este parámetro será de utilidad en caso de plantearse la orquiectomía como opción terapéutica.

312. (539) CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO IN VIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES LM05. SIMIAN MARINA, PONTIGGIA OSVALDO, RODRIGUEZ VANINA, BALDE KIER JOFFE ELISA

Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"

A partir del tumor M05, que presenta un comportamiento estrógeno dependiente (ED) expresando receptores de estrógeno y progesterona, se generó la línea celular continua LM05-Mix, conformada por una población estromal y otra epitelial. La clonación de las mismas generó las líneas LM05-F y LM05-E. El objetivo de este trabajo fue determinar si las líneas eran tumorigénicas y si mantenían el comportamiento (ED) in vivo, como el previamente observado en el tumor parental. Para ello se inocularon s.c. 400.000 células en ratones vírgenes de diez semanas sin tratar (control), ovariectomizadas (ovx) y tratados con pellets de estradiol (E) (5mg). Se realizaron n=2 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. El análisis conjunto de los datos reveló que tanto la línea LM05-Mix como la -F generaron tumores y que los mismos crecieron significativamente más en presencia de E, respecto de los controles ($p < 0.01$). Se observó por otra parte que en ambos casos los tumores crecidos en presencia de E fueron localmente más invasivos, con un alto porcentaje de tumores ulce-

rados (9/10 para LM05-F y 7/10 para LM05-Mix), lo cual prácticamente no se observó en los controles (1/10 para LM05-F y 0/10 para LM05-Mix) y en los ovx (0/10 tanto para LM05-F y -Mix). Estudios de inmunofluorescencia revelaron que los tumores generados expresan receptores de estógeno y progesterona y que están conformados mayoritariamente por células positivas para vimentina pero negativas para citoqueratinas. En estas condiciones no se han obtenido aun tumores a partir de la línea LM05-E. Nuestros resultados demuestran que las líneas celulares dan lugar a tumores menos diferenciados que el tumor parental M05, reteniendo, sin embargo, algunas características del mismo, como la expresión de receptores hormonales y cierto grado de respuesta al E. Este trabajo es auspiciado por la Fundación Susan G. Komen.

313. (548) ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE TRES LÍNEAS CELULARES DE BAJO PASAJE DE INSULINOMA HUMANO. STIGLIANO IVAN, LABRIOLA LETICIA, KROGH KARIN, SOGAYAR MARI CLEIDE, BAL DE KIER JOFFÉ ELISA, PURICELLI LYDIA, PETERS MARÍA GISELLE

Area Investigación. Instituto de Oncología Angel H. Roffo Unidad de Islotes Pancreáticos Humanos. Instituto de Química. Universidad de San Pablo

Los insulinomas son tumores benignos de islotes pancreáticos poco frecuentes. Sin embargo, alrededor del 6% se maligniza, metastatizando hígado y ganglios linfáticos drenantes. Poco se conoce sobre la biología de estos tumores, debido especialmente a la falta de modelos in vitro. El objetivo de este trabajo fue establecer y caracterizar cultivos celulares de insulinomas humanos. Se obtuvieron biopsias quirúrgicas de tres insulinomas (APM, VGA y CPR), las cuales se procesaron para obtener cultivos primarios. Las suspensiones celulares se cultivaron y repicaron exitosamente hasta el pasaje 15. Mediante electroquimioluminiscencia se determinó que las tres líneas producen y secretan insulina humana. Se estableció mediante inmunofluorescencia (IF) que todas las líneas expresan: Cromogranina, Insulina, Péptido C, Glut2 y PDX, mientras que son negativas para: Actina, Glucagon, Desmina, Vimentina y CK19. Estos datos confirman el origen pancreático neuroendocrino de tipo Beta de las tres líneas de insulinoma. Por otro lado, con IF determinamos también que todas las líneas expresan B1-Integrina y B-Catenina, y que solo las APM presentan tinción para E-Cadherina. Todas las líneas fueron capaces de crecer en monocapa (con morfología fibroblastoide) y en suspensión en medio líquido, siendo los esferoides APM mas numerosos y grandes. Mediante la técnica de cicatrización de heridas se determinó que las células VGA poseen mayor capacidad migratoria (30% del área cubierta a las 18h vs 17% de las otras líneas). En relación con la muerte, APM fue 1,5 veces mas susceptible a la apoptosis inducida por eliminación de suero. Solo VGA fue sensible a la Doxorubicina (0,75-12 uM), siendo la IC50 5,1 uM. En resumen, se han desarrollado líneas de insulinoma humano que, hasta el repique 15, mantienen las características antigénicas y de secreción de insulina de los tumores originales, mostrando heterogeneidad en sus propiedades in vitro.

314. (607) ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE SUSCEPTIBILIDAD A LA CARCINOGENESIS ESPOTÁNEA DE MAMA Y MMTV EXÓGENO EN RATONES CBI+. SUÁREZ CRISTIAN (1), BOSCH CECILIA (1), HINRICHSEN LUCILA (1, 2)

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR (1) CIC-UNR, Universidad Nacional de Rosario (2)

La susceptibilidad a las patologías más comunes, incluyendo el cáncer de mama, es de herencia poligénica, con genes de alta penetrancia y baja frecuencia (BRCA1 y 2) y/o genes modificadores de alta frecuencia y baja penetrancia. Los modelos anima-

les son útiles para identificar esos genes de susceptibilidad. Las hembras de la línea CBI+ (colonia CBI-IGE) desarrollan tumor antes de los 360 días de edad (mediana: 243), y poseen una variante del virus del tumor mamario murino (MMTV) exógeno, causa común de aparición de tumores mamaros en genotipos susceptibles. El objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto de la falta de MMTV exógeno sobre la susceptibilidad a la carcinogénesis en la línea CBI+. El desarrollo de tumores de mama se detectó por palpación; su tamaño y el estado general de salud de la hembra se controlaron semanalmente. Los animales se sacrificaron cuando el tumor alcanzó el tamaño máximo permitido o cuando se observaron signos de deterioro físico. El desarrollo de tumores se estudió en animales CBI+ vírgenes (CBI+/v), después de un ciclo reproductivo completo (CBI+/m) y CBI+ vírgenes libres de MMTV exógeno (CBI+/s); se analizaron, también, ratones Balb/C/s (libres de MMTV) amamantados por CBI+ (Balb/C/+). La edad de detección del tumor se analizó con el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en la proporción de animales con tumor se analizaron con la prueba de χ^2 . No se observaron diferencias en la edad de detección de tumor en la línea CBI+ (CBI+/v, 243 días; CBI+/m, 220 días; CBI+/s, 253 días). La proporción de ratones con tumor fue menor en CBI+/s (82%, n=11) que en CBI+/v (100%, n=39) y CBI+/m (100%, n=35) ($p < 0.01$). Por el contrario, los ratones Balb/C/+ tuvieron mediana de edad de detección del tumor de 431 días, y una proporción de animales con tumor de 71% (n=7). Los datos sugieren que la susceptibilidad al desarrollo espontáneo de tumores mamaros en ratones CBI+ está principalmente determinada por su genotipo.

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR I

315 (306) INTERACCIÓN REGULATORIA ENTRE NF- κ B, CICLINA D1 Y EL COACTIVADOR RAC3. RUBIO MARÍA FERNANDA, COLO GEORGINA P., ALVARADO CECILIA V, ESCARIS CECILIA, COSTAS MONICA A.

Instituto de Investigaciones Médicas Dr A. Lanari

El gen de ciclina D1 (CD1) es requerido para la progresión tumoral y esta sobreexpresado en cáncer de mama. Hemos demostrado previamente que el receptor de estrógenos requiere de la actividad NF- κ B para inducir la expresión de la ciclina: el coactivador RAC3, marcador tumoral de este tipo de tumores, es capaz de reclutar en un mismo complejo a ER y NF- κ B en el promotor de CD1. La CD1 es capaz de reclutar complejos coactivadores o correpresores. Dado que NF- κ B interacciona con RAC3, se quiso determinar si existen complejos conteniendo a CD1 y NF- κ B y si afectaban su actividad transcripcional. En células HEK293 (bajo RAC3), T47-D (tumor mama y alto RAC3) se determinó la posible interacción física entre CD1, NF- κ B y RAC3 a través de ensayos de co-inmunoprecipitación y Western blot. Además se evaluó el efecto de la sobreexpresión por transfección de CD1 sobre la actividad NF- κ B por ensayos reporteros midiendo Luciferasa, así como ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) para determinar niveles de factor disponible nuclear. La actividad NF- κ B se indujo con PMA (10 ng/ml). Se observó que existe una interacción física entre CD1, NF- κ B y RAC3 en ambas líneas celulares. Además, CD1 ejerce una inhibición dosis dependiente de la actividad NF- κ B de hasta el 60% respecto de células transfectadas con vector vacío. No se observaron diferencias en los niveles de NF- κ B nuclear en los ensayos de EMSA entre células sobreexpresando o no CD1. Existe una interacción regulatoria entre CD1 y NF- κ B en la cual el factor de transcripción induce la expresión de la ciclina, mientras CD1 inhibe su actividad transcripcional, probablemente a través del reclutamiento de correpresores a nivel de promotores, dado que no se afectan los niveles de NF- κ B nuclear. Dado que el coactivador RAC3 forma parte de los complejos CD1 y NF- κ B, su sobreexpresión en distintos tipos de tumores, podría afectar estas interacciones y sería un buen blanco de ataque para el diseño de nuevas terapias.

316. (643) CARACTERÍSTICAS DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MIOIDES PERITUBULARES DE TESTÍCULO DE RATAS SHR. BERTOLDI MARIA VICTORIA, CRUZADO MONTERRAT, CASTRO CLAUDIA, LÓPEZ LUIS ALBERTO

Instituto de Histología y Embriología de Mendoza Laboratorio de Cultivo de Células, Área Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNCUYO

Los túbulos seminíferos del testículo de rata están revestido por células con características de células musculares denominadas células mioideas peritubulares (células MP). Estas han sido caracterizadas como células de músculo liso, responsables de la contracción tubular y representan un interesante modelo de estudio de células de músculo liso no vascular. En la hipertensión arterial se ven afectadas las células de músculo liso de la pared vascular que cambian su fenotipo y comienzan a proliferar y migrar. Las células MP tapizan al túbulo seminífero, pero no están sometidas a presión hídrica. En este trabajo se analizó si la hipertensión arterial altera el ritmo de proliferación de las células MP. Se aislaron y cultivaron células MP de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y de ratas normotensas (WKY) en medio D-MEM suplementado con SFB. Se cultivaron 3x10⁴ células por well en presencia de 10% SFB, 24 h y posteriormente con 0.1% SFB, 24 h (sincronización por quiescencia). Posteriormente fueron estimuladas a proliferar con 10% SFB y se contó el número de células cada 24 h. Los resultados mostraron que las células MP de ratas SHR tuvieron un índice de crecimiento \pm error estándar medio (IC \pm SEM) de 1,24 \pm 0,16 y 2,0 \pm 0,18 a las 24 y 48 h de cultivo respectivamente, indicando que en 48 h se duplicó la población. Mientras que las células MP de ratas WKY presentaron un IC \pm SEM de 1,28 \pm 0,16 y de 1,42 \pm 0,24 a las 24 y 48 h respectivamente. Comparando el IC a las 48 h de cultivo se observa que las células MP de SHR tienen un IC significativamente mayor ($p < 0,05$) que las de WKY. Los resultados muestran que las células MP de ratas hipertensas son más propensas a proliferar en cultivo, indicando que no es necesario que las células musculares estén en tejidos sometidos a presión hídrica para que manifiesten alteraciones por la hipertensión arterial.

317. (311) ACTIVACIÓN DE P-38 INDUCIDA POR PLASMA NORMAL DE HOMBRE Y TESTOSTERONA EN HUVEC. POWAZNIAK YANINA, KEMPFER ANA CATALINA, MARCHESE CARLOS, FARIAS CRISTINA, KELLER LETICIA, DOMINGUEZ MARÍA DE LA PAZ, CALDERAZZO JULIO CÉSAR, LAZZARI MARÍA ANGELA

Academia Nacional de Medicina; Departamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital Argerich

ERK es una integrante de la familia de MAPK que media un efecto protector en las células. Dentro de la familia, existe la p38 que promueve muerte celular. Nuestro objetivo es avanzar en los conocimientos del tema respecto a la influencia de las hormonas determinantes del sexo con la respuesta (apoptosis/angiogénesis) de las HUVEC. Se realizaron estudios a nivel proteico donde se evaluaron los efectos del plasma normal (PN) de hombre (PNH), PN de mujer (PNM), PN de embarazada (PNE), estradiol (E2) y testosterona (T) en la fosforilación de las MAPK en HUVEC. Para evaluar las posibles vías de activación de las HUVEC, se establecieron los niveles de activación de las proteínas ERK1/2 y p38 por Western blot. Las proteínas fueron homogeneizadas y solubilizadas en buffer Laemmli, en condiciones reducidas. Las proteínas fueron separadas en un gel de SDS-15% PAGE. El análisis por Western blot se desarrolló utilizando un anticuerpo anti P-ERK1/2 y P-p38. Las proteínas se revelaron mediante luminiscencia (ECL) y fueron evaluadas por densitometría. Para cuantificar los niveles antigénicos de las muestras, se incubaron las mismas membranas con un anticuerpo anti β -actina. Para evaluar si los tratamientos realizados indujeron apoptosis, éstas fueron evaluadas por la pérdida de asimetría de los fosfolípidos en la membrana plasmática: Anexina V-isotiocianato fluoresceinado y yoduro de propidio. No se observaron diferencias significativas entre las

células tratadas con PNM, PNE y el control en la fosforilación de p-38 y ERK1/2. Sin embargo, las células tratadas con E2 tuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la fosforilación de ERK2. La fosforilación de ERK1 no fue afectada por E2. Existen diferencias significativas entre las células tratadas con PNH, T y control en la fosforilación de p-38. Sugerimos que los niveles de testosterona están relacionados con los mecanismos de apoptosis bajo nuestras condiciones experimentales.

318. (221) INGENIERÍA DEL TEJIDO ÓSEO: BIOCOMPATIBILIDAD Y BIODEGRADACIÓN DE MATRICES DE POLÍMEROS SINTÉTICOS EN UN MODELO DE OSTEOBLASTOS EN CULTIVO. CORTIZO ANA MARIA, MOLINUEVO MARÍA SILVINA, CORTIZO MARÍA SUSANA

Fac. Cs. Exactas - UNLP, INIFTA-UNLP

La reparación del tejido óseo puede alcanzarse a través de técnicas de ingeniería de tejidos. Es fundamental seleccionar materiales capaces de sostener el crecimiento celular sin efectos tóxicos y de biodegradarse a una velocidad adecuada para funcionar como soportes. En el presente trabajo desarrollamos matrices basadas en polímeros sintéticos (polifumaratos, PFIP y poliésteres, PbPL). Analizamos sus propiedades de biocompatibilidad (adhesión, morfología y proliferación) y de biodegradación (análisis de peso molecular promedio e índice de polidispersidad), y su capacidad de degradación por macrófagos) usando un modelo de osteoblastos (UMR106) en cultivo. Después de 1 hora de incubación las células se adhirieron más eficientemente a los films de PbPL (60% respecto a un plato de cultivo control de poliestireno), mientras que la adhesión a films de PFIP fue muy baja (5-10% del control). Los osteoblastos crecidos durante 24h sobre matrices de PbPL mostraban una morfología normal con extensiones, procesos citoplásmicos y red de actina (coloración con FITC-paloidina). En cambio, el crecimiento sobre matrices de PFIP fue mucho menor, con pobre desarrollo de la red de actina y de la proliferación celular, pero sin signos de toxicidad. Los estudios de degradación mostraron que PbPL puede ser degradada al cabo de 7 días a 37°C en un sistema a-celular, por mecanismos de degradación hidrolítica. El PFIP no se degradó bajo estas condiciones, pero fue tomado (PFIP marcado con grupo final fluorescente) y degradado por macrófagos al cabo de 20 días de cultivo. Conclusión: Si bien las matrices de PbPL mostraron mejor biocompatibilidad con los osteoblastos que los films de PIPF, ninguna de ellas presentó signos de citotoxicidad. Ambos polímeros pueden ser degradados por diferentes mecanismos, lo cual permitiría su selección o combinación para diseñar una matriz adecuada dependiendo de su posible aplicación en la reparación del tejido óseo.

319. (133) REGULACION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES (CMLV) MEDIADA POR ESTEROIDES OVARICOS Y FITOESTROGENOS. CUTINI PABLO HERNAN (1, 2), RAUSCHEMBERGER MARÍA BELÉN (1,2), BENOZZI SILVIA (1), ALVAREZ CRISTINA (1), SELLÉS JUANA (1), MASSHEIMER VIRGINIA (1, 2)

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

La proliferación de CMLV es un evento condicionante del desarrollo de enfermedades vasculares como la aterosclerosis. Se proponen terapias de sustitución hormonal con esteroides ováricos ó fitoestrógenos para prevenir estas patologías en mujeres postmenopáusicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los esteroides ováricos progesterona (Pg) y estrona (E1), y del fitoestrógeno genisteína (Gen) sobre la regulación de la proliferación de CMLV. Se realizaron cultivos primarios obtenidos por la técnica de explante a partir de anillos de aorta de ratas Wistar. Los anillos se cultivan en medio DMEM, 10% FBS, obteniéndose las CMLV puras en el tercer pasaje de los anillos. La proliferación celular se estudió con la técnica de incorporación de ³H-

timidina. Demostramos que el perfil cinético de incorporación es bifásico con un aumento inicial en la síntesis de DNA a las 8 hs de cultivo, siendo máxima a las 24 hs, y decae a las 48 hs. Empleando la técnica de cristal violeta no se observaron diferencias significativas en el grado de supervivencia celular a todos los tiempos ensayados (4, 8, 24, 36 y 48 hs). En presencia de PD98059 (inhibidor de MAPK) se suprime significativamente la incorporación de ³H-timidina (145 ± 28 vs $30.7 \pm 4.8 \times 10^3$ cpm/mg prot, en ausencia ó presencia de PD98059, $p < 0.001$). Se estudió el efecto de E1, Pg y Gen (10nM) sobre la incorporación de ³H-timidina, observándose que los tres compuestos estimulan marcadamente la proliferación celular a 24 hs de tratamiento, siendo el máximo estímulo el inducido por el fitoestrógeno (99, 73 y 242% sobre el control, E1, Pg y Gen respectivamente, $p < 0.01$). Este efecto desaparece a 48 hs de tratamiento. Los resultados presentados sugieren que el crecimiento de las CMLV en cultivo: a) involucra la activación de sistemas de señalización intracelular (MAPK) y b) es blanco de regulación por los esteroides ováricos Pg y E1, y el estrógeno de origen vegetal, la genisteína.

320. (658) EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ERITROPOYETINA. REGULACIÓN DEL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA Y DEL RECEPTOR DE TNF. PREGI NICOLAS, WENKER SHIRLEY, VOTA DAIANA, PEREZ LEIROS CLAUDIA, NESSE ALCIRA

Depto. Química Biológica, FCEyN, UBA

El rol biológico y fisiológico de la eritropoyetina (Epo) se ha expandido al demostrar su acción en células de origen neuronal. El TNF es una citoquina que al unirse a su receptor (TNFR) puede inducir apoptosis o proliferación en distintos tipos celulares. El presente trabajo fue diseñado para investigar mecanismos que median la actividad protectora de Epo sobre células neuronales empleando la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y como modelo de apoptosis inducida por TNF (25 ng/ml). La apoptosis fue evaluada por la técnica de ladder, cambios morfológicos del núcleo, clivaje de la proteína PARP y actividad de caspasa-3. El efecto neuroprotector fue puesto en evidencia por el pretratamiento con Epo (25 U/ml). Se realizaron ensayos con inhibidores de vías de señalización, evaluando expresión por Real Time PCR y Western Blot. El pretratamiento con Epo previno la apoptosis inducida por TNF, explicable en parte por un leve aumento del EpoR. La expresión del TNFR1 disminuyó por el pretratamiento con Epo y dicha disminución fue revertida al agregar AG490 25 uM (inhibidor de Jak2), genisteína 10 uM (inhibidor de Tirosina Kinasas) o LY294002 25 uM (inhibidor de PI3K), indicando que estas vías estarían involucradas en la regulación de la expresión del TNFR1 por Epo. Se observó un aumento de la activación de NFkB al agregar Epo, mientras que el tratamiento con TNF provocó un aumento del inhibidor IkB, efecto que fue revertido al agregar previamente Epo. Esto sugiere que existe una interacción entre las señales activadas por Epo y TNF, que provocaría la activación de NFkB y su inhibidor IkB. La activación de NFkB, sumado a la de otros factores de transcripción, mediaría el efecto neuroprotector de Epo. La comprensión de los mecanismos de regulación, así como el conocimiento de las acciones no eritropoyéticas de la Epo, son de relevancia para la evaluación de nuevas terapias para el tratamiento de distintas enfermedades.

321. (241) TRANSLOCACION DE AIF Y MORFOLOGÍA APOPTÓTICA INDEPENDIENTE DE CASPASA COMO CONSECUENCIA DE LA TERAPIA FOTODINAMICA CON POII. RUMIE VITTAR BELEN, AWRUCH JOSEFINA, STRASSERT CRISTIAN, RIVAROLA VIVIANA

Universidad Nacional de Rio Cuarto. Universidad De Buenos Aires

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento contra el cáncer que se basa en la interacción de la luz con moléculas fotosensibles, las cuales activadas, conducen procesos fotoquímicos y fotobiológicos promoviendo la destrucción de las células tratadas. La TFD es un fuerte inductor de apoptosis, mecanismo

que incluye eventos enzimáticos que provocan cambios morfológicos y bioquímicos característicos. Los objetivos de este trabajo fueron continuar con el estudio del efecto fotosensibilizador de la ftalocianina Poll, su habilidad para inducir apoptosis y los componentes de dicho mecanismo en respuesta a TFD. Los parámetros estudiados fueron acción fotodinámica de la ftalocianina Poll sobre células de cáncer humano MCF-7c3 y señales que desencadenan la muerte apoptótica como consecuencia del tratamiento. Estudios realizados demostraron que el derivado de ftalocianina Poll, de ubicación lisosomal, (LysoTracker Green), luego de ser activado induce a las células tumorales a morir por apoptosis de una manera independiente de caspasas (caspasa-8, -9 y -3). Por otro lado, el clivaje de la proteína Bid podría ser consecuencia de la acción de proteasas lisosomales y el clivaje de PARP atribuible a proteasas dependiente de calcio, calpains. Dentro de las señales involucradas se observó la translocación de AIF desde la mitocondria hacia el núcleo (inmunohistoquímica), cambios en la morfología mitocondrial (MitoTracker Red) previos a este evento y fragmentación de DNA a gran escala (electroforesis en gel de agarosa). Estos resultados sugieren que las señales involucradas en desencadenar la morfología apoptótica observada luego del tratamiento fotodinámico es independiente de caspasas. CONICET, Agencia-Foncyt, SeCyt-UNRC.

REPRODUCCIÓN IV

322. (655) GALECTINA-1 CONFIERE PRIVILEGIO INMUNOLÓGICO EN PLACENTA HUMANA: IMPLICANCIAS EN EL MANTENIMIENTO DE LA TOLERANCIA MATERNO-FETAL. RAMHORST ROSANNA, ROMERO MARTA, TOSCANO MARTA, FAINBOIM LEONARDO, GENTI SUSANA, RABINOVICH GABRIEL

Laboratorio de Inmunogenética Hospital de Clínicas "José De San Martín", Universidad De Buenos Aires; Laboratorio de Inmunopatología Liido, Córdoba Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Galectina-1 (Gal-1), proteína inmunomoduladora, se expresa diferencialmente durante la gestación humana en condiciones normales y patológicas y es capaz de suprimir la respuesta proliferativa induciendo apoptosis de linfocitos T maternos potencialmente deletéreos. En el presente investigamos la contribución de Gal-1 al establecimiento de tolerancia por parte de células de trofoblasto humano. Para ello células JEG-3 se cultivaron en presencia de progesterona y citoquinas y se estudió la expresión de Gal-1. El análisis por Western Blot reveló que Gal-1 incrementa en presencia de concentraciones fisiológicas de progesterona (10⁻⁵ y 10⁻⁶), de IL-2 y TNF-alfa. Seguidamente estudiamos la contribución de Gal-1 en el efecto supresor del medio condicionado (MC) de células JEG-3 sobre células T activadas con PHA. El MC redujo la producción de IFN-gama e incrementó la secreción de IL-10, efecto que fue revertido en presencia del Ac anti-Gal-1 ($p < 0.05$). Además, incrementó la expresión del factor de transcripción Foxp-3 característico de células T regulatorias. Este efecto no fue observado en presencia del Ac anti-Gal-1 o tioidigalactósido (inhibidor específico). Finalmente, se cuantificaron los niveles de Acs anti Gal-1 por ELISA, en sueros de mujeres nunca embarazadas (NE), con embarazos a término y con abortos recurrentes (AR), previo y posterior al tratamiento con leucocitos paternos. Solo el 20% de las mujeres NE presentaron Acs anti-Gal-1 mientras que estaban presentes en el 87% de las pacientes con AR ($p=0.01$ M. Whitney). Este porcentaje disminuyó, luego del tratamiento acercándose a la frecuencia de mujeres con embarazos a término (25% y 50% respectivamente) ($p=0.02$ M. Whitney) AR tratadas vs no tratadas. Los presentes resultados, posicionan a Gal-1 como un posible mediador en la generación de tolerancia materno-fetal. El incremento marcado de Acs anti Gal-1 en pacientes con abortos podrían estar involucrados en la ruptura de dicha tolerancia.

323. (532) NITROSILACIÓN ENZIMÁTICA EN LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA DE LA RATA DIABÉTICA. WHITE VERONICA, DO PORTO DARÍO, HIGA ROMINA, GONZALEZ ELIDA

CEFYBO-UBA-CONICET

La diabetes materna induce estrés oxidativo y nitrosativo en la unidad feto-placentaria durante la preñez. La enzima superóxido dismutasa (SOD) previene la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), amortiguando el daño celular que éstas originan. Altas concentraciones de ROS se combinan con óxido nítrico (NO) originando peroxinitritos los cuales mediante nitrosilación proteica alteran la actividad de múltiples enzimas y afectan la funcionalidad celular. Con el objeto de analizar el impacto de la nitrosilación sobre la actividad de SOD en la unidad feto-placentaria, se evaluaron en fetos y placentas de ratas sanas (C) y diabéticas (D) por administración de estreptozotocina: a) los niveles de SOD nativa y nitrosilada (inmunoprecipitación y western-blot) y b) la actividad enzimática basal y en presencia de peroxinitritos. Resultados: La actividad SOD disminuyó en placentas ($p < 0.005$) y aumentó en fetos ($p < 0.001$) de D con respecto a C. Los niveles de SOD fueron mayores en fetos y menores en placentas de D comparados con los de animales sanos ($p < 0.005$ y $p < 0.001$ respectivamente). La enzima placentaria mostró mayor índice de nitrosilación en el grupo diabético ($p < 0.001$), pero la enzima fetal nitrosilada presentó valores similares en ambos grupos. El agregado exógeno de peroxinitritos produjo inhibición de la actividad enzimática placentaria y fetal de C ($p < 0.001$ y $p < 0.005$ respectivamente). Conclusión: La diabetes induce un aumento de nitrosilación en la enzima SOD placentaria, que se vincula a la menor actividad enzimática observada en este tejido. En el modelo de diabetes moderada estudiado, el impacto del estrés nitrosativo a nivel fetal es menor, ya que si bien la actividad SOD fetal se inhibe en presencia de peroxinitritos, se observa un aumento, probablemente compensatorio, en los niveles y en la actividad de esta enzima antioxidante.

324. (516) PPARALFA MODULA EL METABOLISMO LIPÍDICO EN PLACENTAS DE RATA CONTROL Y DIABÉTICA A MEDIADOS DE LA GESTACIÓN. MARTÍNEZ NORA, HIGA ROMINA, PUSTOVRH CAROLINA, JAWERBAUM ALICIA, GONZÁLEZ ELIDA

CEFYBO-CONICET-UBA

PPARalfa es un receptor nuclear involucrado en la homeostasis lipídica en diferentes tejidos. En trabajos previos observamos que la activación de PPARalfa regula negativamente los niveles de lípidos placentarios. Este efecto se evidencia también en la placenta de rata diabética (D), donde anomalías en el metabolismo lipídico se asocian a alteraciones en el desarrollo feto-placentario. Objetivo: Profundizar el análisis del rol de PPARalfa en el metabolismo lipídico placentario en la rata control (C) y diabética, evaluando la acción de clofibrato, agonista de PPARalfa sobre la síntesis de novo y el catabolismo lipídico placentario. Metodología: La síntesis lipídica de novo se determinó utilizando ¹⁴C-acetato como trazador. El catabolismo de lípidos esterificados se evaluó utilizando como índice la liberación de glicerol al medio de incubación. Resultados: En placenta C el agregado de clofibrato induce un incremento de síntesis de novo de CHOL (103%, $p < 0.01$) y de ECHOL (80%, $p < 0.01$). En placenta diabética, donde se evidencia una reducción de la síntesis de novo de todas las especies lipídicas analizadas, la adición de clofibrato incrementa significativamente este parámetro: TG (150%, $p < 0.01$), PL (213%, $p < 0.05$), CHOL (138%, $P < 0.05$) y ECHOL (888%, $P < 0.001$). Al comparar la síntesis de novo en placentas C contra D, se evidencia una disminución de todas las especies lipídicas estudiadas en tejido D. El catabolismo lipídico es mayor en la placenta D en relación al C (99%, $p < 0.001$). La activación de PPARalfa induce un incremento del catabolismo lipídico en placentas C (133%, $p < 0.01$), mientras que no modifica dicho parámetro en tejido D. Conclusiones: PPARalfa es un importante regulador del recambio lipídico placentario. La diabetes induce

anomalías en el metabolismo lipídico placentario y en la acción de PPARalfa, probablemente vinculadas a la sobreacumulación lipídica placentaria y a la mayor transferencia de lípidos al feto en desarrollo.

325. (490) AGONISTAS DE PPAR GAMMA REGULAN EL METABOLISMO LIPÍDICO PLACENTARIO EN RATAS SANAS Y DIABÉTICAS A MEDIADOS DE LA GESTACIÓN. CAROBIANCO EVANGELINA, PUSTOVRH CAROLINA, MARTÍNEZ NORA, JAWERBAUM ALICIA, GONZÁLEZ ELIDA

CEFYBO- CONICET

El receptor activado por factores de proliferación peroxisomal gamma (PPARgamma) regula la transcripción de genes involucrados en el metabolismo lipídico y su activación es indispensable para el desarrollo placentario. En la placenta de rata diabética, tanto sus niveles como los niveles de su agonista endógeno 15dPGJ2, se encuentran alterados. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto in vitro de 15dPGJ2 e in vivo de aceite de cártamo (rico en ácidos grasos poliinsaturados que activan PPARs) sobre el metabolismo lipídico placentario en ratas sanas (C) y diabéticas (D) a mediados de la gestación. Métodos: La masa lipídica se evaluó mediante TLC y análisis de imágenes, y la síntesis lipídica de novo mediante la incorporación de ¹⁴C-acetato de sodio. Resultados: Los niveles de ésteres de colesterol (EC) y triglicéridos (TG) son mayores en placentas de ratas D en relación a C ($p < 0.01$) y ($p < 0.05$) respectivamente, observándose una menor síntesis de EC y ácidos grasos libres (FFA) ($p < 0.001$), TG y fosfolípidos (PL) ($p < 0.001$) y colesterol (COL) ($p < 0.05$) en placentas D en relación a C. La adición de 15dPGJ2 no modificó la masa lipídica en placentas C y D. 15dPGJ2 redujo la síntesis de TG y COL ($p < 0.05$) en placentas D, y de todas las especies lipídicas evaluadas en placentas C. El tratamiento dietario produjo una disminución en los niveles de COL ($p < 0.05$) y PL ($p < 0.02$) en C y un aumento en los niveles de EC, FFA ($p < 0.05$) y TG ($p < 0.02$) en D. Conclusiones: El tratamiento in vitro con 15dPGJ2 e in vivo con dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados altera el perfil de lípidos placentarios en ratas sanas y diabéticas. Nuestros resultados sugieren la relevancia de los receptores PPARs en la homeostasis lipídica placentaria.

326. (391) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN LA GLÁNDULA MAMARIA EN LA TRANSICIÓN DE LACTOGÉNESIS I A LACTOGÉNESIS II . BUSSMANN URSULA, BUSSMANN LEONARDO

Instituto de Biología y Medicina Experimental; CONICET

La remodelación tisular cumple un rol esencial en la fisiología mamaria, estando en ella involucradas diversas proteasas. El objetivo de este trabajo fue por lo tanto estudiar la posible modulación de estas enzimas en la glándula mamaria durante la diferenciación al final de la preñez. Se utilizó ratas preñadas en el día 19 (P19) u ovariectomizadas (Ovx), con o sin el tratamiento de reemplazo con esteroides ováricos (E2 o P4). Mediante distintos zimogramas realizados con las proteínas aisladas de mama total se estudió la presencia y actividad de proteasas metalodependientes (MMP) y serina-proteasas como activadores del plasminógeno (PA). Se observó 2 bandas de actividad gelatinolítica, una de 66 kDa correspondiente a la MMP-2 y otra de 76 kDa correspondiente a la proenzima. La actividad de MMP-2 aumentó (31.6±0.4%) en las mamas diferenciadas por la OvX vs. P19 ($p < 0.001$), incrementando (26±1%) al administrar E2 ($p < 0.001$, OvX vs OvX+E2). El tratamiento con P4, que inhibe la diferenciación por OvX, revirtió el efecto de ésta ($p > 0.05$; P19 vs OvX+P4). La proMMP-2 mostró el doble de actividad lítica in vitro en las mamas no diferenciadas ($p < 0.001$). Por Northern Blots se observó que los transcritos para MMP-2 y MMP-9 son altos en estro y diestro, disminuyen fuertemente en la preñez y bajan aún más con la OvX vs. P19 ($p < 0.001$). Mediante zimogramas con caseína y plasminógeno se determinó la presencia de tres bandas de lisis.

Una de 82 kDa que correspondería al tPA y no varía con la diferenciación de la mama ($p > 0.05$), otra de 43 kDa observable solo en las mamas diferenciadas o tratadas con E2 (correspondiente al uPA) y una banda mayoritaria (27 kDa) que mostró una actividad incrementada al doble cuando la glándula no es secretante (P19 y OvX+P4, $p < 0.001$). Estos resultados indican una modulación de la actividad proteolítica y por lo tanto de la remodelación glandular por los esteroides ováricos en la transición de lactogénesis I a lactogénesis II.

327. (187) LA LEPTINA ACTIVA LA VÍA JAK-STAT E INHIBE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-3 EN CÉLULAS DE PLACENTA. VARONE CECILIA (1), PÉREZ PÉREZ ANTONIO (2), MAYMÓ JULIETA (1), SÁNCHEZ-MARGALET VÍCTOR (2).

Departamento de Química Biológica-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad de Buenos Aires, Argentina (1) Depto Bioquímica Medica y Biología Molecular, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España (2)

La leptina es producida por las células de placenta para actuar de forma autócrina en las mismas células trofoblásticas como factor de crecimiento y con un efecto anti-apoptótico. Recientemente hemos descrito estos efectos de la leptina en las células JEG3, tanto por experimentos de estimulación, como inhibiendo la expresión de la leptina en las mismas células trofoblásticas mediante el tratamiento con un oligonucleótido antisentido. El receptor de leptina pertenece a la familia del receptor de IL-6. Por ello en el presente trabajo, estudiamos la vía de señalización JAK-STAT, cuya activación por leptina (al igual que IL-6) ha sido demostrada en otros sistemas. La activación de JAK-2 por leptina fue evidenciada por inmunoprecipitación y análisis por inmunoblot con anticuerpos anti-fosforilina. La leptina también activa de forma dependiente de la dosis STAT-3, como se demostró por inmunoblot con anticuerpos que reconocen la forma activa (fosforilada). Para estudiar la señalización apoptótica estudiamos la activación de caspasa-3 en respuesta a la privación de suero. Observamos que la leptina inhibió la aparición de la forma activa de caspasa-3 en estudios de inmunoblot con anticuerpos específicos. En conclusión la leptina activa la vía JAK-2-STAT -3 en células de placenta de forma similar a la descrita en otros sistemas. Por último el efecto anti-apoptótico de la leptina en células trofoblásticas queda confirmado por el efecto inhibidor sobre la activación de caspasa-3.

328. (162) ACCIÓN DE LA HIPERANDROGENIZACIÓN SOBRE EL ÚTERO DE RATONES BALB/C. LA METFORMINA COMO TRATAMIENTO. EVELIN ELIA, LOMBARDI EDUARDO, DI GIROLAMO GUILLERMO, GONZÁLEZ CLAUDIO, MOTTA ALICIA BEATRIZ

CEFYBO Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA

La receptividad uterina (RU) disminuye en mujeres con Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS) y la metformina (M) la reestablece. Objetivo: estudiar la acción de la M en los cambios (morfológicos/funcionales y estado oxidativo) del tejido uterino (TU) en condiciones de hiperandrogenismo. La poliquistosis ovárica en ratones hembras prepúberes BALB/c fue inducido con dehidroepiandrosterona sc (DHEA: 60 mg/Kg peso, 0.05 ml aceite) por 20 días (DHEA). La M (Montpellier, 50 mg/Kg peso, 0.05 ml agua) fue administrada en forma oral por cánula conjuntamente con DHEA (DHEA±M) y los controles (C) con vehículo, $n=12$ ratones/grupo. El 70% de los animales C presentó morfología del TU con características proliferativas (FP: predominio de células estromales con glándulas rectas y tubulares, estroma compacto y uniforme) y el 30% en fase secretora (FS: enrollamiento y compactación de los vasos sanguíneos, típico aspecto de incrementada secreción glandular). El 70% de animales del grupo DHEA presentó TU en FS y 30% en FP. El grupo DHEA+M tenía % de FP y FS como C. La actividad uterina de la óxido nítrico sintasa (NOS: pmol/gr.min, conversión de timidina tritiada)

fue mayor en el grupo DHEA (1.4 ± 0.15) vs C (0.60 ± 0.06 , $p < 0.005$) mientras que la M previno parcialmente este efecto (DHEA+M: 1.10 ± 0.02 , $p < 0.005$ vs C). El glutatión (G: $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteína, metabolito antioxidante, por óxido/reducción con NADPH y glutatión reductasa) disminuyó con DHEA (3.23 ± 0.54) vs C (7.03 ± 0.65 , $p < 0.005$) y la M evitó este efecto: DHEA+M: 6.8 ± 0.80 , $p < 0.005$). Podemos concluir que el hiperandrogenismo modifica la morfología uterina con predominio secretor (pobre RU) sobre el proliferativo (alta RU) e incrementa el estado oxidativo del TU ya que aumenta la actividad de la NOS y disminuye la producción de G. La M reestablece la morfología del TU y previene el estado pro oxidativo, parámetros relacionados con la RU durante la preñez.

329. (125) hCG Y AMPc REGULAN LA EXPRESIÓN DE LEPTINA EN CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS. MAYMÓ JULIETA (1), CALVO JUAN CARLOS (1, 2), VARONE CECILIA (1)

Departamento de Química Biológica-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- UBA (1) Instituto de Medicina y Biología Experimental (2)

La leptina es una hormona proteica de 16 KDa descubierta en tejido adiposo con la función de determinar el balance energético del organismo. La expresión de leptina y sus receptores se evidenció también en placenta, pudiendo tener efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación, afectando funciones maternas y fetales, por mecanismos autócrinos y parácrinos. Resultados de nuestro grupo demostraron que en células trofoblásticas JEG-3 y BeWo, el promotor de leptina es activo, con elementos específicos responsables de regular su actividad basal. Por otro lado observamos que el tratamiento con estradiol $0.1 \mu\text{M}$ o hCG $10\text{-}100\text{UI}/\text{ml}$, presenta un efecto inductor sobre la transcripción de la proteína. El objetivo del presente trabajo es estudiar los mecanismos reguladores involucrados en la expresión de leptina por hCG, utilizando como modelo la línea BeWo. Se realizaron ensayos de Western blot y de gen reportero en experimentos de transfección transitoria, con plásmidos conteniendo delecciones seriadas del promotor del gen de leptina. Observamos una estimulación en la expresión de leptina por hCG de hasta 5 veces, en todas las regiones promotoras analizadas. Mediante un análisis in silico del promotor hallamos posibles elementos regulados a través de la vía de señalización por AMPc. Por Western blot observamos que AMPc $1 \mu\text{M}$ es capaz de estimular la expresión de leptina mientras que a concentración 1mM inhibe dicha expresión. Resultados similares se observaron a nivel transcripcional mediante ensayos de gen reportero. Más aún, determinamos que AMPc 1mM inhibe la activación del promotor ejercida por hCG $100\text{UI}/\text{ml}$. Finalmente analizamos la vía de señalización de las $10 \mu\text{M}$ (inhibidor específico de MEK) inhibe la MAPK. El tratamiento con PD98059 inducción en la expresión de leptina mediada por hCG. Los resultados obtenidos aumentan la comprensión de los mecanismos reguladores de la expresión de leptina en trofoblastos humanos por hCG y AMPc.

330. (124) CARACTERIZACIÓN DE LA CORRIENTE ESTIMULADA POR ALDOSTERONA EN UNA LÍNEA CELULAR DE PLACENTA HUMANA (BEWO). DEL MÓNACO SILVANA, ASSEF YANINA, KOTSIAS BASILIO A.

Laboratorio de Neurofisiología. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

En estudios previos detectamos la expresión del canal epitelial de sodio sensible al amiloride y estimulado por aldosterona (ENaC) en la línea celular BeWo derivada de placenta humana. El objetivo de este trabajo es caracterizar la corriente transportada por ENaC en dichas células mediante la técnica electrofisiológica de patch clamp en su configuración de célula entera. Las células BeWo cultivadas con aldosterona (100 nM , 12 h) evidenciaron un incremento significativo de las corrientes iónicas entrantes luego de la aplicación de 8-Br AMPc ($100 \mu\text{M}$, 25 min), con una densidad de conductancia de $165.5 \pm 43.9\text{ pS}/\text{pF}$ (entre -40

y -140 mV) y un corrimiento significativo del potencial de reversión (Er) de -19.9 ± 18.3 mV a 4.2 ± 7.6 mV ($p < 0.0001$, $n = 20$). El reemplazo del Na^+ extracelular por cantidades equimolares de un catión no permeante (NMDG) produjo una reducción de la corriente en un $55 \pm 30\%$ (a -140 mV) y el retorno del Er a un valor de -33.5 ± 7.1 ($p < 0.001$, $n = 7$). El reemplazo del Na^+ extracelular por K^+ no produjo modificaciones en la corriente activada ni corrimiento del Er (8.8 ± 5.2 mV, $n = 6$). Con el reemplazo por Li^+ se mantuvo la intensidad de corriente y el Er (7.0 ± 4.5 mV, $n = 7$). La corriente sensible al amiloride ($10 \mu\text{M}$) observada en solución extracelular de Na^+ , K^+ y Li^+ presentó una conductancia de 47.9 ± 14.9 , 16.7 ± 9.3 y 70.5 ± 26.6 pS/pF, respectivamente. Los coeficientes de permeabilidad relativa fueron de 0.2 para PNMDG/PNa, 0.6 para PK/PNa y 1.3 para PLi/PNa, indicando una relación de permeabilidad $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NMDG}$. Nuestros resultados indican que en las células BeWo la aldosterona estimula una corriente tipo ENaC con características similares a las que presenta el canal en otros tejidos. La reactividad de las células de placenta a la aldosterona sugiere la importancia del transporte de sodio también en el trofoblasto humano y de la regulación que podría efectuar la hormona en el mismo.

- 331. (123) EXPRESIÓN DE TGF-BETA1 Y VEGF EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN HCG.** GONZALEZ CANDELA, RULLI SUSANA, GONZALEZ BETINA, HUHTANIEMI ILPO, CALANDRA RICARDO S, GONZALEZ-CALVAR SILVIA I

IByME; Universidad de Turku, Finlandia; Fac Medicina UBA

Recientemente se describió en ratones transgénicos (TG) que sobreexpresan hCG (cepa Fvb/n), una hipertrofia de las células de Leydig (CL) a las 3 sem de edad la cual disminuye hacia la adultez (Rulli y col; Endocrinology, 144: 4980, 2003). El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión testicular a las 3 y 8 sem de edad del Factor de Crecimiento Transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y su correceptor endoglina, el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular A (VEGF-A), sus isoformas y receptores VEGF-R1 y VEGF-R2. Los controles utilizados fueron testículos provenientes de ratones Fvb normales (WT). Por RT-PCR semicuantitativa se detectó en TG un aumento en la expresión génica de: a) TGF- $\beta 1$ a las 8 sem ($p < 0.05$), b) endoglina a las 3 sem ($p < 0.05$) y c), VEGFA total, sus isoformas (VEGF-A 120, 164 y 188) y VEGF-R2 en TG de ambas edades ($p < 0.05$). La estimulación "in vitro" de testículos WT (8 sem) durante 15 y 30 min. con TGF- $\beta 1$ a 1ng/ml aumentó los niveles de VEGF-A y endoglina, mientras que con 10ng/ml se observó una disminución en la expresión de VEGF-A ($p < 0.05$). No se detectaron cambios en la expresión de VEGF-R1 y R2. Por histoquímica se determinó que la expresión de VEGF-A se localiza en CL. En conclusión, en TG que presentan niveles elevados y continuos de hCG se observa un incremento en la expresión de TGF- $\beta 1$, el cual, de manera dosis dependiente, regula la síntesis de VEGF-A. Así, TGF- $\beta 1$ muestra un efecto bifásico: bajas concentraciones de este factor estimulan la expresión VEGF-A y endoglina la cual conduce a una hipertrofia celular, mientras que concentraciones mayores inhiben este fenómeno. La detección VEGF-A en CL sugiere un rol local de este factor.

- 332. (120) INTERLEUQUINA 1 BETA EN EL TESTÍCULO: SU ROL EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA 2 (COX2) Y POSIBLES IMPLICANCIAS SOBRE LA FERTILIDAD MASCULINA.** MATZKIN MARIA EUGENIA, GONZALEZ-CALVAR SILVIA INES, MAYERHOFER ARTUR, CALANDRA RICARDO SAUL, FRUNGIERI MONICA BEATRIZ

IByME-CONICET, Medicina-UBA, LMU-Munich, Alemania, IMBICE, La Plata

Previamente describimos:1) un aumento del número de macrófagos conteniendo IL1 β e inducción de la expresión intersticial de ciclo-oxigenasa (COX2, enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas, PGs) en biopsias testiculares de

pacientes infértiles; 2) expresión de COX2 en testículos de hámsteres mantenidos en fotoperíodo normal (FN, 14h luz:10h osc) pero no en los expuestos a fotoperíodo corto (FC, 8h luz:16h osc); 3) inducción de fibrosis testicular por PGJ2 e inhibición de la síntesis de testosterona por PGF2 α (Frungieri y col, Fertil Steril 2002;78: 298; PNAS USA 2002; 99:1507; Endocrinology 2006; 147). En este trabajo se estudió la expresión testicular de IL1 β , sus receptores I y II (RI y RII) y su efecto sobre la expresión de COX2, en el hámster y en biopsias de pacientes con arresto germinal y síndrome de células de Sertoli solo. Células de Leydig (CL) inmunoreactivas para COX2 se aislaron por:1) microdissección con láser en biopsias de pacientes infértiles;2) digestión enzimática y gradiente de Percoll en hámsteres adultos expuestos a FN. Por RT-PCR y/o inmunohistoquímica se estableció que, en biopsias patológicas humanas y en hámsteres expuestos a FN, las CL que contienen COX2, expresan IL1 β , RI y RII. Además, IL1 β aumentó significativamente la expresión de COX2 en CL de hámsteres activos (RT-PCR semicuantitativa; densitometría, unidades arbitrarias; basal: 1 ± 0.2 ; IL1 β 50 ng/ml: 8.1 ± 0.7 , $P < 0.05$). Testículos de hámsteres regresionados que no expresan COX2, tampoco expresan IL1 β . En resumen, IL1 β induce la expresión testicular de COX2. La ausencia de COX2 en testículos humanos de morfología normal se asociaría con un bajo número de macrófagos que contienen IL1 β . En cambio, en biopsias patológicas, que presentan un elevado número de macrófagos, se detecta expresión de COX2, IL1 β , RI y RII en CL. Se sugiere un rol clave de IL1 β en la inducción testicular de COX2 y síntesis de PGs en estados patológicos.

SISTEMA CARDIOVASCULAR III

- 333. (656) LA TRANSFECCIÓN CON GEN DE VEGF HUMANO EN EL INFARTO DE MIOCARDIO OVINO REDUCE EL ÁREA NECRÓTICA Y PRESERVA LA RELACIÓN FUERZA FRECUENCIA DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO.** VERA JANAVEL GUSTAVO (1), OLEA DANIELA (1), CABEZA MECKERT PATRICIA (2), BERCOVICH ANDRÉS (3), CRISCUOLO MARCELO (3), MELO CARLOS (3), CROTTOGINI ALBERTO (1), LAGUENS RUBÉN (2)

(1) Universidad Favaloro (2) Fundación Favaloro (3) BIODSIDUS

Introducción: Hemos demostrado el efecto angio-miocardiogénico de un plásmido conteniendo el gen del VEGF humano de 165 aminoácidos (pVEGF) en ovejas con infarto agudo de miocardio (IAM) de 15 días de evolución. Nuestro objetivo fue evaluar, en un plazo mayor, el efecto del pVEGF sobre el tamaño de infarto y la relación fuerza-frecuencia (RFF), cuya ausencia es signo precoz de progresión hacia la insuficiencia cardíaca, en un modelo ovino de IAM. Métodos: 16 ovejas adultas (24.1 ± 0.5 kg) fueron agrupadas al azar para recibir 10 inyecciones intramiocárdicas de 3,8 mg de pVEGF ($n=8$, grupo VEGF) o plásmido vacío ($n=8$, grupo placebo) una hora después de ligar la descendente anterior y la segunda diagonal. A los 60 días se registró la presión intraventricular izquierda (Millar MikroTip) a 250 Hz durante 10 segundos, para calcular la presión de fin de diástole, las velocidades de desarrollo de presión máxima y mínima (dP/dt max y dP/dt min) y la frecuencia cardíaca (FC), y se cuantificó el tamaño de infarto como porcentaje del área ventricular izquierda (morfometría). La RFF se obtuvo como ajuste de regresión lineal entre la dP/dt max y la FC. La clave de los grupos se mantuvo oculta hasta el fin del procesamiento de datos. Resultados: la RFF fue normal en el grupo VEGF ($R=0.94$; $p < 0.001$) pero no se mantuvo en el grupo placebo ($R=0.3$; $p=NS$). Las presiones de fin de diástole fueron similares en ambos grupos (placebo: 6.6 ± 0.7 mmHg; VEGF: 8.3 ± 0.8 ; $p=NS$) descartando un efecto de las condiciones de carga sobre la dP/dt. Además, la correlación entre la dP/dt min, como índice de estado lusitropico, y la FC se mantuvo en el grupo VEGF ($R= -0.87$; $p < 0.005$) pero estuvo ausente en el placebo ($R= -0.45$; $p=NS$). El área del IAM

fue menor en el grupo VEGF (23,6±1,94%) que en el placebo (32,7±2,7%; p< 0,02). Conclusión: en el IAM ovino de 60 días de evolución, el pVEGF reduce el tamaño de infarto y preserva la RFF, sugiriendo que atenúa la progresión hacia la insuficiencia cardíaca.

334. (500) EL POSCONDICIONAMIENTO ISQUEMICO ATENÚA LA LIBERACIÓN DE MMP-2 EN CORAZONES AISLADOS DE CONEJO. DONATO MARTÍN, D'ANNUNZIO VERONICA, MUZZIO MARIA LUZ, MIKSZTOWICZ VERONICA, LORENZO CARRIÓN CRISTINA, BERG GABRIELA, WIKINSKI REGINA, GELPI RICARDO J.

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Las metaloproteasas (MMP), un grupo de endopeptidasas, están involucradas en el daño producido por isquemia y reperusión. Además, su liberación es atenuada por el precondicionamiento isquémico. Sin embargo, no es conocido el efecto del poscondicionamiento isquémico (Poscon) sobre la liberación de MMP-2. Objetivo: Evaluar si el Poscon modifica la liberación de MMP-2 luego de 30 min de isquemia global. Corazones aislados e isovolúmicos de conejos fueron perfundidos según la técnica de Langendorff. En G1 (n=8) se realizó una isquemia global de 30 min seguidos de 2 hs de reperusión. En G2 (n=9), luego de la isquemia global de 30 min se realizaron dos ciclos de reperusión/isquemia de 30 seg cada uno (Poscon), seguidos por 2 hs de reperusión. En 4 corazones de cada grupo, elegidos al azar, se tomaron muestras del efluente coronario en situación basal, a los 2, 5 y 30 min del período de reperusión y se midió la actividad de MMP-2 por zimografía cuantitativa en geles con gelatina, se cuantificaron las áreas gelatinolíticas como áreas relativas (AR) y se expresaron como porcentaje de su valor basal. Luego de 2 hs de reperusión se midió el tamaño de infarto utilizando trifenil tetrazolium, el cual fue expresado como porcentaje del área del VI. X±ESM.*p< 0.05 vs. Basal; p> 0.05 vs. G1. R: Reperusión; ND: No detectable. El tamaño de infarto en G1 fue de 16.2±1.2% y en G2 fue de 5.4±1.1%. Conclusión: El Poscon atenúa la liberación de MMP-2 durante la reperusión, disminuyendo el tamaño de infarto. Estos datos preliminares sugieren que el Poscon protegería del daño por isquemia/reperusión, atenuando la activación de las MMP-2.

Liberación de MMP-2

	Basal	2 min R	5 min R	30 min R
G1 (%)	100±0.0	104.7±15.7	92.6±4.5	61.8±18.7
G2 (%)	100±0.0	37.1±4.2#*	33.4±10.1#*	ND

335. (270) EXPRESIÓN DE GENES NUCLEARES QUE INFLUENCIAN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL: EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (ISRA) EN EL ENVEJECIMIENTO. CAVANAGH ELENA MV DE (1), FERDER LEÓN (2), FLORES IDHALIZ (2), INSERRA FELIPE (1)

Instituto de Investigaciones Cardiológicas - Fac. Medicina - UBA-CONICET (1) Ponce School of Medicine, Ponce, Puerto Rico (2)

La iSRA atenúa la reducción del número de copias del ADN mitocondrial (ADNmt) y mejora la función mitocondrial en el envejecimiento. Para investigar si dicho efecto se relacionaba con cambios en la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas involucradas en la replicación y transcripción del ADNmt, ratas Wistar de 4 meses recibieron agua de beber conteniendo: Enalapril (10 mg/kg.día, E) o Losartan (30 mg/kg. día, L), o agua pura (V) por 18 meses. Ratas de 4 meses fueron controles jóvenes (J). Al final del estudio las ratas recibieron pentobarbital (50

mg/kg), se extrajeron los hígados, y se aisló ARNm. El contenido de ARNm de: NRF1, NRF2 (factores de transcripción, controlan la expresión de genes nucleares para subunidades de la cadena de transporte de electrones mitocondrial), Tfam (factor de transcripción de genes mitocondriales), mtSSB (proteína auxiliar en la replicación del ADNmt), Tomm20 (importador de proteínas), PGC1 (regulador de biogénesis mitocondrial), receptor de angiotensina II tipo 1, y tipo 2A, se determinó por "real time-PCR", utilizando SYBRGreen, y oligonucleótidos específicos. Resultados [expresados como: ng ARNm x (ug ARN/g tejido fresco)]: a) NRF1, 0.05±0.01 (V), 0.11±0.02#* (E), 0.09±0.02# (L), 0.02±0.001 (J); b) NRF2, 6.24±1.01 (V), 3.79±0.83* (E), 3.80±0.62#*(L), 2.63±0.56* (J); Tfam, 5.07±0.81# (V), 5.81±1.51# (E), 6.99±0.49#(L), 1.64±0.25 (J); mtSSB, 11.1±2.05# (V), 31.9±9.90#*‡ (E), 9.50±1.31#(L), 2.52±0.27 (J); Tomm20, 8.42±2.05#*‡‡ (V), 4.10±0.74 (E), 3.47±0.86 (L), 2.25±0.41 (J); PGC1: 15.2±2.6†# (V), 25.6±4.9# (E), 25.1±3.1#(L), 3.55±1.03 (J); AT1R: 3.72±0.65#*‡‡ (V), 2.05±0.21 (E), 1.98±0.36 (L), 1.88±0.34 (J); AT2RA: 0.41±0.08† (V), 1.16±0.33# (E), 0.70±0.24 (L), 0.13±0.05 (J) (#p< 0.05 vs J, *p< 0.05 vs V, ‡p< 0.05 vs L, †p< 0.05 vs E). Conclusión: La iSRA protegería el ADNmt y mejoraría la función mitocondrial modificando la expresión de genes para la replicación y la transcripción del ADNmt.

336. (671) SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA HIPOTALÁMICO E HIPERTENSIÓN ARTERIAL POR SOBRECARGA DIETARIA DE FRUCTOSA. MAYER MARCOS, HOCHT CHRISTIAN, OPEZZO JAVIER, TAIRA CARLOS, FERNÁNDEZ BELISARIO, PUYO ANA

Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA

Un modelo animal utilizado para estudiar la interacción entre resistencia a la insulina e hipertensión arterial (HTA) es la rata hipertensa por sobrecarga dietaria de fructosa. Nuestra hipótesis es que el aumento de la presión arterial (PA) observado en este modelo se debería en parte a cambios en la regulación hipotalámica de la PA mediada por sistemas angiotensinérgicos locales. Estudiamos: 1) los efectos de la perfusión intrahipotalámica de irbesartan (antagonista de los receptores at-1 para angiotensina II) sobre el metabolismo catecolaminérgico hipotalámico y parámetros hemodinámicos, y 2) los efectos de la inyección intrahipotalámica de angiotensina II sobre parámetros hemodinámicos. Ratas machos fueron divididas en dos grupos: (f): fructosa (10 %p/v por 6 semanas); (c): grupo control. Se canuló una arteria para determinación de la PA media (PAm). En un primer experimento se colocó una sonda de microdiálisis en hipotalamo anterior y se perfundió irbesartan (50 y 500 µg/ml) y se evaluaron los cambios hemodinámicos y sobre la liberación hipotalámica de catecolaminas en c y f. En otro experimento, se estudiaron los efectos de la inyección intrahipotalámica de angiotensina II (5 y 50 ng). La perfusión intrahipotalámica de irbesartan indujo una disminución de los niveles de noradrenalina en f (% basal: 58±7, p< 0,05), sin modificar significativamente los niveles en c(%basal: 82±7, ns). Por otra parte se observó una mayor respuesta hipotensora a irbesartan (500 µg/ml) en f que en c (dPAm: f:-16,3±1 mmHg vs c:-0,3±4,1 mmHg; p< 0,05) mientras que se observó una respuesta presora a la angiotensina II incrementada en f con respecto a c, en ambas dosis estudiadas (dPAm: f:13,3±1,5 mmHg vs c: 6,9±1,8 mmHg; p< 0,05). Estos hallazgos pondrían de manifiesto la participación del sistema renina angiotensina hipotalámico en el desarrollo de la HTA asociada a insulino-resistencia en ratas f.

337. (586) MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS EN ADOLESCENTES Y SU RELACIÓN CON VALORES DE PRESIÓN ARTERIAL (PA). FRANA MARÍA SOL, SOBRERO SILVINA, MARTOS IVAN, PASSERINI LAURA, BRAVO LUNA MARTA

Dept. Cs. Fisiológicas, Biofísica, Fac. Cs. Médicas-UNR CIUNR

Introducción: Sobrepeso y obesidad en escolares son en la actualidad un problema de salud que se da en nuestro país. No

controlados se convierten en factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles en la adultez. Objetivo: Calcular medidas antropométricas en adolescentes y correlacionarlas con los valores de PA y hábitos alimentarios. Metodología. Estudio descriptivo transversal. Población: alumnos del EGB3 y polimodal, ambos sexos (M (n=50), F (n=40)). Mediciones: peso (P, kg), talla (T, cm), índice masa corporal (IMC, [peso/talla²]), perímetro braquial (PB cm), pliegues tricipital (Tr mm), subescapular (Se mm), PA (mmHg) sistólica (PAS), diastólica (PAD). Encuesta alimentaria (EA) desayuno (D), media mañana (MM), almuerzo (A), merienda (Me), cena (C) (categorías: siempre, nunca, a veces). Resultados. M/F, edad (años):15±2/15±2 [Edad menarca: 12±1]; P: 60±16/53±12; T: 166±10/157±7; IMC: 22±4/21±3; PB: 27±4/26±3, n.s.; Tr: 15±8/21±6 (t=3.61 p=0.001); Se: 11±6/15±6 (t=2.70 p=0.008). M/F, PAS: 109±12/102±8; PAD: 64±9/59±8, diferencias n.s. EA categoría siempre (%), χ^2 n.s.) M/F. D: 78/58; MM: 38/43; A:100/98; Me: 44/33; C: 82/68. Correlaciones (r,b±SE): M, PAS/P:0.65, 0.49±0.08 (p=0.000); PAS/T: 0.35,0.44±0.17 (p=0.01); PAS/IMC: 0.62, 1.73±0.32 (p=0.000). F, PAS/P:0.49,0.44±0.13 (p=0.001); PAS/T:0.33, 0.37±0.17 (p=.04); PAS/IMC: 0.42, 1.22±0.42 (p=0.006). M, PAD/P:0.42, 0.24±0.07 (p=0.002); PAD/T: n.s.; PAD/IMC: 0.41,0.84±0.27 (p=0.003). F, PAD/P: PAD/T y PAD/IMC: n.s. Conclusiones: 1. Las mediciones antropométricas sólo son significativas en pliegues debido posiblemente al crecimiento morfológico sexual disímil, y 2. así también podría explicarse la falta de correlación de PAD/talla en niñas. 3. el análisis preliminar de hábitos alimentarios muestra pautas adecuadas.

338. (265) ADN MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO PROTECTOR DE LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (ISRA). CAVANAGH ELENA MV DE (1), FERDER LEÓN (2), FLORES IDHALIZ (2), INSERRA FELIPE (1)

Instituto de Investigaciones Cardiológicas - Fac. Medicina - UBA-CONICET (1) Ponce School of Medicine, Ponce, Puerto Rico (2)

La iSRA aumenta la sobrevida y mejora la disfunción mitocondrial asociada al envejecimiento en roedores. Para investigar si estos efectos protectores pudieran estar relacionados con la prevención de la acumulación de la "deleción común del ADN mitocondrial" (ADNmt4834), ratas Wistar de 4 meses recibieron agua de beber conteniendo: Enalapril (10 mg/kg.día, E) o Losartan (30 mg/kg.día, L), o agua pura (V) durante 18 meses. Ratas de 4 meses fueron controles jóvenes (J). Al final del estudio las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (50 mg/Kg.), y se extrajeron los hígados. Estos se procesaron para extracción de ADN y preparación de mitocondrias. La frecuencia de la ADNmt4834 y la relación ADNmt/ADNnuclear (estimación de número de copias de mtADN) se determinaron por "real time-PCR", utilizando SYBRGreen. En mitocondrias aisladas se determinaron: producción de H₂O₂ (fluorometría), actividad de MnSOD (espectrofotometría), consumo de O₂ (electrodo de O₂) y actividad de NOS (conversión de 14C-Arg en 14C-citrulina). Resultados: no hubo diferencias entre los grupos en la frecuencia de la mtADN4834. Si presentaron diferencias: a) cociente ADNmt/ADNnuclear, 1.15±0.16 (V), 1.61±0.05#* (E), 1.62±0.04#* (L), 3.2±0.06* (J); b) producción de H₂O₂ (nmol/min.mg prot), fue de 9.42±0.91 (V), 6.76±0.93* (E), 6.34±0.88* (L) y 2.99±0.58* (J); c) Mn-SOD (U/mg prot), 64.1±0.20 (V), 35.4±0.21* (E), 33.6±0.43* (L), 30.9±0.27* (J); d) ADP/O, 1.75±0.22 (V), 2.79±0.41* (E); 3.23±0.30* (L), 3.01±0.54* (J); e) NOSmt (nmol citrulina/min.mg prot), 0.69±0.04 (V), 1.01±0.07* (E), 1.21±0.43* (L), 1.05±0.11* (J), (# p< 0.05 vs. J, * p< 0.05 vs. V). Conclusión: la atenuación de la reducción en el número de copias del ADNmt por inhibición del SRA podría estar involucrada en la mejora de la función mitocondrial durante el envejecimiento, ya que el ADNmt codifica para 13 polipéptidos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La angiotensina II tendría un efecto nocivo sobre el ADNmt.

339. (713) PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO EN LAS ALTERACIONES VASCULARES

ASOCIADAS A UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO. RENNA NICOLAS FEDERICO, VAZQUEZ MARCELA, LAMA CRISTINA, GONZALEZ SUSANA, CACCIAMANI VALERIA, MIATELLO ROBERTO MIGUEL

IMBECU-CONICET

El objetivo de este trabajo es evaluar el papel de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en el modelo experimental FFHR a través del examen del remodelado vascular a nivel mesentérico, la expresión de NF- κ B y VCAM-1 tanto en tejido vascular como en tejido adiposo, y sus cambios a partir de la intervención con un potente barredor de superóxido, 4-OH-Tempol. Se estudiaron ratas Wistar Kyoto (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR), macho se distribuyeron en 4 grupos (n=8 c/u). Al finalizar el protocolo (10 semanas) se examinaron: presión arterial sistólica, peroxidación lipídica (TBARS), expresión de NF- κ B, AP-1 y VCAM-1 en arterias mesentéricas. Los datos cuantitativos (media±sem) se procesaron por ANOVA y post-test de Bonferroni. (*p< 0.001 v WKY y #p< 0.001 v FFHR). El mayor hallazgo de este estudio es la descripción del remodelado arterial mesentérico asociado al modelo FFHR y la expresión en este modelo de factores de transcripción en tejido mesentérico vascular y adiposo. Las arterias son capaces de modificar su estructura y función en respuesta a cambios en las condiciones hemodinámicas. Este remodelado es mediado por la síntesis y liberación de factores vasoactivos y de crecimiento producidos localmente. El aumento en la producción de superóxido en este modelo, evidenciado por el incremento en la peroxidación lipídica puede activar genes redox-sensibles. Entre ellos se encuentra el NF- κ B, que se asocia al aumento de expresión de moléculas de adhesión, como VCAM-1, lo que se confirma también en este modelo. Estos cambios fueron revertidos por la administración de tempol. 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.

Variables	WKY	WKY+T	FFHR	FFHR+T
PAS (mmHg)	134 ± 5,3	130 ± 6	177 ± 4*	168 ± 8,2*
TBARS(μmol/L)	50 ± 10	51 ± 9	154 ± 20*	70 ± 12 **
L/M arterias mesentéricas	12,2 ± 5,5	13,3 ± 1,7	8,5 ± 1,5*	13,5 ± 3 #
NF-KB vascular	37,5 ± 5	36 ± 5	98 ± 14*	37,5 ± 6,6#
VCAM-1 vascular	20 ± 4,5	22 ± 6	100 ± 6,2*	42 ± 7#

340. (691) RESPUESTA AUTONÓMICA CARDÍACA ANTE LA EXPOSICIÓN AGUDA A UNA SITUACIÓN DE HIPOBARIA. VIGO DANIEL EDUARDO, PÉREZ LLORET SANTIAGO, PÉREZ CHADA DANIEL, HÜNICKEN HORACIO, VIDELA ALEJANDRO, ALMITRANI EDGARDO, MERCURI JORGE, ROMERO RAMÓN, NICOLA SIRI LEONARDO, CARDINALI DANIEL

Lab. de Neurociencias, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA; CONICET; Servicio de Neumonología, Hospital Universitario Austral; Instituto Nacional de Medicina Aeronáutica y Espacial, Fuerza Aérea Argentina; Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos; CONICET

Introducción: La evaluación de la respuesta autonómica cardíaca ante la hipoxia hipobárica revela una disminución global de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC). No se han estudiado los efectos que la hipobaría por sí misma pueda tener sobre la VFC. Objetivo: Evaluar si la VFC presenta cambios en relación con la exposición aguda a una situación de hipobaría, con y sin hipoxia. Métodos: Se analizaron 12 pilotos militares que como parte de su entrenamiento habitual realizan una prueba de hipoxia en cámara hipobárica. La misma consiste en un ascenso a una altitud simulada de 8000 metros respirando oxígeno por máscara, la interrupción del flujo de oxígeno hasta la aparición del primer síntoma de hipoxia y el descenso a 0 metros. Se re-

gistró la duración del intervalo RR en mediante un holter Holtech HCAA 348 (Servicios Computados SA, Buenos Aires). Los distintos componentes de frecuencia de la VFC se separaron mediante la transformada wavelet: alta frecuencia (HF), atribuido a la arritmia sinusal respiratoria; baja frecuencia (LF), atribuido a las ondas de Mayer; y muy baja frecuencia (VLF), tomado como indicador de cambios en la frecuencia cardíaca media en cada etapa. Se calculó el área bajo la curva de cada componente de frecuencia para cada etapa y se compararon diferencias mediante ANOVA de medidas repetidas seguido de Bonferroni. Resultados: HF: $F=29$ $p < .003$; LF: $F=15.9$ $p < .009$ y VLF: $F=5.8$ $p < .05$. LF y HF disminuyen en relación a la hipobaría con normoxemia y lo hacen aún más en relación a la hipoxia. VLF no se modificó en relación a la hipobaría y aumentó en relación a la presencia de hipoxia. Discusión: Los cambios observados en relación a la hipoxia se pueden atribuir al cambio abrupto de frecuencia cardíaca propio de la hipoxemia. Los cambios observados en relación a la hipobaría aparecen como independientes de cambios en la frecuencia cardíaca, pudiendo obedecer al efecto de la hipobaría sobre la mecánica ventilatoria y la hemodinamia de los sujetos.

ENDOCRINOLOGÍA IV

- 341. (117) IMPACTO MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL DE LA INMUNO-NEUTRALIZACIÓN DE TIMULINA SÉRICA SOBRE LA ADENOHIPÓFISIS EN RATONES PREPUBERALES.** CAMIHORT GISELA (1), LUNA GEORGINA (1, 2), FERESE CELIA (2), BRACAMONTE MARÍA (1), GOYA RODOLFO (3), CÓNSOLE GLORIA (1, 2)

Cátedra 'B' de Histología-Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP (1); Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs As: CICBA. (2); INIBIOLP (3)

La timulina ejerce una importante influencia sobre el sistema neuroendocrino durante la ventana madurativa perinatal. El objetivo del presente estudio fue evaluar el impacto sérico y morfológico de la neutralización de la timulina sérica en ratones hembras (H) y machos (M) C57BI/6 inyectados con suero normal de conejo (SNC) o con antisuero anti-timulina (AAT) (20 µl/g, vía ip) durante la primera semana. A los 33 días fueron sacrificados, obteniéndose pituitarias procesadas para microscopía óptica y muestras séricas para el dosaje de hormonas pituitarias mediante RIE y bioensayo para timulina. Se inmunomarcó con un sistema anti-HH-EnVision-DAB. Se registraron densidad de volumen, densidad de células y tamaño celular. La PRL, LH, FSH, GH, TSH y timulina séricas fueron significativamente menores ($p < 0.01$) en los animales AAT de ambos sexos comparados con sus controles. Las poblaciones somatotropa ($M58 \pm 2$ vs 42 ± 4 $H56 \pm 2$ vs 43 ± 1), lactotropa ($H23 \pm 1$ vs 10 ± 2 $M21 \pm 2$ vs 7 ± 1) y corticotropa ($M13 \pm 1$ vs 4 ± 0.1) mostraron un descenso significativo en el número de células ($p < 0.001$), con aumento del tamaño celular en tirotropas ($M53 \pm 5$ vs 106 ± 6), corticotropas ($M60 \pm 2$ vs 115 ± 9), somatotropas ($M66 \pm 8$ vs 82 ± 6 $H55 \pm 9$ vs 64 ± 6), LH ($M69 \pm 7$ vs 89 ± 6 $H49 \pm 2$ vs 78 ± 6) y FSH ($M65 \pm 6$ vs 82 ± 5 $H46 \pm 2$ vs 76 ± 7). Nuestros datos confirman la importancia de la timulina en la maduración de las poblaciones adenohipofisarias.

- 342. (147) ESTUDIO DEL EFECTO DE FACTORES DE INHIBICIÓN LIPÍDICA SECRETADOS POR CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS SOBRE LA DIFERENCIACION DE ADIPOCITOS Y METABOLISMO OXIDATIVO.** JULIANELLI VANINA LAURA (1), CALVO JUAN CARLOS (1, 2), GUERRA LILIANA NOEMI (1)

Dto. Química Biológica-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA (1) IByME, CONICET (2)

Anteriormente, informamos la inhibición de la acumulación de lípidos (Tg), por factores proteicos, derivados de células epiteliales mamarias murinas (NMMG), en adipocitos 3T3-L1. Extendemos este estudio a líneas celulares de origen epitelial o no y a

parámetros de estrés oxidativo. Métodos: Utilizamos medio condicionado de: NMMG (MC), HeLa, HEP G2, JEG-3 y glioma C6; cultivadas con 10% de suero fetal bovino (SFB). 3T3-L1 fueron diferenciadas (CP, control positivo) y los diferentes medios condicionados probados. Se cuantificó Tg como índice de diferenciación, enzima superóxido dismutasa (SOD) y enzima glutatión peroxidasa (GPx). Resultados: MC inhibe la producción de Tg en un 65.7% respecto de CP; medios condicionados de HEP G2, JEG-3 y Glioma C6 produjeron una inhibición significativamente menor ($p < 0.01$) que el MC: 50, 17 y 37% respectivamente; mientras que el condicionado por HeLa inhibió un 56%, que no fue significativamente diferente de MC. La diferenciación indujo la actividad de SOD (CP: 41.5 ± 2.4 U/g prot, vehículo: 26.0 ± 0.4 U/g prot, $p < 0.01$) y GPx (225 ± 12 U/g prot, vehículo: 35 ± 13 U/g prot, $p < 0.01$). MC y medio condicionado de HeLa no inhiben significativamente las actividades enzimáticas. Finalmente, se cultivaron células NMMG con diferentes concentraciones de SFB (1%-20%). Estos medios condicionados inhibieron significativamente la producción de Tg respecto de CP, de igual forma que el MC con 10% SFB. Conclusiones: Factores presentes en el medio condicionado de células de glándula mamaria normal inhibirían la acumulación de triglicéridos en los adipocitos 3T3-L1, independientemente de la concentración de SFB y en mayor porcentaje que los obtenidos de otros tipos celulares epiteliales o de glioma. La diferenciación de los adipocitos 3T3-L1 induciría la actividad de las enzimas SOD y GPx, mientras que el medio condicionado de NMMG no las afectaría, sugiriendo que no alteraría el estado redox celular.

- 343. (400) LA 6-iodo-DELTA LACTONA (IL) REPRODUCE SÓLO ALGUNOS DE LOS EFECTOS DEL IODURO.** LISA THOMASZ, ALEJANDRA DAGROSA, LEÓN KRAWIEC, MARIO PISAREV, GUILLERMO JUVENAL

Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica

El yodo es utilizado por la glándula tiroidea para sintetizar hormonas tiroideas pero además posee un rol regulatorio a través de la síntesis de lípidos iodados. Uno de ellos la IL, derivado del ácido araquidónico, reproduce la acción inhibitoria del exceso de yodo en la función y el crecimiento glandular. El objetivo fue comparar el efecto del I y la IL sobre distintos aspectos de la función tiroidea y estudiar a la IL como posible mediador del I en el mecanismo autorregulatorio. Como modelo experimental se utilizaron folículos obtenidos de tiroides bovinas en suspensión los cuales fueron incubados con TSH (T) (500 µU/ml), T+KI (10 µM) o T+IL (10 µM) durante 72hs. Para los estudios de captación de I los folículos fueron incubados 1h con ^{125}I . Tanto el KI como la IL inhibieron la captación de ^{125}I (cpm/ug prot), T: 121 ± 12 , T+IL: $44 \pm 7^{**}$, T+KI: $37 \pm 9^{**}$. La inhibición por parte de la IL fue a nivel de la membrana celular mientras que el yodo también inhibió los niveles del mRNA del NIS (transportador del I). Para confirmar el efecto a nivel de membrana se estudió la captación de Deoxiglucosa en presencia y en ausencia de MMI. T: 8 ± 1.2 , T+IL: $3 \pm 0.7^{*}$, T+KI: $3 \pm 0.7^{*}$, T+M: 7 ± 0.8 , T+M+IL: $3 \pm 0.5^{*}$, T+M+KI: 8 ± 1 (cpm/µg prot). Por otra parte tanto el KI como la IL inhibieron la Na⁺/K⁺ ATPasa (30 y 25% resp.) Al estudiar el efecto de KI y de IL sobre la síntesis proteica mediante un pulso de marcación con ^{35}S -Metionina durante 1h ambos compuestos produjeron una inhibición respecto a TSH. T: 41 ± 5 , T+IL: $22 \pm 4^{**}$, T+KI: $22 \pm 4^{**}$ (cpm/ug prot). El KI inhibió la síntesis de Tiroglobulina (45%) así como la síntesis de su mRNA (40%) mientras que la IL no tuvo efecto sobre estos parámetros. En lo que respecta a los factores de transcripción específicos tiroideos el KI inhibió los niveles del mRNA de Pax-8, pero no los de TTF1. La IL no alteró los niveles de éstos mensajeros. Conclusión: la IL reproduce sólo algunos de los efectos del yodo

- 344. (216) ESTUDIO COMPARATIVO DEL TESTICULO EN DOS LINEAS DE RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS ÚNICA DE ALOXANO EN EL POSDESTETE.** VAZQUEZ SILVIA M., HISANO NORIYUKI

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

Resultados previos que presentamos (SAIC, 2004) indicaron que el aloxano inyectado en ratas en el posdestete provocaba una alteración en la histología testicular en ratas de la línea "m", desarrolladas en nuestra Facultad. En la presente comunicación comparamos dichos resultados con los obtenidos en las ratas Sprague-Dawley. Ratas machos de la línea Sprague-Dawley se inyectaron con una dosis intraperitoneal de Aloxano (A) (24 mg/100g de peso corporal) (n=10) a los 25 días de edad. A ratas controles (C) se les inyectó agua destilada (1cc/100g de peso corporal) (n=5). Los animales se pesaron, se determinó la glicemia y se sacrificaron con sobredosis de éter a los 31 días de edad. Se diseccionaron los testículos y se pesaron. Fijados en Bouin y refijados con formaldehído al 4% en PBS. Fueron procesados según las técnicas histológicas de rutina, coloreados con H-E, PAS+H. Los resultados se expresan en media \pm SEM y fueron analizados estadísticamente. Las ratas inyectadas con aloxano se dividieron en: A1 (glicemia > 300 mg/dl) y en A2 (glicemia 118.16 \pm 4.55 mg/dl). El peso corporal: 111.5 \pm 3.37 g (C); 97 \pm 0.91 g (A1) (P < 0.05); 107.33 \pm 1.72 g (A2). El peso testicular: 0.75 \pm 0.04 g (C); 0.69 \pm 0.01 g (A1); 0.80 \pm 0.01 g (A2). La histología del epitelio testicular está afectado en ambas líneas, inclusive en las ratas Sprague Dawley que mostraron una hiperglicemia leve, siendo más significativos los cambios morfológicos en la línea "m". Se observan acúmulos basófilos densos (picnosis), cariorrexis y cariólisis en la luz tubular. La línea Sprague-Dawley manifestó valores de hiperglicemia menor con respecto a la línea "m". En la semana post-inyección del aloxano, se observan lesiones en el epitelio germinal en ambas líneas, aún en aquellas que mostraron una hiperglicemia leve, lo que sugerirían un efecto tóxico del aloxano sobre el testículo.

345. (217) ESTUDIO CUANTITATIVO DE NEURONAS NADPH DEL PLEXO DE AUERBACH EN CIEGO DE RATAS DIABÉTICAS. GEUNA JESICA, HISANO NORIYUKI

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

El plexo de Auerbach, formado por neuronas y glías que conforman ganglios unidos por tractos nerviosos, configura una imagen reticular propia de cada segmento del tubo digestivo. El óxido nítrico (NO) es un neurotransmisor no-adrenérgico no-colinérgico (NANC) inhibitorio del Sistema Nervioso Entérico, relaja el tracto gastrointestinal. La reducción de nitroblue tetrazolium (NBT) en presencia de NADPH (nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducida) revela la actividad enzimática de la forma constitutiva de la NO sintetasa (nNOS). En la diabetes hay alteraciones dependientes de NO. Se analizan las neuronas NADPH-positivas del plexo de Auerbach en ciego de ratas Sprague Dawley diabéticas por inducción con aloxano que destruye las células beta del páncreas. Ratas Sprague Dawley machos posdestetados de 25 días de edad fueron inyectadas vía intraperitoneal con aloxano (24 mg/100g de peso corporal). 11 ratas [5 control (C), 6 aloxanizadas (A): glicemia > 300mg/dl] fueron sacrificados con sobredosis de éter a los 115 días de edad. Se diseccionó cada ciego y se lavó con PBS. Fueron fijados en paraformaldehído 4% en PBS, incubándose con NBT y NADPH-diaforasa (técnica histoquímica del NADPH). Las neuronas NADPH-positivas se contaron mediante una cuadrícula colocada en el ocular 10x en un microscopio Zeiss. Los datos se expresan como media \pm SEM y fueron analizados estadísticamente con el test "t" de Student. Se observa que la estructura ganglionar y reticular del plexo se mantiene en las ratas diabéticas. Cuantificando las neuronas se obtuvo: A: 3.37 \pm 1.64/mm², C: 10.05 \pm 2.75/mm² (P < 0.05); siendo el peso corporal: A: 241.83 \pm 49.67g, C: 550.08 \pm 30.34 g (P < 0.05); el peso del ciego: A: 2.04 \pm 0.45g, C: 1.74 \pm 0.26 g (P < 0.05) y la longitud del mismo: A: 7.32 \pm 0.34cm, C: 6.56 \pm 0.63 cm (n.s.). La diabetes aloxánica disminuye el peso corporal, aumenta el peso cecal, sin modificación de la longitud cecal con disminución de la cantidad neuronal NADPH +.

346. (243) EFECTOS DE LA METFORMINA Y LOS PRODUCTOS DE GLICACIÓN AVANZADA (AGES) SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES RAGE Y GALECTINA-3. ARNOL VERONICA, SCHURMAN LEON, GANGOITI MARIA VIRGINIA, MCCARTHY ANTONIO DESMOND, CORTIZO ANA MARIA, SEDLINSKY CLAUDIA

UNLP Hospital Frances, Bs As

Los AGEs o productos de glicosilación avanzada se hallan involucrados en el desarrollo de patologías relacionadas con el envejecimiento y con las complicaciones crónicas de la Diabetes mellitus. Se han descrito diversas alteraciones óseas (osteopenia, osteoporosis) en pacientes diabéticos, lo cual podría asociarse con la acumulación de AGEs en el hueso. Previamente hemos descrito que estos productos ejercen efectos deletéreos en osteoblastos en cultivo, alterando su crecimiento, diferenciación y mineralización. Estos efectos son mediados a través de la interacción y regulación positiva de dos receptores para AGEs: RAGE y galectina-3. Recientemente nuestro grupo demostró que la metformina, una biguanida insulino-sensibilizadora, ejerce efectos directos y de tipo osteogénico en modelos de osteoblastos. También demostramos que esta droga es capaz de bloquear los efectos deletéreos de los AGEs en osteoblastos en cultivo. En el presente trabajo nos propusimos investigar los mecanismos a través de los cuales la metformina induce tal inhibición. Analizamos la expresión de receptores para AGEs por Western immunoblot en dos líneas osteoblásticas en cultivo (UMR106 y MC3T3E1). Las células se incubaron durante 24-48 h con albúmina sérica bovina (BSA) o AGE-BSA (100 - 200 μ g/ml), en presencia o ausencia de metformina (500 μ M). Los AGEs indujeron un incremento significativo (p < 0.01) en la expresión de RAGE sin alterar la expresión de galectina-3 en los osteoblastos no transformados MC3T3E1; mientras que en las células de osteosarcoma UMR106, 200 μ g/ml AGE-BSA incrementó la expresión de ambos receptores. La co-incubación con metformina bloqueó la regulación positiva de los receptores inducida por los AGEs. Estos resultados sugieren que al menos in vitro la metformina previene los efectos deletéreos que los AGEs ejercen sobre los osteoblastos a través de la regulación de la expresión de sus receptores.

347. (285) FEOCROMOCITOMA COMO MANIFESTACIÓN INICIAL DEL SÍNDROME DE PARAGANGLIOMA FAMILIAR TIPO 1. VIEITES ANA MARÍA (1), SANSÓ GABRIELA (1), LEVIN GLORIA (1), DAHIA PATRICIA (2), BARONTINI MARTA (1)

(1) *CEDIE* (2) *Dept. Medicine and Cellular and structural Biology. University of Texas Health Science Center*

Los paragangliomas de cabeza y cuello son tumores infrecuentes que se originan en la cresta neural. Son neoplasias altamente vascularizadas, habitualmente benignas, que pueden originarse más frecuentemente en la bifurcación carotídea constituyendo los tumores de cuerpo carotídeo. Se ha identificado al gen SDHD como un gen susceptible para el síndrome de paraganglioma familiar tipo 1 (PGL1), afección que se transmite en forma autosómica dominante con un patrón de herencia de imprinting materno. El gen SDHD es un gen supresor tumoral, localizado en el cromosoma 11q23 que codifica para la subunidad D del complejo succinato dehidrogenasa representando la subunidad más pequeña del citocromo b, componente del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial. Recientemente se han asociado mutaciones en la línea germinal del gen SDHD con susceptibilidad para el feocromocitoma. Se presenta 4 generaciones de una familia con feocromocitoma como manifestación inicial del PGL1. El caso índice fue un varón que presentó feocromocitoma a los 37 años, con el antecedente de tumor del glomus carotídeo. El estudio molecular del gen SDHD fue realizado por secuenciación automática y posterior digestión enzimática para la confirmación del resultado. Se encontró una delección de 2 nucleótidos (c. 341-2AT del) que provoca un cambio del marco de lectura comenzando en el codón 114 en 14/26 familiares estudiados (3-88a). El

fenotipo se heredó solamente por línea paterna sugiriendo imprinting materno. Seis miembros de la familia presentaron evidencia clínica de enfermedad. En todos se encontró tumor de cuerpo carotídeo y en uno de ellos feocromocitoma recidivante. Los 8 portadores restantes con edades entre 3 y 20a permanecen libres de enfermedad (seguimiento de 7a). En conclusión el estudio molecular de pacientes con Feocromocitoma permite establecer el diagnóstico etiológico, y el adecuado seguimiento de la enfermedad con la consecuente la implementación de un tratamiento más efectivo.

348. (418) ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO INSERCIÓN/DELECIÓN DEL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA EN LA NEFROPATÍA DE LA DIABETES MELLITUS (DM) TIPO 2. DI CAPUA CECILIA (1), MONJE LILIANA (2), ARRIAGA SANDRA (3), BOUVET BEATRIZ (3), DELLA ROSA GRISELDA (4), SARANO HECTOR (2), GUTIERREZ ANA (4), ALMARA ADRIANA (1) (3)

IBR (1) Facultad de Cs. Médicas (2) Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (3) CEMAR (4)

Un polimorfismo I/D en el intrón 16 del gen de la ECA podría estar asociado con el desarrollo o la progresión de la nefropatía diabética (ND), considerándose la presencia del alelo D como un factor de riesgo para esta complicación. El objetivo de este trabajo fue comparar la distribución genotípica del polimorfismo I/D entre dos grupos (G) de pacientes con DM tipo 2 de más de 5 años de evolución: G1 (n=29; edad=66 ± 7 años) con nefropatía clínica (proteinuria > 0,5 g/día) y G2 (n=26; edad=69 ± 8 años) sin ND. En G1 también se evaluó la incidencia de ingreso a hemodiálisis (HD), según el genotipo, en un período de dos años. Se determinaron: perfil lipídico (método enzimático), HbA1c (cromatografía de intercambio iónico), clearance de creatinina (método cinético) y proteinuria de 24 hs (turbidimetría). Los genotipos de la ECA se identificaron por PCR anidada y electroforesis en agarosa 1,5%. No se observaron diferencias significativas entre G1 y G2 en edad, sexo, duración de la diabetes, presión arterial o % de HbA1c. Las frecuencias genotípicas (II/ID+DD) fueron similares en ambos grupos: G1= 0,21/0,79 y G2= 0,15/0,85 (p > 0,5). En G1, los individuos II (n=6) presentaron mayores niveles de triglicéridos (media ± DE; mg/dl) que los sujetos portadores del alelo D (n=23): II=369 ± 139 vs ID+DD=181 ± 96 (p < 0,001) y menores niveles de colesterol-HDL (media ± DE; mg/dl): II=31 ± 7 vs ID+DD=40 ± 12 (p < 0,05), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre II y ID+DD en presión arterial y % de HbA1c (mediana/rango: 9,4/5,1-11,2 y 7,4/5,1-12,9, respectivamente, p=0,2). La incidencia de HD fue similar entre individuos II y ID+DD: 33,3% vs 34,8% respectivamente (p=0,4). Se concluye que el polimorfismo I/D de la ECA no tiene un rol esencial en el desarrollo y la progresión de la ND. Las alteraciones lipídicas observadas podrían contribuir al deterioro de la función renal como coadyuvantes en una patogenia multifactorial.

349. (505) ESTUDIO DE LA CARGA SUPERFICIAL ERITROCITARIA EN PACIENTES DIABÉTICOS. LEBENSOHN NATALIA, D ARRIGO MABEL, CARRERA LARISA, D OTTAVIO ALBERTO, VALVERDE JUANA, FORESTO PATRICIA

Lab. Inmunoheorreología - Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR; Cát. Hist. y Embr. - Fac. Cs. Médicas. CIUNR

La glicosilación no enzimática (GnoE) de las proteínas se considera uno de los mecanismos fundamentales en la génesis de las complicaciones micro y macrovasculares de la Diabetes y está relacionada directamente con el grado de control metabólico. La interacción entre glucosa y proteínas, resulta en cambios estructurales y funcionales y ha sido implicada en las secuelas patológicas de esta enfermedad (retinopatía, neuropatía, nefropatía, enfermedad cardiovascular, etc). Este proceso de GnoE también involucra proteínas de membrana, siendo una de las más afectadas, la glicoforinaA, responsable mayoritaria de la carga superfi-

cial eritrocitaria (CSE) negativa. La GnoE podría modificar parámetros hemorreológicos eritrocitarios tales como agregación, deformabilidad y propiedades viscoelásticas de membrana. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la GnoE sobre la CSE de membrana y agregación eritrocitaria en pacientes diabéticos. Se estudiaron 20 pacientes diabéticos (DBT) y 15 controles normales (CN). Se determinó la hemoglobina glicosilada (HbA1c) por cromatografía de intercambio catiónico; la CSE, se estudió por reparto (P) en un sistema bifásico carga sensible y la agregación eritrocitaria se estimó por estudio de imágenes digitalizadas de los agregados (ASP). Los resultados obtenidos en DBT y CN fueron: HbA1c(%) 13.5±3.2 y 6±1.5 (p < 0.05); P 0.38±0.11 y 0.90±0.09 (p < 0.05) y ASP 0.58±0.08 y 0.28±0.15 (p < 0.0001). Los pacientes diabéticos presentaron diferencias significativas en los resultados respecto de los individuos normales, en todos los parámetros estudiados. Los valores de HbA1c ponen de manifiesto el mal control metabólico de los pacientes evidenciando la GnoE de proteínas. Los resultados de P, significativamente disminuidos, muestran alteraciones de CSE eritrocitaria en pacientes diabéticos que podrían contribuir a comprender los mecanismos involucrados en las alteraciones de agregación demostrado a través del ASP.

350. (509) EL INCREMENTO POSTCASTRACIÓN DE TLR4 EN LA PRÓSTATA NO SE ASOCIA A TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE NF-KB. LEIMGRUBER CAROLINA, QUINTAR AMADO ALFREDO, AOKI AGUSTÍN, MALDONADO CRISTINA ALICIA

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

El receptor tipo Toll 4 (TLR4) es una proteína clave en la inmunidad innata por su capacidad para reconocer señales dañinas para el huésped; su activación lleva a la translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB, y a la expresión de citoquinas y moléculas de la respuesta inmune. Numerosas evidencias demuestran que la mucosa del tracto genital tiene un importante rol en la inmunidad innata. El objetivo de este trabajo fue investigar la modulación de la expresión de TLR4 y la activación de NF-κB por testosterona en la próstata. Se utilizaron ratas Wistar adultas, castradas en el día 0 y sacrificadas en el día 1, 3 (C3), 5 (C5), 7 (C7) y 12 (C12) posteriores a la orquidectomía. Otro grupo recibió testosterona (750 µg/rata/día) por 4 (C7T) o 5 días (C12T) a partir del 3° día (C7T) o del 7° día postcastración (C12T). Al finalizar los protocolos, se extrajo la próstata ventral para análisis morfológico y el estudio de la expresión de NF-κB y TLR4 por inmunocitoquímica y por western blot. A partir de C3, se observó aumento de TLR4 (ANOVA p < 0,05), que fue más significativo en C12 (ANOVA p < 0,01 vs. control). Por inmunocitoquímica, la marcación para TLR4 fue intensa a partir de C3, no sólo en células epiteliales, sino también en el músculo liso periacinar hipertrófico. NF-κB exhibió localización citoplasmática tanto en células epiteliales como en músculo liso, sin cambios respecto a los controles. Se observó activación de NF-κB sólo en células inmunes aisladas en el intersticio prostático. C7T y C12T demostraron que los cambios en la expresión de TLR4 observados en C7 y C12 son revertidos al restituir testosterona. Estos resultados indican que TLR4 es modulado por testosterona en la glándula prostática, reforzando el rol inmunosupresor de los andrógenos. El aumento de TLR4 postcastración no se acompaña de translocación de NF-κB, sugiriendo que la privación androgénica no genera señales activadoras de la vía clásica del sistema TLR4.

351. (550) LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DEL SISTEMA FAS/ FASL EN ADENOHIPOFISIS ES MODULADA POR LOS ESTEROIDES GONADALES. FERRARI LUCIANA, JAITA GABRIELA, ZARATE SANDRA, RADL DANIELA, ZALDIVAR VERONICA, PISERA DANIEL, SEILICOVICH ADRIANA

CIR. Facultad de Medicina

En nuestro laboratorio hemos observado un incremento en el porcentaje de lactotropos y somatotropos inmunorreactivos para

Fas y FasL en células adenohipofisarias cultivadas en presencia de estradiol. Además, hemos demostrado que la apoptosis de estas células, desencadenada por la activación del receptor Fas, es dependiente del estradiol. En el presente trabajo, evaluamos la expresión del receptor Fas (por RT-PCR) en células adenohipofisarias de ratas hembras Wistar ovariectomizadas cultivadas en presencia de estradiol (E2, 10-9 M). La expresión del receptor Fas (relación Fas/GADPH) fue mayor en presencia de estradiol que de vehículo (VEH: 0.5 ± 0.06 ; E2: 0.8 ± 0.03 ; $p < 0.05$). También estudiamos el efecto proapoptótico de FasL (10 ng/ml) en la población total de células adenohipofisarias y en somatotropos (identificados por inmunocitoquímica) cultivados con E2, progesterona (P4, 10-6M) o E2+P4. La activación de Fas indujo apoptosis de células adenohipofisarias incubadas con E2 (E2: 2.2%; E2+FasL: 3.8%; $p < 0.05$, χ^2) pero no en presencia de P4 (P4: 2.1%; P4+FasL: 2.6%; ns) o de una combinación de ambos esteroides (E2+P4: 2.8%; E2+P4+FasL: 2.7%; ns). Un patrón similar de respuesta apoptótica al FasL fue observado en somatotropos cuando estos fueron incubados con E2 (E2: 3.7%; E2+FasL: 8%; $p=0.05$, χ^2). El FasL no incrementó la apoptosis de somatotropos incubados con P4 (P4: 2.7%; P4+FasL: 2.7%; ns) o una combinación de ambos esteroides (E2+P4: 7.2%; E2+P4+FasL: 3.1%; ns). Estos resultados corroboran que el estradiol incrementa la expresión del receptor Fas en la adenohipofisis. Además, sugieren que la progesterona antagonizaría el efecto sensibilizador del estradiol a la acción proapoptótica del FasL.

352. (651) EXPOSICION PRE Y POST NATAL AL DISRUPTOR ENDOCRINO DEHP (DI-2-ETILHEXILFTALATO) MODIFICA EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIO-TESTICULAR EN RATAS MACHO PERIPUBERES. CARBONE SILVIA, SZWARCFARB BERTA, REYNOSO ROXANA, PONZO OSWALDO, CARDOSO NANCY, JAIME A MOGUILVSKY, SCACCHI PABLO

Laboratorio de Endocrinología-Fac de Medicina-UBA-CONICET

El DEHP es un éster de ftalato usado en la fabricación de artículos de PVC blando. Atraviesa placenta y puede producir efectos tóxicos en la progenie, induciendo malformaciones en tejidos andrógeno dependientes. Se estudió el efecto del DEHP en los mecanismos neuroendocrinos del desarrollo puberal en ratas macho y hembra (n=10 por grupo) peripúberes (30 días) expuestas al tóxico intra útero y post nacimiento. El DEHP fue administrado en el agua de bebida (300 ml/l) a la rata madre desde el primer día de gestación y durante la lactancia; post destete se suministró a las crías hasta el sacrificio. Se midieron LH y FSH por RIA (ng/ml) y el contenido hipotalámico (pmol/mg tejido) de aminoácidos neurotransmisores: aspartato (ASP) y ácido gamma-aminobutírico (GABA), por HPLC. Se detectó un descenso significativo de FSH en machos tratados, respecto a los controles (270.8 ± 33.1 vs 458.5 ± 47.7 ; $p < 0.001$), no hallándose diferencias en hembras (208 ± 52 vs 230 ± 38). Los niveles de LH no se modificaron en animales de ambos sexos tratados con DEHP (Hembras: 15.33 ± 1.4 vs 12.1 ± 1.5 ; Machos: 48.75 ± 4.97 vs 46.25 ± 2.73). El DEHP disminuyó significativamente ($p < 0.001$) el contenido hipotalámico de ASP (863 ± 37 vs 2033 ± 273) y aumentó GABA (2082 ± 161 vs 343.3 ± 37.2) en machos, sin producir modificaciones en las hembras. Los datos mencionados se correlacionaron con menor peso (mg) testicular (324 ± 32 vs. 406 ± 22) y presencia de criptorquidea en el 25% de las ratas macho expuestas al DEHP. Se concluye que la exposición pre y post natal al DEHP produce alteraciones en el eje hipotalámico-hipofisario-testicular de ratas machos peripúberes. Los resultados obtenidos sugieren que el disruptor endócrino podría alterar los mecanismos neuroendocrinos del desarrollo puberal actuando a nivel hipotalámico sobre los aminoácidos neurotransmisores.

353. (670) CARACTERIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR BROMOCRIPTINA EN MODELOS PROLIFERATIVOS DE CÉLULAS LACTOTROPAS Y

PARTICIPACIÓN DE PKC DELTA. PALMERI CLAUDIA, PETITI JUAN PABLO, ALVIN GABRIELA, DE PAUL ANA LUCIA, TORRES ALICIA INES

Centro de Microscopía Electrónica

La Bromocriptina (BC) genera regresión de células lactotropas en modelos proliferativos a través de diferentes tipos de muerte celular. Objetivo: caracterizar y cuantificar la muerte celular inducida por BC y evaluar la participación de isoformas de PKC. Ratas Wistar macho fueron estrogenizadas con cápsulas subcutáneas de Benzoato de estradiol (15 mg) por 20 días (E) y 5 días con BC (0,3mg/100g/día) (E+B). Grupo control sin tratamiento (C). La caracterización de la muerte celular se realizó por microscopía electrónica. La expresión de PKC alfa, epsilon, y delta fue analizada por Western Blot en fracciones citosólicas y nucleares. Los ARNm de las isoformas de PKC se estimaron por PCR en homogenatos hipofisarios. Análisis estadístico utilizado: ANOVA-Tukey. El grupo E+B presentó células en diferentes estadios involutivos, el 30% mostró el patrón de célula negra en comparación con un 5% en E y un 2% en C. Este tipo morfológico se caracterizó por marcada electrodensidad nuclear y citoplasmática con severa alteración de organelas y disrupción mitocondrial. No se observó fragmentación nuclear. La expresión de la holoenzima de PKC delta 78 kDa y su fragmento catalítico 38 kDa, fue mayor ($p < 0,001$) en la fracción nuclear del grupo E+B con respecto a E y C. En la fracción citosólica solamente se detectó PKC delta 78 kDa sin cambios significativos entre los grupos experimentales. La expresión de las holoenzimas PKC alfa y epsilon en fracciones citosólicas y nucleares fue mayor en E vs E+B ($p < 0.05$) y C ($p < 0.01$). Los niveles de ARNm de las tres isoformas de PKC incrementaron en E vs E+B y C ($p < 0.05$). El aumento de PKC alfa y epsilon y de sus ARNm estaría relacionado con la proliferación inducida por estrógenos. El principal patrón morfológico de muerte celular producido por BC fue el de célula negra. Los resultados obtenidos sobre la expresión de PKC delta y su activación en la fracción nuclear indicarían que esta quinasa mediaría los procesos de muerte inducidos por BC.

354. (735) ¿EXISTE CORRELACION ENTRE INDICADORES DE DAÑO OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE Y EL HIPOTIROIDISMO? CORIA MARIELA, PASTRÁN ADRIANA, SANTILLAN LUCAS, GIMENEZ MARÍA SOFÍA

Universidad Nacional de San Luis (CONICET) Hospital Regional San Luis

El hipotiroidismo es una enfermedad que afecta a gran parte de la población. El objetivo de este trabajo fue determinar en mujeres hipotiroideas (HT) e hipotiroideas subclínicas (HS) de San Luis los niveles de: lipoperóxidos como sustancias reactivas al Acido Tiobarbitúrico, TBARS, PON-1, enzima asociada a las HDL que pertenece al sistema antioxidante, y oxido nítrico usando el reactivo de Griess. Se estudiaron diez mujeres de 25 a 45 años HT (TSH mayor de 5 uIU/ml y T4 libre menor de 0,89 ng/dl), diez HS (TSH mayor de 5 uIU/ml y T4 libre normal) y diez mujeres eutiroides (ET) a quienes se les midió en suero TBARS, PON-1, NO. No hubo diferencia significativa entre los niveles de TBARS de HT e HS vs ET: $2.366E-05$ nmoles TBARS/mg prot $\pm 1.145E-05$, $2.023E-05$ nmoles TBARS/mg prot $\pm 1.086E-05$ y $3.436E-05$ nmoles TBARS/mg prot $\pm 1.124E-05$ respectivamente. No hubo diferencia entre los niveles de PON-1 de los tres grupos: HT: 546.60 U/min ± 54.001 , HS: 438.44 U/min ± 50.387 , ET: 621.09 U/min ± 66.38 ; ni en los valores de oxido nítrico: HT: 36.553 μ M/mg prot ± 32.491 , HS: 25.298 μ M/mg prot ± 22.858 , ET 23.812 μ M/mg prot ± 53.732 . Se compararon los valores de ET vs pacientes HT cuyas TSH fueran mayores a 85 uIU/ml para determinar si había diferencia entre los datos de ET y los que tenían altos valores de TSH. No hubo diferencias (TBARS: HT $3.447E-05$ nmoles TBARS/mg prot $\pm 2.376E-05$, ET $3.883E-05$ nmoles TBARS/mg prot $\pm 9.465E-06$, $P=0.8729$; PON-1: HT 420.92 U/min ± 103.52 , ET 524.57 U/min ± 54.935 , $P=0.4264$; NO: HT 56 μ M/mg prot ± 27.538 , ET 4.67 μ M/mg prot ± 1.202 , $P=0.1360$). Concluimos que no existe correlación entre los parámetros medidos y el hipotiroidismo.

FARMACOLOGÍA I

- 355. (137) MECANISMO DE ACCIÓN DE RALOXIFENO EN TEJIDO VASCULAR.** RAUSCHEMBERGER MARÍA BELÉN (1,2), POLINI NÉLIDA (1), SELLÉS JUANA (1), MASSHEIMER VIRGINIA (1,2)

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

El raloxifeno (Rx) es un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM) empleado como terapéutica para prevenir la pérdida de masa ósea en mujeres postmenopausicas. La menopausia implica también un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, pero poco se conoce sobre los efectos del Rx sobre la fisiología vascular. Hemos demostrado que, a nivel vascular el Rx estimula la síntesis de óxido nítrico (NO) y ejerce una potente acción antiagregante plaquetaria. En este trabajo estudiamos el mecanismo de acción a través del cual el Rx ejerce este efecto, y la posible participación de los sistemas mensajeros MAPK; PI3K y PKC. Empleamos anillos de aorta de ratas (4-6 meses de edad) tratados "in vitro" con Rx durante 1-5 min. Observamos que el SERM estimula la síntesis de NO a través de su unión al receptor de estrógenos (ER), ya que la preincubación con ICI182780 (antagonista de ER) suprime completamente su acción estimuladora (0.51±0.09 vs 0.82± 0.02; 0.52±0.03 vs 0.46±0.09 pmol NO/mg prot, control vs Rx en ausencia ó presencia de ICI 182780, p< 0.01). Se demostró que la vía MAPK no participa en el mecanismo de acción del fármaco, dado que no se obtuvieron diferencias significativas al evaluar la fosforilación proteica dependiente de MAPK, ni al cuantificar la producción de NO en presencia de un inhibidor MAPK (PD98059). En cambio, al igual que lo descrito para el 17-beta estradiol, se evidenció que la estimulación de la actividad NOS inducida por Rx es mediada por el sistema PI3K. El pretratamiento con el compuesto Ly 294002 (1uM) antagonizó totalmente la acción del 10 nM Rx (61% p< 0.01 vs 2% s/c, en ausencia o presencia de Ly resp.). Finalmente, observamos que la supresión de la actividad PKC con chelerythrine (1uM) disminuye significativamente la acción del Rx. Estos resultados sugieren que, a nivel vascular el Rx estimula la síntesis de NO a través de un mecanismo de acción que comprende la acción del ER y la participación de las vías mensajeras PI3K y PKC.

- 356. (186) ACTIVACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN CÉLULAS NIH3T3 TRATADAS CON INFLAMÓGENOS.** ESPAÑOL ALEJANDRO J., FISZMAN GABRIEL L, GOREN NORA, FRANCHI ANA M., SALES MARÍA E.

CEFYBO-CONICET, Facultad de Medicina, UBA Área Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

Se ha documentado que la inflamación crónica está asociada con patologías como la diabetes, la aterosclerosis o el cáncer. Hemos demostrado que la activación del sistema colinérgico no neuronal promueve la progresión tumoral. Nos proponemos estudiar el efecto de la activación colinérgica en fibroblastos murinos normales, NIH3T3, en ausencia o en presencia de una combinación de diferentes concentraciones de lipopolisacárido de E. coli con interferón gama (LPS+IFN) agregado al cultivo durante 24 hs. Por Western blot comprobamos que LPS+IFN induce un incremento de la expresión de CD40, un marcador de inflamación, en células NIH3T3. El tratamiento con LPS+IFN estimuló la acumulación de nitrito (uM) en el sobrenadante de cultivo en forma concentración dependiente, siendo la combinación más efectiva: LPS 10 ng/ml con IFN gama 0.5 ng/ml (12,40±0,59) con respecto a las células sin tratamiento (4,95±0,48) (p< 0,001). El agregado del agonista colinérgico muscarínico carbacol (CARB) produjo un incremento de la acumulación de nitrito en forma concentración dependiente, siendo la dosis efectiva máxima 10-9M en las células tratadas con LPS+IFN (14,52±0,46) y 10-8M en las células no

tratadas (6,77±0,80) p< 0,05. El efecto del CARB fue más eficaz en las células no tratadas (37%) que en las tratadas con LPS+IFN (17%) p< 0,05 con respecto al control sin CARB. La estimulación producida por CARB se redujo con atropina (10-5M) o con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS) NG-monometil-L-arginina (10-4M) tanto en células no tratadas (3,48±0,85) como tratadas con LPS+IFN (7,16±1,30) p< 0,001. Además el efecto estimulante del CARB en las células con LPS+IFN se redujo por la preincubación con indometacina (10-6M) (8,86±0,76) p< 0,001. Concluimos que en células NIH 3T3, el tratamiento con flogógenos como LPS+IFN incrementa la sensibilidad de la respuesta al CARB, medida como producción de nitrito, efecto que estaría mediado por productos de ciclooxigenasa.

- 357. (190) LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES COLINÉRGICOS M3 Y M1 ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES DE MAMA HUMANA.** MIDDONNO MARIA C. (1), FISZMAN GABRIEL L. (1), DE LA TORRE EULALIA (2), ESPAÑOL ALEJANDRO J. (2), SALES MARÍA E. (2) (1)

Area Investigación, Instituto de Oncología A.H. Roffo, UBA (1); CEFYBO-CONICET; Facultad de Medicina, UBA (2)

Previamente demostramos la presencia de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) en células provenientes de líneas de adenocarcinomas mamarios murinos. La activación de dichos receptores promueve la progresión tumoral. En este trabajo nos proponemos estudiar la expresión y función de los RCM en células tumorales de mama humana MCF-7. Por ensayos de Western blot (Wb) en lisados celulares, demostramos la expresión de los subtipos M3 > M4 > M1=M5 y ausencia del receptor M2. El tratamiento de las células MCF-7 con el agonista carbacol (CARB) 10-9M estimuló significativamente la proliferación con respecto al control sin tratamiento (55%, p< 0,05; n=5). El pretratamiento de las células con el antagonista no selectivo atropina (AT) o metabromuro de 4-difenilacetoxi-N-metil-piperidina (4-DAMP) antagonista M3 redujo totalmente el efecto del agonista, mientras que la pirenzepina (PIR), antagonista M1, produjo una inhibición parcial. Para estudiar la vía de señalización acoplada a la activación muscarínica, tratamos las células con 4-carboxifenil-N,N-difenilcarbamato (NCDC) inhibidor de fosfolipasa C, H-7, inhibidor de proteína quinasa C y NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS), los que redujeron significativamente el efecto proliferativo del agonista (18%; 2,3% y 4% respectivamente) (p< 0,05; n=3). El CARB estimuló la actividad de NOS medida como producción de nitrito (umol/106 cél) (4,59±0,23; n=3) con respecto al basal (1,76±0,09; n=3). El efecto se revirtió en presencia de AT, PIR y 4-DAMP. Por Wb demostramos la expresión de NOS1 y NOS3 en células MCF-7. Concluimos que la activación de receptores M3 y M1 promueve la proliferación celular vía NOS, en estas células de mama humana.

- 358. (194) [VVO₂ (SALICILALDEHÍDO SEMICARBAZONA)]: UN COMPLEJO DE VANADIO CON POTENCIALES PROPIEDADES ANTITUMORALES EN OSTEÓBLASTOS EN CULTIVO.** RIVADENEIRA JOSEFINA (1), BARRIO DANIEL A. (1), ARRAMBIDE GABRIEL (2), GAMBINO DINORAH (2), BRUZZONE LILIANA (3), ETCHEVERRY SUSANA B. (1,4)

Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP La Plata, Argentina (1); Cátedra de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (2); División Química Analítica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina (3); CEQUINOR Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina (4).

Los compuestos de vanadio presentan interés farmacológico por sus propiedades insulino-miméticas, osteogénicas y antitumorales. En vertebrados, el vanadio está presente en cantidades de traza y se acumula principalmente en tejido óseo. Como parte de un proyecto destinado a la síntesis de nuevos compuestos de

vanadio y el estudio de su bioactividad, el objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos de un complejo de vanadio(V) [VVO₂ (salicilaldehído semicarbazona)] sobre una línea de osteoblastos no transformados (MC3T3E1) en comparación con su acción sobre las células osteoblasto-similes UMR106 derivadas de un osteosarcoma de rata. Se investigaron los efectos sobre la proliferación celular (método del cristal violeta), diferenciación osteoblástica (producción de colágeno, método colorimétrico) y estrés oxidativo (oxidación de dihidrodamina determinada por fluorescencia). Los resultados muestran que el complejo resultó más citotóxico para los osteoblastos tumorales que para los normales en el rango de concentraciones de 2,5 a 50 µM, una forma dosis respuesta ($p < 0.001$). Por otra parte, este complejo inhibió la producción de colágeno en las células UMR106 en el rango de concentraciones de 2,5 a 50 µM ($p < 0.001$). A fin de indagar sobre alguno de los posibles mecanismos utilizados por este complejo para inhibir la proliferación celular, se estudió el efecto del mismo sobre el estrés oxidativo observando un aumento de la oxidación de DHR a rodamina en forma dosis respuesta, correlacionando con lo observado sobre la proliferación celular. Además, el derivado de vanadio(V) indujo importantes cambios morfológicos en los osteoblastos tumorales. En conclusión, estos resultados preliminares indican que el complejo de vanadio(V) inhibe con mayor eficacia la proliferación de la línea celular derivada del osteosarcoma, siendo un buen candidato para el estudio de complejos metálicos con potenciales propiedades antitumorales.

- 359. (253) EFECTO DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO Y SU EXCRECIÓN BILIAR.** DOMINIGHINI¹ ALICIA, FERRERO¹ MARIANA, CROSETTI¹ DIEGO, ALVAREZ² MARÍA DEL LUJÁN, RONCO² TERESA, WAGNER³ MARCELO, GURNI³ ALBERTO, CARNOVALE² CRISTINA, LUQUITA¹ ALEJANDRA

¹Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas. UNR; ²Fisiología, Cs. Bioquím y Farm-UNR, CONICET; ³Farmacobotánica- Farmacia y Bioquímica-UBA

En trabajos anteriores hemos demostrado que ratas tratadas con extracto crudo de *Ligaria cuneifolia* (Lc) por vía intraperitoneal (i.p.), disminuye el colesterol (Co) plasmático y aumenta la excreción de sales biliares (SB) y Co biliar. Objetivo: analizar el efecto del tratamiento con proantocianidinas de distinto peso molecular extraídas de *Ligaria cuneifolia* (PLc) sobre la concentración plasmática de Co y la excreción biliar de Co y sales biliares. Métodos: Se utilizaron ratas Wistar machos adultas Controles (C) (n=6) inyectadas i.p. con Solución Fisiológica y Tratadas (T) (n=8) inyectadas i.p. con PLc 2 mg /100g peso corporal, cada 24 horas durante 3 días. Al cuarto día las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal, i.p.), obteniéndose bilis por cateterización de colédoco y sangre por punción cardíaca. Se determinaron en plasma: Co (por método enzimático de esterasa-oxidasa), CoHDL, y CoLDL. En bilis: flujo biliar (por gravimetría), Co y SB, y se calculó la excreción biliar de Co y SB. Resultados: (media ± ES). Co plasmático (mg%): C : 83,50± 3,37, T: 72,77 ± 2,99*; Co HDL: C : 0,57± 0,05; T: 0,48 ± 0,06 ;CoLDL: C: 0,86±0,04; T: 0,69± 0,09*. Excreción biliar: SB (nmol/min.g hígado): C: 45,33 ± 3,30, T: 55,53 ± 3,29*; Co biliar (nmol/min.g hígado): C: 3,32 ± 0,41, T: 5,06 ± 0,57*. Flujo biliar (FB) (ml/min. g hígado): C: 1,99 ± 0,06, T: 2,23 ± 0,09* (* $p < 0,05$ vs. C). Conclusión: El tratamiento con PLc (dosis 2 mg%) produce un descenso de Co plasmático y CoLDL. La disminución del Co plasmático se debe al aumento de las velocidades de excreción biliar de Co y SB, que produce un aumento del FB. Estos resultados coinciden con los observados en el tratamiento con el extracto crudo de *Ligaria cuneifolia*.

- 360. (471) EL FLAVONOIDE PRENILADO 6PP PRESENTA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTI-RADICAL.** ELINGOLD IGAL, ISOLABELLA M. PAULA, CASANOVA MARTA, CELENTANO ANA M., PÉREZ CRISTINA, DIEZ ROBERTO A, CABRERA JOSÉ LUIS, DUBIN MARTA

CEFYBO UBA-CONICET; Dpto de Farmacología, Facultad de Medicina UBA; Dpto de Microbiología, Facultad de Medicina UBA; Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología UBA; Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Los flavonoides son parte de una familia de compuestos polifenólicos naturales que tienen un amplio rango de propiedades bioquímicas y farmacológicas. Participan en la inhibición de reacciones de autooxidación y el secuestro de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. El flavonoide 2'-4'-dihidroxi-5'- (1''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina (6PP) aislado de *Dalea elegans*, planta autóctona argentina, pertenece al subtipo de flavononas con grupos prenilo como sustituyentes. Resultados previos mostraron la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* intrahospitalario multirresistente. El objetivo del presente trabajo fue realizar una evaluación del efecto antioxidante de este compuesto. El ensayo de lipoperoxidación microsomal NADPH-dependiente fue medido por el método del ácido tiobarbitúrico en una suspensión de microsomas de hígado de rata. La adición del 6PP produjo inhibición de la lipoperoxidación a las concentraciones 12,5; 25; 50 y 100 µM, $p < 0,01$. El consumo de oxígeno microsomal, fue determinado por el método α -polarográfico empleando un oxígrafo con electrodo de Clark. El agregado del M, con una inhibición máxima del compuesto 6PP inhibió el consumo a 25, 50 y 100 µM, $p < 0,01$. La actividad antirradical fue evaluada $< 87,9 \pm 4,3\%$ en 100 µM, p espectrofotométricamente (a 517 nm) por el secuestro del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH, Sigma, St Louis, MO, EEUU). Tras evaluar diferentes condiciones, en ensayo a 20 minutos con DPPH 25 µM, el 6PP (entre 10 y 100 µM) secuestró el DPPH, alcanzando una disminución máxima con respecto al control de $63 \pm 9\%$, $p < 0,01$. La actividad antioxidante fue determinada espectrofotométricamente por la formación de un complejo de fosfomolibdeno. El 6PP produjo la reducción de Mo (VI) a Mo (V) entre 0,1 y 100 µM. Los resultados obtenidos demuestran una acción antioxidante y anti-radical de este flavonoide y sugieren el interés de profundizar su estudio orientado a una eventual aplicación terapéutica.

GASTROENTEROLOGÍA I

- 361. (105) PROBIÓTICO BIOFLORA EN LA INMUNOMODULACIÓN Y EN LA PREVENCIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INTESTINAL, EN RATAS.** LAUDANNO OSCAR MIGUEL, J CESOLARI, A GODOY, E SUTICH, S SARANCONE, J CATALANO

Facultad Medicina de Rosario – Gastroenterología

Estudiar al Probiótico Bioflora (Bio) como inmunomodulador de los linfocitos T (CD4+) y B (CD20) en mucosa gastrointestinal e impedir la translocación bacteriana intestinal. Grupos randomizados de ratas Wistar (n = 10 c/grupo), 200 g, se realizó: I. Estrés (E) por inmovilización e inmersión en agua 22 °C 7 hs.; Indometacina (Indo) 10 mg/Kg sc c/24 hs 3 días (testigo). II. Bio 1 ml (6 x 10⁸ UFC) dado orogástrico c/12 hs 3 días; Indo E. Al 4° día, en asepsia, se realizó laparotomía, extirpación del hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y ciego, para cultivos microbiológicos; también se extirparon estómago, ileon y colon, para histoquímica de CD4+ y CD20. Se usó test de Fisher y Kruskal-Wallis. En I. se halló en ciego un sobredesarrollo bacteriano 6 x 10¹⁰ UFC ($P < 0.01$) y los cultivos en hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos todos (+); en contraste en Bio en ciego sin sobredesarrollo bacteriano 3 x 10⁶ UFC ($P < 0.02$), los cultivos en hígado y bazo (-) y en ganglios sólo 2 (+) y 8 (-) ($P < 0.01$). La histoquímica mostró un incremento marcado de linfocitos T (CD4+) en ileon y colon. Conclusiones: El probiótico Bioflora fue inmunomodulador intestinal con aumento de linfocitos T (CD4+) e impidió la translocación bacteriana intestinal.

- 362. (437) ACTIVIDAD DE CALPAINA II EN EL HÍGADO DE RATA SOMETIDO A INJURIA POST-ISQUEMICA.** CUTRÍN

JUAN CARLOS (1,2), PERRELLI MARIA GIULIA (2), CAVALIERI BARBARA (2), POLI GIUSEPPE (2)

Centro de Patología experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires (1). Institución Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Torino (2).

La alteración de la talina y de bax sería responsable de la formación de "blebs" y de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial determinantes de la muerte por oncosis. Si bien estudios de inmunomicroscopía electrónica han indicado la presencia de calpaina I en la matriz mitocondrial, no existe evidencia de actividad de calpaina II en el hígado. Se estudió su comportamiento en el curso del daño por reperfusión en ratas Wistar macho. Mediante técnicas de inmunoprecipitación se estudió la presencia del dominio III (regulatorio) de la calpaina II en fracciones de membranas y mitocondrias en hígado de ratas controles y en extractos de membranas y en mitocondrias aisladas de hígados sometidos a isquemia normotérmica lobar selectiva de 90 min y 60 min de reperfusión, se determinó la actividad de la enzima mediante fluorimetría: liberación de amino-metilcumarina (AMC)/mg prot/min. Se estudiaron los niveles de talina y bax por medio de "westernblotting" en las fracciones de membrana y mitocondria respectivamente como también el grado de fosforilación del dominio III. La extensión del daño hepatocelular se evaluó morfológica y bioquímicamente por ALT en plasma. Se comprobó presencia de calpaina II en los extractos de membranas y mitocondrias; la IR determinó: aumento de su actividad en un 67% y 95% (control: 3.4 ± 0.5 nmol AMC/mg prot/min y 23.3 ± 6.0 pmol AMC/mg prot/min, respectivamente; disminución del nivel de fosforilación del dominio III en un 31% y 65% (control: 36 ± 0.3 y 57 ± 0.9 unidades arbitrarias, respectivamente); la mayor actividad de calpaina se asoció con pérdida de talina (33%) y de bax (32%). La actividad de ALT aumentó un 98% (control: $50.5 \pm U/l$). Estos cambios serían al menos en parte responsables de la pérdida de la estabilidad de la membrana plasmática y de la regulación de la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. La desfosforilación de su dominio regulatorio jugaría un papel clave en el aumento de su actividad.

363. (561) LA VIA PLC/PKC MEDIA LOS EFECTOS INHIBITORIOS DEL CNP SOBRE LA LIBERACIÓN DE AMILASA Y LA SECRECIÓN PANCREÁTICA ESTIMULADA POR SECRETINA. SABBATINI MARIA EUGENIA, VATTA MARCELO S., DAVIO CARLOS A., BIANCIOTTI LILIANA G.

Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA; Cátedra de Fisiología-IQUIMEFA-CONICET; Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA

En estudios previos demostramos que CNP en acinos pancreáticos posee un efecto bifásico concentración-dependiente (estimulación a 0.1 y 1pM e inhibición a 1,10 y 100nM) sobre la liberación de amilasa. Asimismo reduce el AMPc en las concentraciones del orden nM. Se estudiaron las vías relacionadas con la reducción de amilasa y los niveles de AMPc. Se incubaron acinos pancreáticos en presencia de CNP, GF-109203X (GF) (inhibidor de PKC) y U73122 (U) (inhibidor de PLC) y se midió AMPc por RIA. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM; *: $p < 0.05$ vs. Control (C); †: $p < 0.05$ vs. CNP. Se muestra resultados de CNP 100nM. Los inhibidores anulaban el efecto del CNP sobre el AMPc (pmol/mg proteínas) (C: 2.3 ± 0.2 ; U: 2.3 ± 0.4 , GF: 1.8 ± 0.3 ; CNP: 1.3 ± 0.2 *; CNP + U: 2.05 ± 0.3 †; CNP + GF: 2.56 ± 0.3 †). La inhibición de la liberación de amilasa por CNP en estas concentraciones estaría mediada por reducción de AMPc a través de la vía PLC/PKC acoplada a NPR-C. En trabajos in vivo observamos que en presencia de secretina (SC) (1 y 2U/Kg/h), el CNP (1 y 2 μ g/Kg/h) reduce la respuesta de SC, pero a menores concentraciones de ambos existe potenciación. La reducción de la actividad de AC estimulada por CNP podría explicar la reducción de la secreción pancreática estimulada por SC. Se midió entonces en acinos pancreáticos AMPc en presencia de SC, CNP,

GF y U. El efecto de CNP sobre el AMPc estimulado por SC se anuló por los inhibidores. †: $p < 0.05$ vs. SC, ‡: $p < 0.05$ vs. CNP+SC (SC 100nM: 9.7 ± 0.9 *; CNP 100nM + SC: 5.1 ± 0.4 †; CNP 100nM+ SC + U: 10.3 ± 1.1 ‡; CNP 100nM + SC + GF: 14.8 ± 1.4 ‡), lo que indica que la vía PLC/ PKC participa en la inhibición del CNP sobre la secreción pancreática estimulada por SC. Los resultados del presente trabajo indican que la vía PLC/PKC media la inhibición del CNP sobre la liberación de amilasa y la secreción pancreática estimulada por SC mediante la reducción del AMPc.

364. (609) EFECTOS DE ENDOTELINA 1 (ET-1) SOBRE LA SECRECIÓN BILIAR EN LA RATA. RODRIGUEZ MYRIAN R., VATTA MARCELO S., BIANCIOTTI LILIANA G.

Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA Cátedra de Fisiología-IQUIMEFA-CONICET, FFyB, UBA

Diversos estudios muestran que las endotelinas poseen efectos sobre la función digestiva. En trabajos anteriores demostramos que la ET-3 administrada periféricamente induce efecto colerético en la rata a través de receptores ETB acoplados a la formación de óxido nítrico. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de la ET-1 a nivel periférico sobre el flujo biliar, receptores y las posibles vías involucradas. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 230-250 g de peso corporal a las que se les canuló el conducto hepático común para la recolección de muestras de bilis a distintos tiempos (30,60,90 y 120min) y vena yugular para la infusión de solución fisiológica (controles (C)) o de ET-1 (0.5,1,5 y 10 ng/kg/min). La infusión de ET-1 produjo efecto colerético de manera dosis dependiente. Los resultados se expresan como μ l/min/100g peso corporal \pm SEM. Se muestran solo resultados de ET-1 (5 ng/kg/min) (*: $p < 0.05$ vs C) 30: 5.04 ± 0.37 vs. 7.13 ± 0.5 *; 60: 4.79 ± 0.32 vs. 7.3 ± 0.6 *; 90: 4.7 ± 0.2 vs 7.09 ± 0.6 *; 120: 4.58 ± 0.32 vs. 7.92 ± 0.42 *. El antagonista del receptor ETB (BQ788) carece de efectos per se sobre la secreción biliar pero inhibió el efecto colerético de ET-1 (*: $p < 0.05$ vs. C) 30: 5.09 ± 0.23 *; 60: 4.88 ± 0.2 *; 90: 4.75 ± 0.32 *; 120: 4.44 ± 0.32 *. El antagonista del receptor ETA (BQ610) no modificó el efecto de ET-1. No obstante, la vagotomía troncular anuló el efecto colerético de ET-1 (*: $p < 0.05$ vs. C) 30: 3.82 ± 0.19 *; 60: 3.9 ± 0.03 *; 90: 3.78 ± 0.09 *; 120: 3.92 ± 0.21 *. La administración de L-NAME bloqueó asimismo la respuesta inducida por ET-1 (*: $p < 0.05$ vs. C) 30: 5.54 ± 0.37 *; 60: 5.51 ± 0.31 *; 90: 4.97 ± 0.47 *; 120: 5.29 ± 0.52 *. Estos resultados muestran la ET-1 administrada a nivel periférico induce en la rata, de la misma manera que ET-3, un efecto colerético mediado por el nervio vago a través de la estimulación de receptores ETB acoplado a la vía del óxido nítrico.

365. (710) EFECTO PROTECTOR DE LA CURCUMINA EN EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL HIPOCAMPO DE RATAS HIPERTENSAS PORTALES. ROSELLÓ DIEGO MARTIN (1), BALESTRASSE KARINA (2), COLL CARLOS (1), COLL SEBASTIÁN (3), GURNI ALBERTO (4), TOMARO M LUJAN (2), LEMBERG ABRAHAM (1), PERAZZO JUAN CARLOS (1)

Laboratorio de Hipertensión Portal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (1) Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (2) Facultad de Medicina, UBA (3) Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (4)

La Hipertensión Portal (HP) y la Encefalopatía Hepática (EH) son complicaciones de la cirrosis o de la trombosis de la vena porta. Éstas presentan alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo (OS) clave en la patogenia de la EH. La HP prehepática en ratas es un modelo de EH subclínica o de bajo grado con severas alteraciones en el sistema nervioso central, con foco en el hipocampo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial antioxidante de la Curcumina (CUR) (pigmento de Zingiberáceas) en ratas hipertensas portales prehepáticas (PPH) por estrechez reglada de la vena porta. Material y Métodos: Se usaron ratas Wistar machos (250 g de pc) divididos en 4 Grupos (n=8): 1) Operación simulada o Sham, 2) HP, 3) HP + vehículo (DMSO) y 4) HP + CUR. Luego de la cirugía se administraron 3 dosis de

Cur (100 mg/kg) los días 7, 9 y 11. El día 14 se sacrificaron y se utilizaron hígado (L) y cerebro para determinaciones de: enzimas hepáticas, fosfatasa alcalina (FAL) y albúmina (ALB) en plasma y niveles de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPOX) y peroxidación lipídica (TBARS) en homogenatos de L y en cerebro: en corteza frontal (CF) e hipocampo (H). Resultados: (X±SEM). SOD (U/mg prot.): Grupo 2 vs 4 en L: 11.36±1.92 vs 22.3±2.4 (p< 0.0001); en CF: 16.9±0.8 vs 38±2 (p< 0.001) y en H: 15.7±0.5 vs 25.4±0.9 (p< 0.001). CAT (pmol/mg prot.): Grupo 2 vs 4 en H: 0.034±0.001 vs 0.042±0.004 (p< 0.05); GPOX (nmol/min/mg prot.): grupos 2 vs 4 en CF: 0.030±0.001 vs 0.16±0.02; (p< 0.001); y los valores de TBARS (nmol/mg prot.): en H: Grupo 2 vs 4: 0.430±0.002 vs 0.21±0.01 (p< 0.001), ALB (mg/dl), Grupo 2 vs 4: 3.65±0.07 vs 4.2±0.1 (p< 0.01) y FAL (UI/L): Grupo 2 vs 4: 1058±1 vs 390±24; (p< 0.01). Conclusiones: en estas condiciones experimentales la Curcumina previene el estrés oxidativo, especialmente en el hipocampo, en ratas hipertensas portales prehepáticas.

HEMATOLOGÍA II

- 366. (119) DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS CD34+ EN PRESENCIA DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS Y TROMBOPOYETINA.** D ATRI (1) PAOLA, NEGROTTO (1) SOLEDAD, POZNER (1) ROBERTO GABRIEL, PACIENZA (1) NATALIA, LANDONI (1) VERÓNICA INES, GÓMEZ (2) RICARDO MARTIN, TORRES (1) OSCAR, ISTURIZ (1) MARTÍN, SCHATNER (1) MIRTA

Academia Nacional de Medicina (1); Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata, La Plata (2).

El desarrollo de megacariocitos (MCs) es un proceso altamente regulado por el estroma medular. Se ha demostrado en un modelo murino, que la eliminación de macrófagos promueve la megacariocitopoyesis. En este trabajo evaluamos esta regulación en células humanas. Se cultivaron células CD34+ de cordón umbilical en medio IMDM (control) o en medios condicionados (Mc) de monocitos (Mo) obtenidos de sangre periférica. Luego de 12-14 días de estimulación con trombopoyetina se evaluó número total de células y la frecuencia de MCs, Mo y células indiferenciadas (CD61+, 14+ y 34+ respectivamente) por citometría para determinar el número total de cada subpoblación (tabla, media ± ESM x10³, n=9, * p< 0.05 vs. control, # p< 0.05 vs. McMo) El McMo aumentó la generación de MCs y Mo. El incremento de MCs se asoció a un aumento en el número total de células ya que el porcentaje de CD61+ no se vio afectado (76±4 vs. 62±7%). Contrariamente, la población monocítica aumentó tanto por un incremento total de células como por una mayor diferenciación (3±0.5 vs. 23±3%* de células CD14+). No se observaron diferencias en la población de células indiferenciadas. La estimulación de los Mo con LPS o TNF-α mostró efectos contrarios en la generación de MCs. Mientras que el LPS inhibió el número de MCs totales, el tratamiento con TNF-α lo incrementó. Tanto el LPS como el TNF-α aumentaron la generación de Mo. Los efectos mediados por los Mo no estimulados se evidencian al día 14 de cultivo, mientras que aquellos mediados por los Mo estimulados ya se observan al día 7. Resultados similares fueron observados cuando se utilizaron Mc obtenidos de Mo diferenciados a macrófagos luego de 7 días de cultivo. Estos resultados señalan que in vitro, los Mo y macrófagos humanos promueven tanto la generación de MCs como la de Mo. La estimulación de los Mo por mediadores inflamatorios gatilla una mayor proliferación de Mo y regula diferencialmente la generación de MCs.

	Células totales	MCs totales	Mo totales
Control	63±6	49±6	2±0.4
McMo	119±8*	74±9*	35±5*
McMo (LPS 1 ug/ml)	172±17*,#	27±5*,#	67±11*,#
McMo (TNF 1 ng/ml)	143±18*	110±11*,#	62±12*,#

- 367. (244) EL VIRUS JUNIN DISMINUYE LA GENERACIÓN DE PLAQUETAS IN VITRO.** POZNER ROBERTO GABRIEL, PACIENZA NATALIA, NEGROTTO SOLEDAD, D'ATRI LINA PAOLA, TORRES OSCAR, ROMANOWSKI VICTOR, SCHATNER MIRTA, GÓMEZ RICARDO MARTÍN

Academia Nacional de Medicina; Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata.

El virus Junín (VJ) es el agente causal de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), entidad en la cual los pacientes presentan diversas alteraciones hematológicas incluyendo un recuento plaquetario disminuido. El origen de la trombocitopenia, que constituye un signo de gran valor diagnóstico, aún no se conoce. Con el fin de aclarar el mecanismo patogénico involucrado, estudiamos la susceptibilidad de los megacariocitos (MCs) humanos y sus precursores a la infección por VJ y la generación de plaquetas in vitro a partir de células CD34+ infectadas con el mismo virus. A los 7 días post-infección (PI), utilizando la técnica de RT-PCR, se detectó la presencia de ARN viral en muestras de MCs infectados con VJ activo, mientras que las muestras infectadas con un stock viral inactivado por luz UV resultaron negativas (como control de expresión constitutiva se utilizó la GAPDH la cual fue revelada en ambos tratamientos). Si bien la proliferación y la viabilidad celular en las muestras infectadas fueron similares, la producción de plaquetas a partir de células CD34+ estimuladas con trombopoyetina disminuyó significativamente solamente en aquellos cultivos infectados con VJ activo (Tabla, n=4, *p< 0,05 los valores representan el número de plaquetas expresado en unidades arbitrarias, evaluado por citometría de flujo). Estos resultados sugieren que los MCs son permisivos al VJ y que la infección in vitro de sus precursores genera una menor producción de plaquetas sin producir efectos citopáticos. Ambos fenómenos podrían explicar la trombocitopenia observada en pacientes con FHA.

Días PI	VJ irradiado	VJ activo
9	167 ± 28	187 ± 31
13	961 ± 86	612 ± 47*
17	2471 ± 166	1119 ± 74*
21	2640 ± 236	1124 ± 112*
25	594 ± 50	208 ± 38*

- 368. (286) AGONISTAS PPARγ INHIBEN LA PROLIFERACIÓN DE PRECURSORES MEGACARIOCITICOS IN VITRO.** PACIENZA NATALIA ALEJANDRA (1), NEGROTTO SOLEDAD (1), POZNER ROBERTO GABRIEL (1), MALAVER ELISA (1), D ATRI LINA PAOLA (1), LAZZARI MARIA ANGELA (1), TORRES OSCAR (1), GOMEZ RICARDO MARTIN (2), SCHATNER MIRTA (1)

Academia Nacional de Medicina (1); Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata (2)

La isoforma gamma de los receptores activados por proliferadores del peroxisoma (PPARγ) regula procesos como proliferación y diferenciación, apoptosis y sensibilidad a la insulina. Aunque recientemente se describió la presencia de PPARγ en megacariocitos (MCs), aún no se conoce su función. En este trabajo estudiamos el efecto del agonista natural 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandina J₂ (15dPG-J₂) y de un análogo sintético del PPARγ, ciglitazona (CGZ), en la sobrevida, proliferación y diferenciación de células madres (CD34+) comisionadas a MCs por acción de la trombopoyetina (TPO). Las células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano fueron aisladas por inmunoselección magnética positiva y cultivadas con TPO en ausencia (control) o presencia de 15dPG-J₂ o de CGZ. El número absoluto de MCs se evaluó el día 14 de cultivo determinando el número total de células y el porcentaje de CD41+ por citometría de flujo. A las 48 hs post tratamiento, se observó por microscopía de fluorescencia que el 15dPG-J₂ indujo una significativa apoptosis de células CD34+ (EC50: 27 μM, n=3). Resultados similares fueron obser-

vados en ausencia de TPO. La CGZ (40-80 μ M) no mostró diferencias significativas respecto al control (n=5). Sin embargo, luego de 14 días, los cultivos tratados con CGZ (40 μ M) presentaron una disminución en la generación de MCs asociada a una disminución de la proliferación celular (55 \pm 9 vs 16 \pm 6 x10³ células totales, control y CGZ respectivamente, p< 0.005, n=6) y a un incremento significativo en el % de apoptosis (15 \pm 4 vs 29 \pm 11%, n=6, p< 0.05) sin alteración en la diferenciación (69 \pm 6 vs 55 \pm 8, n=5). Ninguno de los dos compuestos afectó la sobrevivencia de MCs maduros. En conclusión, los agonistas de PPAR α inhiben la proliferación de los precursores megacariocíticos lo cual, luego de su confirmación in vivo, sería un aspecto a considerar en el uso terapéutico de la CGZ como hipoglucemiante y del emergente uso de la 15dPG-J2 como droga antineoplásica.

369. (290) DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE NIÑOS MENORES DE UN AÑO (INFANTES). ALONSO CRISTINA, GALLEGO MARTA, RUBIO LONGO PATRICIA, ROSSI JORGE, FELICE MARIA SARA

Hospital de Pediatría "Prof. Dr. J. P. Garrahan"

Introducción: Los rearrreglos moleculares del gen MLL (banda 11q23) constituyen la anomalía molecular más frecuente en LLA de infantes, especialmente las translocaciones con distintos cromosomas que resultan en un producto de fusión quimera entre MLL y otros genes. El estudio de las alteraciones de MLL es considerado indispensable para la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo. Objetivo: Optimizar la detección de los rearrreglos de MLL con el fin de individualizar pacientes de peor pronóstico, para una mejor adecuación de su tratamiento. Pacientes y métodos: Se incluyeron muestras obtenidas al momento del diagnóstico de 34 infantes tratados homogéneamente entre Dic-99 y Feb-06. Se realizó RT-PCR para: MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-AF9, E2A-PBX1, BCR-ABL y TEL-AML1, utilizando primers del protocolo Biomed-1 y otros diseñados de acuerdo con las respectivas secuencias y sitios de ruptura (MLL-ENL y MLL-AF9). Todas las muestras fueron procesadas con técnicas citogenéticas convencionales (CC). Resultados: De las 32 muestras evaluables por CC se detectaron alteraciones del 11q23 en 22 casos (69%), incluyendo 2 negativos por RT-PCR. Los resultados por RT-PCR fueron positivos para: MLL-AF4: 18 (53%), MLL-ENL: 5 (15%), MLL-AF9: 3 (9%), E2A-PBX1: 1 (3%) y negativos para los 6 rearrreglos: 7 (20%). En total 26 de 34 pacientes (77%) presentaron anomalías de MLL, incluyendo 6 casos no detectados por CC (1 cariotipo normal, 3 con otras alteraciones y 2 sin metafases). La aplicación de ambas técnicas permitió la detección de estas alteraciones en 82% de los casos. Conclusiones: Nuestros resultados coinciden con los reportados en la literatura. Los estudios moleculares aumentaron la sensibilidad para la detección de alteraciones de MLL, si bien se demuestra su complementariedad con el CC. Cabe destacar la importancia de la implementación de estas metodologías diagnósticas en el ámbito de hospitales públicos de referencia que reciben y tratan este tipo peculiar de leucemias.

370. (294) RESPUESTAS EFECTORAS PLAQUETARIAS MODULADAS POR GALECTINA-1. PACIENZA NATALIA ALEJANDRA (1), BIANCO GERMAN A. (2), POZNER ROBERTO GABRIEL (1), GOMEZ RICARDO MARTIN (3), RABINOVICH GABRIEL A (2), SCHATTNER MIRTA (1)

Academia Nacional de Medicina (1); Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina (2); Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata (3)

La galectina-1 (Gal-1), proteína capaz de unirse a terminales N-acetil-lactosamina en N- y O-glicanos de la superficie celular, se expresa en diferentes tipos celulares y participa en la homeostasis de la respuesta inmune e inflamatoria y en la progresión tumoral regulando la sobrevivencia, el crecimiento y la quimiotaxis celular. Considerando el importante papel que poseen las plaquetas en estos procesos, en este trabajo examinamos el

efecto de la Gal-1 en la activación plaquetaria. Los resultados obtenidos, evaluados por citometría de flujo tanto en plaquetas lavadas como en plasma rico en plaquetas, demuestran que la Gal-1 gatilla la expresión de P-selectina, fostadil serina, GPIIa y la generación de micropartículas y agregados plaquetarios de manera concentración dependiente (EC50: 40 μ g/ml n=7). En sangre entera, la Gal-1 indujo la formación de agregados mixtos plaquetas-monocitos (EC50: 57 μ g/ml n=3) y plaquetas-polimorfonucleares (EC50: 71 μ g/ml, n=3). Todos los parámetros mencionados fueron inhibidos por la preincubación de las plaquetas con lactosa (30 mM) pero no con aspirina (1mM), indicando la unión de la Gal-1 a ligandos sacarídicos y la independencia del TXA2 en el efecto de la Gal-1, respectivamente. Si bien la Gal-1 no fue capaz de inducir agregación plaquetaria (evaluación por turbidimetría) per se, potenció significativamente (p< 0.05) la agregación inducida por ADP (n=3). Estos datos describen por primera vez la capacidad de la Gal-1 de modular respuestas efectoras plaquetarias que podrían ser participes en diversos mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo de tumores y procesos inflamatorios.

371. (355) FLUIDEZ DE MEMBRANA Y MICROVISCOSIDAD INTERNA DE ERITROCITOS HUMANOS EN PRESENCIA DE ARSENIATO (AS V): ESTUDIO MEDIANTE RESONANCIA DE SPIN ELECTRÓNICO (ESR). HUARTE MONICA, PIEHL LIDIA, BAZZONI GRACIELA, HERNÁNDEZ GLADIS, BOLLINI ADRIANA, RASIA MARTA, RUBÍN DE CELIS EMILIO

Cátedra de Física. Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA; Cátedra de Biofísica. Facultad de Ciencias Médicas. UNR.

En estudios previos hemos demostrado que el arseniato interacciona con la membrana del glóbulo rojo (GR) alterando sus propiedades físicas, disminuyendo la fluidez de la membrana y la deformabilidad eritrocitaria. En el presente trabajo se estudió el efecto del arseniato sobre la fluidez de la membrana, la microviscosidad interna y la lipoperoxidación (LPO) en GR. GR de individuos sanos, previamente lavados con PBS, fueron incubados 30 minutos a 37 °C en ausencia y presencia de soluciones de arseniato de sodio 200 μ g/l. Se determinó: (I) fluidez de membrana a distintas profundidades de la misma midiendo el parámetro de orden (S) por marcación con ácido 5-doxil esteárico (5-DE) y el, (II) tiempo de correlación (ζ) del ácido 16-doxil esteárico (16-DE) por ESR grado de LPO midiendo la concentración de TBARS, (III) microviscosidad interna midiendo el ζ del marcador 4-maleimida TEMPO (4-MAL) por ESR. El tratamiento de GR con arseniato de sodio produjo: 1) un aumento significativo, respecto a los controles, en el parámetro de orden S del 5-DE (0,680 \pm 0,004 a 0,707 \pm 0,005, p< 0,05) y en el ζ del 16-DE (5,20 \pm 0,03 ns a 5,33 \pm 0,05 ns, p< 0,05), indicando una disminución en la fluidez de la membrana del GR como consecuencia del tratamiento; 2) un incremento significativo en la producción de TBARS (3,2 \pm 0,4 nM a 4,1 \pm 0,5 nM, p< 0,05) y 3) un aumento significativo respecto a los controles en el ζ del marcador 4-maleimida TEMPO (1,67 \pm 0,03 ns a 1,77 \pm 0,02 ns, p< 0,01) indicando un incremento en la microviscosidad interna del GR. Dado que se ha demostrado la unión del As(V) a los grupos sulfhidrilo de las proteínas de la membrana del GR, los cambios observados en la fluidez de la membrana podrían atribuirse a este hecho. El aumento en la microviscosidad interna a nivel intracitoplasmático podría explicarse por la formación de complejos de proteínas y glutatión con As(III), producto de la reducción del As(V) por el glutatión.

372. (553) CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES DEL GEN FLT3 EN LEUCEMIAS AGUDAS PEDIÁTRICAS. RUBIO LONGO PATRICIA, LUPPO SILVINA, FELICE MARIA SARA, MEDINA ADRIANA, ROSSI JORGE, ALONSO CRISTINA

Hospital Nacional de Pediatría Garrahan

El FLT3 es un receptor tirosina quinasa que se expresa tanto en células progenitoras hematopoyéticas y en distintos tejidos

normales como en Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) y Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). En Leucemias Agudas (LA) se han reportado mutaciones de FLT3 que resultan en la activación constitutiva del receptor, con un aumento aberrante en las señales de proliferación, lo cual estaría ligado al mecanismo de leucemogénesis. El receptor FLT3 es blanco terapéutico específico de nuevas drogas inhibitorias de tirosina quinasa, actualmente en estudio. Las mutaciones más frecuentes son duplicaciones internas en tándem del dominio juxtamembrana (ITD) y mutaciones puntuales en el dominio tirosina quinasa (TKD). En pediatría se asocian con LMA y con LLA en menores de un año (infantes). Nuestro objetivo fue analizar las mutaciones de FLT3 y evaluar su asociación con los subtipos de LA. Se estudiaron 102 muestras de LMA pediátricas (71) y LLA en infantes (31) ingresados al Hospital Garrahan, en forma retrospectiva. Las mutaciones fueron analizadas por RT-PCR utilizando primers específicos. Las ITD fueron detectadas por observación en gel de agarosa al 3% y las TKD por tratamiento del producto de PCR con enzima de restricción EcoRV y visualización en gel de poliacrilamida al 9%. Las muestras positivas fueron confirmadas por secuenciación. Resultados: ITD(+): en LMA 6/71 (8.5%), subtipos FAB: 5 M3 y 1 M5 y en LLA: 0/31. TKD(+): en LMA: 5/71 (7.0%), FAB: 4 M5 y 1 M2 y en LLA: 3/31 (9.7%), todos MLL(+). Las mutaciones encontradas fueron: 4 D835H, 2 D835Y, 1 D835A y 1 D835E. Las frecuencias de las mutaciones y su asociación a los subtipos de leucemias encontrados coinciden con lo publicado en la literatura. La detección de estas mutaciones permite individualizar pacientes con peor pronóstico candidatos a recibir tratamiento con inhibidores de FLT3 que aportan un mecanismo terapéutico diferente al de la quimioterapia convencional.

373. (606) EFECTO ANTIAPOPTOTICO DEL RECEPTOR SOLUBLE DE IL-6 EN CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS NORMALES Y DE PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL. CHAZARRETA DANIEL, ROSANA MARTA, FELISA MOLINAS

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

La interleuquina 6, citoquina estimulante de la megacariocitopoyesis, ejerce su acción a través de su unión al receptor específico en células blanco, IL-6Ra, o formando complejo con la fracción soluble del mismo (IL-6sR) mediado por la gp130. En la trombocitemia esencial (TE), caracterizada por hiperproliferación megacariocítica, se encontró aumento del IL-6sR plasmático. En el presente trabajo se evaluó la acción del IL-6sR sobre la activación de caspasa III en células progenitoras hematopoyéticas CD34+ normales y de pacientes con TE. Además, se evaluó la expresión de IL-6Ra en las CD34+ de ambos grupos. Las células CD34+ de sangre de cordón umbilical de partos normales y de sangre periférica de pacientes con TE sin tratamiento se aislaron por método inmunomagnético. Se evaluó el IL-6Ra por citometría de flujo con anti CD126-PE. Las células se expandieron en medio IMDM con 10% de suero y 25 ng/ml de SCF por 48 hs. Luego de lavarlas se cultivaron 12 hs a 37° y 5% CO₂ en IMDM solo (inducción de apoptosis por privación de nutrientes), con IL-6 100 ng/ml o IL-6 100ng/ml + IL-6sR 200ng/ml. Al finalizar los cultivos se evaluó el porcentaje de células con caspasa III activada en la población CD34+/CD45+ por citometría de flujo. La expresión de IL-6Ra fue mayor en CD34+ de pacientes 4.0% (0.73-24) n=8, que en normales 0.12% (0-2.5) n=5, p=0.023 Wilcoxon rank sum test. La activación de caspasa III fue mayor en CD34+ normales cultivadas con IL-6, 100% (76.1-142.4), que en las cultivadas con IL-6/IL-6sR, 82.2% (65.0-103.7) n=7 p=0.038. En el caso de las CD34+ de los pacientes, la activación de caspasa III también fue mayor con IL-6 94.8% (94.37-117.21) que con IL-6/IL-6sR 82.86% (31.3-91.8) n=3 aunque la diferencia no alcanzó significación estadística, p=0.081. En conclusión, tanto en CD34+ normales como de pacientes con TE, el complejo IL-6/IL-6sR ejerce un efecto antiapoptótico. El aumento en el IL-6sR plasmático en estos pacientes podría manifestar este efecto in vivo

INMUNOLOGÍA VI

374. (109) ASOCIACIÓN FÍSICA Y ANTAGONISMO MUTUO ENTRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN (FT) T-BET Y EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR). LIBERMAN ANA CLARA (1), DRUKER JIMENA (1), REFOJO DAMIAN (1), REIN THEO (2), HOLLSBOER FLORIAN (2), ARZT EDUARDO (1)

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Dept. de FBMC, FCEN, UBA, IFYBINE-CONICET(1) Instituto Max Planck, Munich, Alemania (2)

T-bet es clave para la adquisición del fenotipo Th1 y regula la expresión de la citoquina proinflamatoria INF-gamma. Previamente demostramos que los glucocorticoides (GCs) inhiben las respuestas Th1 inhibiendo la expresión y actividad transcripcional de T-bet. El objetivo de este trabajo es estudiar en profundidad el mecanismo molecular implicado en la interacción T-bet/GR. La expresión del mRNA y proteína de T-bet fue estudiada por Real-time PCR y Western Blot; la actividad transcripcional por ensayos de luciferina; el binding al DNA por EMSA y ChIP y la interacción proteína-proteína por coimmunoprecipitación. Previamente hemos demostrado por Northern Blot que GC inhiben el mRNA de T-bet. Este resultado fue corroborado y cuantificado por Real-time PCR mostrando un 70% de inhibición (p< 0.01). Además los GC inhiben la expresión proteica de T-bet. Dado que GC inhiben la actividad transcripcional de T-bet (65%, p< 0.01), quisimos saber si el proceso inverso también ocurría. Vimos que T-bet inhibe de manera concentración dependiente la actividad transcripcional de GR (25-75%, p< 0.01). Ensayos de transfección utilizando mutantes de GR que transactivan pero no transreprimen (S425G) y viceversa (A458T) sugirieron que transrepresión sería el mecanismo involucrado en la inhibición. Ensayos de coimmunoprecipitación confirmaron que existe una asociación física entre GR y T-bet. Ensayos de EMSA y ChIP muestran que esta interacción impide el binding de T-bet al DNA. Además, analizamos las consecuencias funcionales de la interacción GR/T-bet en la regulación del promotor de INF-gamma y vimos que GC inhiben la actividad transcripcional de T-bet sobre el promotor INF-gamma de manera dosis dependiente (15-60%, p< 0.01) al igual que la síntesis de INF-gamma. Concluimos que GCs inhiben las respuestas Th1 a través de la inhibición de T-bet a nivel de mRNA, proteína, actividad transcripcional y binding al DNA consecuencia de la interacción física entre GR y T-bet.

375. (148) REMOCIÓN DE GLÓBULOS ROJOS SENESCENTES: PARTICIPACIÓN DE IGG AUTOLÓGA Y DESIALINIZACIÓN DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA. ENSINCK ALEJANDRA, COTORRUELO CARLOS, GARCIA BORRAS SILVIA, RACCA LILIANA, RUCCI ANGEL, BIONDI CLAUDIA, RACCA AMELIA

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR

Durante el proceso de envejecimiento los Glóbulos Rojos Senescentes (GRSe) exponen marcadores de reconocimiento que conducen a su remoción por las células del Sistema Mononuclear Fagocítico. El objetivo de este trabajo fue medir y caracterizar las proteínas de la membrana eritrocitaria, cuantificar la IgG unida y analizar la fagocitosis de GRSe, GR Jóvenes (J) y GR desialinizados. Muestras de sangre periférica (n=31) fueron sometidas a centrifugación diferencial para obtener GRSe en el botón celular y GRJ en la capa superior. Las proteínas de membrana fueron cuantificadas por Lowry, caracterizadas por electroforesis en SDS-PAGE y analizadas por densitometría. Se determinó la IgG de membrana por un ensayo de antiglobulina unida a enzima. La interacción entre monocitos y GRSe, GRJ y GR desialinizados con tripsina (GRT) y neuraminidasa (GRNe) se evaluó con el ensayo de eritrofagocitosis y se determinó el % de Monocitos Activos (MA). Se procesaron controles positivos con GR Sensibilizados

(GRS) y negativos con GR normales (GRN). En GRSe y GRJ no se observaron diferencias significativas en el contenido de proteínas totales y en el análisis densitométrico. Las concentraciones de IgG unida a membrana en GRSe ($13.30 \pm 1.57 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$) fueron mayores que las observadas en GRJ ($3.35 \pm 1.40 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ($p < 0.0001$). En la eritrofagocitosis los % de MA obtenidos fueron: a) GRSe: 17.94 ± 2.24 , b) GRJ: 3.33 ± 0.77 ; c) NeRBC: 10.72 ± 1.41 ; d) TRBC: 3.72 ± 1.18 ; e) SRBC: 32.11 ± 3.76 ; f) NRBC: 2.71 ± 0.48 . Los % de MA obtenidos con a) fueron inferiores a e) pero significativamente mayores a los observados con las otras suspensiones ($p < 0.001$). Los % de MA obtenidos con c) fueron superiores a los observados con b), d) y f) ($p < 0.001$). Estos hallazgos indican que en la remoción selectiva de los GRSe participarían al menos dos mecanismos: fagocitosis directa por acumulación de IgG autóloga en la membrana y una vía alternativa que involucra la pérdida del ácido siálico.

376. (384) EL GM-CSF POTENCIA LA RESPUESTA DE NEUTRÓFILOS AL ADN BACTERIANO INDUCIDA POR UNA VÍA CPG-INDEPENDIENTE Y MYD88-DEPENDIENTE. FUXMAN BASS JUAN IGNACIO, ALVAREZ MARÍA EUGENIA, VERMEULEN MÓNICA, GEFFNER JORGE R, NAHMOD KAREN, SALAMONE GABRIELA, TREVANI ANALÍA S

IIHEMA - Academia Nacional de Medicina

Previamente demostramos que el ADN bacteriano (ADNb) induce la activación de neutrófilos a través de un mecanismo CpG-independiente, MyD88-dependiente y TLR9-independiente. También reportamos que el GM-CSF potencia respuestas de neutrófilos inducidas por ADNb y por oligonucleótidos conteniendo o carentes de motivos CpG. El objetivo de este estudio consistió en caracterizar la modulación mediada por el GM-CSF en la producción de IL-8 inducida por ADNb, a fin de determinar si el efecto es ejercido sobre el mecanismo independiente de CpG descrito previamente. El pre-tratamiento de neutrófilos con GM-CSF (5, 50 y 100 ng/ml) durante 30, 90 o 180 min incrementó marcadamente la IL-8 producida en respuesta a estimulación por ADN genómico de *E coli* simple cadena (ADNecsc 10, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) luego de 3 y 18 hs de cultivo ($p < 0,05$; $n=5$). Un efecto potenciador similar fue ejercido en respuesta a estimulación con ADN plasmídico doble cadena ($p < 0,05$, $n=4$). El GM-CSF (50 ng/ml, 30 min) incrementó en niveles similares la producción de IL-8 por neutrófilos, en respuesta a estimulación con ADNecsc metilado en CpG y con ADNecsc no metilado (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El GM-CSF también potenció la producción de IL-8 estimulada por ADNecsc doble cadena (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ($p < 0,05$; $n=6$). En conjunto, estos resultados sugieren que el GM-CSF potencia la producción de IL-8 inducida por ADN bacteriano a través del mecanismo independiente de CpG. El GM-CSF (2 ng/ml) también incrementó la expresión de CD11b inducida por ADNecsc (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en neutrófilos humanos ($p < 0,05$; $n=4$). En neutrófilos de ratón deficientes en MyD88, molécula involucrada en la activación celular mediada por receptores TIR (Toll/IL-1R), el pre-tratamiento con GM-CSF no incrementó la expresión de CD11b cuando las células fueron estimuladas con ADNecsc, a diferencia de lo observado con neutrófilos no deficientes. En conclusión, el GM-CSF potencia respuestas funcionales de neutrófilos inducidas por ADNb por una vía CpG-independiente y MyD88-dependiente.

377. (101) CÉLULAS DENDRÍTICAS QUE SOBRE-EXPRESAN GALECTINA-1 TRANSGÉNICA RETARDAN LA APARICIÓN DE DIABETES TIPO 1 EN RATONES. PERONE MARCELO JAVIER, BERTERA SUZANNE, TAWADROUS ZAKARIA S., SHUFESKY WILLIAM J., PIGANELLI JON D., BAUM LINDA G., TRUCCO MASSIMO, MORELLI ADRIAN E.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. FCEyN. UBA. Ciudad Universitaria. Buenos Aires; Division of Immunogenetics, Department of Pediatrics, University of Pittsburgh School of Medicine, Rangos Research Center, Children's Hospital of Pittsburgh, Pittsburgh, PA Thomas E. Starzl Transplantation Institute and Department of

Surgery, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA Department of Pathology and Jonsson Comprehensive Cancer Center, UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA

La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune que destruye las células β productoras de insulina. Células dendríticas (DC) inician la respuesta celular T causante de T1D. DC participan en inducción y mantenimiento de la tolerancia de células T. Galectina-1 (gal-1) posee efectos regulatorios sobre células T activas. Investigamos si DC que sobre-expresan gal-1 transgénica (gal-1-DC) previenen/retardan T1D en ratones. Se utilizaron ratones NOD/LtJ y NODrag1 $^{-/-}$. DC provenientes de médula ósea fueron infectadas con un adenovirus recombinante que expresa eGFP/gal-1, y eGFP (control). T1D se indujo mediante transferencia (i.p.) de esplenocitos diabetogénicos (NOD) a ratones NODrag1 $^{-/-}$. T1D se diagnosticó por dos lecturas consecutivas de glucemia $> 300 \text{ mg}/\text{dl}$. Gal-1-DC y controles (eGFP-DC, DC y PBS) se inyectaron (i.v.) 2xsemana durante 3/semanas. Insulinitis se determinó por microscopía en islotes teñidos con H/E. Por inmunofluorescencia y FACS se cuantificó apoptosis. Gal-1-DC se localizan en ganglios linfáticos pancreáticos (PLN) y bazo, y retardan la aparición de T1D ($p < 0.0014$ vs control) e insulinitis. Animales controles muestran infiltración TCD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$. Islotes de ratones tratados con gal-1-DC muestran histología normal, sin infiltrado y contenido de insulina normal (23 días post-transferencia esplenocitos). Gal-1-DC inducen incremento de células T apoptóticas (160 ± 31 vs 35 ± 7 control) y un número reducido de células TCD4 $^{+}$ productoras de IFN- γ (30 ± 9 vs 160 ± 50 control) en PLN. Gal-1-DC inhibe la proliferación ($p < 0.01$ vs controles) y secreción de IFN- α ($p < 0.05$ vs controles) de células T. Gal-1-DC induce apoptosis de células T diabetogénicas activadas por mecanismos dependientes e independientes del TCR. Conclusión: gal-1-DC retardan la aparición de T1D mediante apoptosis de células T diabetogénicas. El empleo de gal-1-DC durante estadios preclínicos de la enfermedad erradicaría células T diabetogénicas activas previniendo/atenuando la autoinmunidad a células β .

378. (427) LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA UNEN ESPECÍFICAMENTE LA PROTEÍNA BANDA 3 DE MEMBRANA ERITROCITARIA. GALLETTI JEREMÍAS (1), MORANDE PABLO (1), CAÑONES CRISTIAN (1), BORGE MERCEDES (1), BEZARES FERNANDO (2), GAMBERALE ROMINA (1), GIORDANO MIRTA (1)

Academia Nacional de Medicina (1) Hospital Álvarez - Servicio de Hematología (2)

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia de células B maduras y representa la forma más prevalente de leucemia en el hemisferio occidental. La LLC se complica frecuentemente con anemia hemolítica autoinmune (AHA), siendo el transportador aniónico de membrana eritrocitaria, banda 3 (B3), el blanco antigénico más común. Teniendo en cuenta que las células LLC podrían actuar como células presentadoras de antígeno, nuestro objetivo fue determinar si pueden reconocer B3 como paso previo a su procesamiento y presentación. Para ello, purificamos B3 a partir de eritrocitos que fueron lisados, despojados de las proteínas accesorias por cambios en la fuerza iónica y solubilizados en deoxicolato. Una vez conjugada con biotina o FITC, se analizó por citometría de flujo la unión de B3 a células mononucleares obtenidas de sangre periférica de pacientes LLC ($n=19$). Se encontró que sólo las células LLC y los monocitos fueron capaces de unir B3. Los linfocitos B periféricos de donadores normales, los linfocitos T y las células NK no unieron B3. En las células leucémicas hubo unión a bajas concentraciones de ligando (1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y fue saturable a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La unión a 5 y 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pudo ser desplazada en un 63% y 54%, respectivamente, por 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de B3 no marcada. Esta propiedad de las células LLC depende de un sitio proteico ya que el tratamiento con tripsina o proteinasa K inhibe completamente la unión de B3 a la membrana. El reconocimiento no está mediado por el receptor scavenger

tipo B CD36, a diferencia de lo que ocurre para B3 oxidada en eritrocitos infectados por *Plasmodium*. Nuestros resultados sugieren la existencia en las células LLC de un receptor específico para la proteína B3 resultante del recambio eritrocitario normal.

379. (602) PAPEL CRÍTICO DE GALECTINA-1 (GAL-1) EN LA REGULACIÓN NEGATIVA DE LA RESPUESTA T HELPER (TH) 1: MECANISMOS INVOLUCRADOS. TOSCANO MARTA A, CAMPAGNA LEONARDO, BIANCO GERMÁN A, ILARREGUI JUAN M, ZWIRNER NORBERTO W, RABINOVICH GABRIEL A

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, UBA

Previamente demostramos que linfocitos Th2 (LTh2) presentan un patrón de glicosilación que los hace resistentes a la apoptosis inducida por Gal-1. Por otro lado linfocitos Th1 (LTh1), que carecen de dicho tipo de glicosilación, son susceptibles a la misma. Estos antecedentes establecen un mecanismo por el cual Gal-1 modula la respuesta hacia un perfil Th2. Objetivos: A) Estudiar las variables que afectan la susceptibilidad de LTh1 y LTh2 a la apoptosis inducida por Gal-1 y B) Analizar la relevancia de Gal-1 y sus receptores en la diferenciación Th1/Th2. Para evaluar si LTh2 presentan una susceptibilidad tardía a la apoptosis inducida por Gal-1, células CD4+ polarizadas se incubaron con Gal-1 por 12, 24 y 48 h., observándose que los LTh2 son resistentes en todos los tiempos analizados ($p < 0,05$). A su vez, se estudió si la susceptibilidad a Gal-1 está asociada a las diferencias en la producción de IL-2 o a variaciones en el ciclo celular en estas células. Se observó que la susceptibilidad a Gal-1 no se afecta frente a la unificación de los niveles de IL-2 (5ng/ml). Utilizando inhibidores del ciclo celular se observó que la susceptibilidad de LTh1 es independiente del estadio del ciclo celular. Por otra parte, se determinó que Gal-3 induce apoptosis a LTh1 y a LTh2, demostrando que el efecto pro-apoptótico selectivo de LTh1 no es una propiedad general de las galectinas. Finalmente, se estudió la relevancia de Gal-1 y sus receptores en la diferenciación Th1/Th2. A tal fin se polarizaron células CD4+ de ratones gal-1-/- y wt en presencia de lactosa o inhibidores de la N-glicosilación (Swansonina y DMNJ). Se observó que la ausencia de Gal-1 (gal-1-/-), la inhibición de la unión de Gal-1 a sus receptores y el bloqueo de la síntesis de N-glicanos, inducen una hiper-producción de citoquinas Th1 (IFN- γ e IL-2; $p < 0,05$). Este trabajo provee nuevas evidencias que posicionan a Gal-1 y sus receptores como reguladores negativos de la respuesta Th1.

380. (600) DISTINTAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN NFKB ACTIVADAS POR LIGANDOS DE TLRs O LINFOTOXINA BETA CONTROLAN LA EXPRESIÓN DE CCL20 EN EPITELIO INTESTINAL ACTUANDO SOBRE EL MISMO SITIO DE UNIÓN AL PROMOTOR. RUMBO MARTIN, DIDIERLAURENT ARNAUD, SIRARD JEAN CLAUDE

LISIN Facultad de Ciencias Exactas, UNLP Kennedy Institute of Rheumatology, Imperial College, London, UK Institut Pasteur Lille, France

CCL20 es una quimoquina capaz de reclutar células dendríticas inmaduras, articulando la respuesta innata y la adquirida. La expresión de CCL20 en el epitelio intestinal presenta un comportamiento dual, siendo inducida en el epitelio absorptivo por estímulos proinflamatorios tales como IL-1b, TNF α o ligandos de TLRs. A su vez, es producido en forma constitutiva en el epitelio asociado a folículos (FAE) en las Placas de Peyer, presumiblemente por estimulación del receptor de linfotóxina β (LT β R). Nuestro objetivo fue mapear los sitios del promotor de CCL20 que controlan su producción por distintas vías de señalización. Se clonó el promotor de CCL20 humano y se identificaron potenciales sitios de unión a factores de transcripción. Se generó por mutagénesis dirigida una serie de reporteros de luciferasa. Empleando líneas epiteliales intestinales, T84 y Caco-2, se demostró que un sitio de unión a NF κ B próximo al inicio de transcrip-

ción (-92 a -82) es crítico para la inducción de CCL20 por LT β o flagelina. La cinética de traslocación de distintos miembros de la familia de NF κ B fue analizada por ELISA. Se observó la traslocación de RelA y p50 con una cinética rápida y de corta duración luego de estimulación con flagelina, mientras que la activación de LT β R con anticuerpos agonistas generó una activación de la vía alterna de NF κ B con traslocación sostenida y tardía (de 8 a 24 hs) de RelB y p52. En todos los casos, la actividad fue abolida por competición con un oligonucleótido con la secuencia del promotor de CCL20 humano. Se encontró una cinética similar de activación de NF κ B in vivo en la mucosa intestinal por tratamiento sistémico con flagelina o anti-LT β R que resultó desplazable por competición con el oligonucleótido con la secuencia del promotor de CCL20. La expresión dual inducible/constitutiva de CCL20 en el epitelio intestinal es controlada por distintas vías de NF κ B actuando sobre el mismo sitio de unión en el promotor de CCL20.

381. (392) INHIBICION DE LA PROLIFERACION LINFOCITARIA A TRAVES DE STEM CELLS MESENQUIMALES (MSCS) ALOGENEICAS. JAWORSKI MARÍA, BARBICH MARIANA, CARDOZO JOHANA, REDAL MARIA, ARGIBAY PABLO

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental

Introducción: Las MSCs de médula ósea (CEMO), son una fuente potencial de tejido a utilizar en medicina regenerativa, presentan un potencial de diferenciación elevado y tendrían propiedades inmunomoduladoras en términos de tolerancia y evasión del sistema inmune, sin embargo resta aún demostrar si estas propiedades son extensibles a MSCs de otro origen como ser de tejido adiposo (CETA). El objetivo del presente trabajo fue evaluar in vitro las propiedades inmunomoduladoras de las CETA comparándolas con las CEMO. Materiales y Métodos: 10.000 MSCs irradiadas se co-cultivaron con igual cantidad de PBMCs (controles +: PHA y células 3T3; controles -: PBMCs autólogos) por triplicado. La proliferación de PBMCs fue cuantificada durante seis días mediante la incorporación de 3H-timidina. Resultados: La proliferación linfocitaria al tercer día de cultivo fue de: $16,32 \pm 5,8$; $2088 \pm 274,5$; $5619 \pm 545,48$ ($p < 0,05$), para las CETA, PHA y 3T3 respectivamente. Para las CEMO la proliferación linfocitaria no tuvo diferencias con la inducida por CETA. Se evaluaron además otras variables como el tiempo de cocultivo, la estimulación previa de los linfocitos con PHA y la utilización de CETA y CEMO prediferenciadas a células de fenotipo neural (NeuN +). En todos los casos se observó que las células mesenquimales independientemente de su origen o grado de diferenciación fueron capaces de inhibir la proliferación linfocitaria alogeneica. Discusión: Las propiedades inmunomoduladoras aquí demostradas hacen considerar a las CETA como una fuente alternativa al uso de CEMO en trasplantes alogeneicos. La principal ventaja de estas células es la fácil obtención de un número elevado, proveniente tanto de donantes vivos como cadavéricos.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN III

382. (226) MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO EN UN MODELO DE GLAUCOMA EXPERIMENTAL. FERREIRA SANDRA MARÍA, GARASSINO LAURA, LERNER FABIÁN, EVELSON PABLO, LLESUY SUSANA

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires

El glaucoma es una neuropatía óptica multifactorial caracterizada por la pérdida progresiva de células ganglionares retinales y atrofia del nervio óptico. El objetivo del trabajo fue evaluar el daño oxidativo en un modelo de glaucoma experimental. El modelo se generó a partir de la cauterización de dos de las cuatro venas episclerales del ojo izquierdo, mientras que el ojo derecho fue utilizado como control. Para realizar el modelo experimen-

tal se utilizaron ratas Wistar de 250 g. Se determinaron los siguientes parámetros para evaluar el daño oxidativo: los antioxidantes totales (TRAP), lipoperoxidación (TBARS) y óxido nítrico (contenido de nitritos). El TRAP del humor acuoso y del humor vítreo se determinó por técnicas de luminiscencia. Los TBARS y el contenido de nitritos se determinaron por técnicas espectrofotométricas. A los sesenta días de realizado el modelo experimental se evaluaron los marcadores de daño oxidativo. Se observó una disminución significativa de la capacidad antioxidante en un 58% en el humor vítreo y en un 26% en el humor acuoso para el ojo con glaucoma (control 219 ± 24 mM $p < 0,001$). Los TBARS en la cabeza del nervio óptico para el ojo glaucomatoso fue $4,2 \pm 0,5$ nmoles/mg de proteína siendo el valor promedio del ojo control $1,9 \pm 0,1$ nmoles/mg de proteína $p < 0,001$. El contenido de nitritos fue de $18,0 \pm 0,9$ mM para el ojo con glaucoma mientras que para el ojo control $9,5 \pm 0,8$ mM $p < 0,01$. Estos resultados sugieren que en el glaucoma el estrés oxidativo participa en la patogénesis de esta enfermedad. El daño oxidativo jugaría un rol importante en la progresión del glaucoma. Hay una disminución significativa de las defensas antioxidantes en el humor vítreo y en el humor acuoso, un aumento del contenido de prooxidantes (óxido nítrico y la peroxidación lipídica) en la cabeza del nervio óptico. UBA B124 CONICET PIP 6120.

383. (402) LA DEFICIENCIA EN VITAMINA A AFECTA LA MORFOLOGÍA DE LA ARTERIA AORTA. GATICA LAURA VIRGINIA, DOMINGUEZ SUSANA (1), OLIVEROS LILIANA BEATRIZ, GIMENEZ MARÍA SOFÍA, FORNES MIGUEL (2)

Histología y Embriología- UNSL (1) Lab. Qca. Biológica- Universidad Nacional de San Luis IHEM, Fac. Cs. Méd.- Univ Nac Cuyo (2)

Es conocido que la inflamación y los radicales libres son capaces de inducir disfunción endotelial y de alterar la permeabilidad vascular. En trabajos previos comunicamos que la deficiencia de vitamina A incrementa la expresión de marcadores de inflamación y estrés oxidativo, los niveles de proteína de TGF-beta1 y modifica el metabolismo de los lípidos en la aorta. Aquí mostramos el efecto de la deficiencia de vitamina A sobre la histoarquitectura de la aorta. 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). Para el estudio morfológico al microscopio óptico (MO), la porción torácica de las aortas se fijó con líquido de Bouin. Secciones de 5-6 μ m de espesor se colorearon con H-E. Para el estudio ultraestructural al microscopio electrónico (ME), secciones delgadas de la aorta torácica fueron fijadas en glutaraldehído 2%. Para la obtención de los cortes histológicos se usó un ultramicrotomo Ultracut Leica, y para las micrografías un microscopio electrónico de transmisión Zeiss tipo 900. La examinación al MO mostró en la íntima de las aortas -A la presencia de una superficie apical irregular. Los estudios al ME mostraron la presencia de grandes vacuolas y de cuerpos multivesiculares (CMV) a lo largo del endotelio de las aortas -A. Los CMV también fueron observados en el espacio subendotelial, el cual se presentó ensanchado y caracterizado por un aparente aumento en el contenido de fibras de colágeno. En las aortas -A la organización histológica de la lámina elástica interna fue diferente de las aortas +A. A su vez, la deficiencia de vitamina A se asoció a la presencia de pequeñas vesículas en la capa media de la aorta. La deficiencia de vitamina A produce cambios en la morfología de la aorta. Tales alteraciones pueden asociarse al ambiente prooxidante y proinflamatorio inducidos por esta deficiencia nutricional.

384. (227) DAÑO OXIDATIVO EN HÍGADO, CEREBRO, CORAZÓN Y RIÑÓN EN RATAS DEFICIENTES EN COLINA. REPETTO MARISA GABRIELA (1), OSSANI GEORGINA PAULA (2), CARLE GERMÁN (1), MONSERRAT ALBERTO JUAN (2), BOVERIS ALBERTO (1)

Cátedra de Química General e Inorgánica. Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica. Facultad de Farma-

cia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. (1) Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (2)

La deficiencia de colina en ratas recién destetadas produce daño en hígado, riñón, corazón y cerebro. La patogenia de las lesiones está parcialmente estudiada, el daño oxidativo (DO) podría estar involucrado. Se estudió la peroxidación de lípidos en plasma y en los órganos anteriormente mencionados en ratas recién destetadas (21 días) alimentadas con dieta deficiente en colina. Los animales fueron divididos en dos grupos, con dieta colina-deficiente (CD), y con dieta colina-suplementada (CS). Las ratas se sacrificaron al tercer, quinto, sexto y séptimo día. El estudio estadístico se realizó comparando CD y CS en los distintos días de sacrificio. Se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxido de tert-butilo (QL) en plasma y homogeneizados de hígado, cerebro, corazón y riñón en ambos grupos. En los homogeneizados se observó un incremento de TBARS (35%) al tercer día y mayor al 100% al sexto día en hígado ($p < 0,05$); 62% en riñón a partir del tercer día ($p < 0,05$); mayor al 100% en corazón a partir de quinto día ($p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivamente), y del 70% ($p < 0,05$) y mayor al 100% en cerebro a partir del sexto y séptimo día de sacrificio ($p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente). En plasma aumentaron un 200% al tercer ($p < 0,02$), un 400% al quinto ($p < 0,04$) y 300% al sexto día ($p < 0,05$) en CD respecto a CS. La QL aumentó un 45% en hígado ($p < 0,05$), un 83% en riñón a partir del sexto día ($p < 0,01$), en corazón un 121% a partir del séptimo día ($p < 0,05$). La deficiencia en colina produce daño oxidativo en hígado, corazón, riñón y cerebro a través de la peroxidación de lípidos, que se observó como un evento previo a la necrosis renal y cardíaca. La peroxidación de lípidos plasmáticos es previa al daño oxidativo en algunos órganos afectados por la deficiencia en colina. El mayor incremento de oxidación lipídica se observó en plasma. Los TBARS son un marcador temprano del daño oxidativo tisular.

385. (421) PERFILES DE PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE HÍGADO NORMAL Y HEPATOCITOS DE RATÓN HEMBRA. YEVES ALEJANDRA M., RONCHI VIRGINIA P., CHISARI ANDREA, CONDE RUBÉN D.

Instituto de Investigaciones Biológicas-FCEyN-UNMDP

Una dieta sin aminoácidos disminuye el contenido proteico de hígado de ratón y modifica el nivel de algunas proteínas citosólicas participantes de importantes eventos metabólicos. El estudio in vivo de la regulación proteica por cambios nutricionales es complejo. Por ello, en ratón hembra, se comparó el perfil de proteínas citosólicas de hepatocitos incubados en medio completo con el de hígado bajo una dieta completa. Las proteínas citosólicas se separaron en 1D-SDS-PAGE y 2D-SDS-NEPHGE. Comparados con los perfiles in vivo, los hepatocitos mostraron: 1) baja proporción de componentes de pI 7-7.3 y tamaño inferior a 50 kDa; 2) que la proteína más abundante de $pI > 9$ posee un tamaño de 43 kDa en vez de 48 kDa; 3) la proporción de mGSTs es menor; 4) ausencia de proteínas menores de 20 kDa. Por otra parte, se analizó por Western blot la movilidad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína abundante y regulada por el nivel dietario de aminoácidos. La misma exhibió un tamaño de 66 kDa en los hepatocitos y 39 kDa in vivo. La banda de 66 kDa también se detectó in vivo, pero con una intensidad de 10% respecto del hepatocito. Por lo tanto, la GAPDH exhibiría un mayor grado de dimerización o interacciones con otras proteínas en los hepatocitos. No obstante las diferencias encontradas entre los sistemas in vivo e in vitro, los hepatocitos aislados pueden servir para examinar la regulación por cambios nutricionales de proteínas citosólicas. Financiado por CONICET, UNMDP, UNLP.

386. (423) INFLUENCIA DE LA DEFICIENCIA DE AMINOÁCIDOS SOBRE EL PROTEOMA DE HEPATOCITOS. ACCIÓN DE METIONINA. RONCHI VIRGINIA P., YEVES ALEJANDRA M., CHISARI ANDREA, CONDE RUBEN D.

Instituto de Investigaciones Biológicas-FCEyN-UNMDP

Una dieta sin aminoácidos reduce el contenido proteico y modifica el nivel de algunas proteínas citosólicas en el hígado de ratón hembra. El aporte dietario de metionina previene varios de estos cambios. Aunque su patrón proteico exhibe algunas diferencias con el hígado in vivo, los hepatocitos aislados son útiles para examinar la influencia del aporte de aminoácidos sobre el proteoma hepático. El objetivo del presente trabajo fue evaluar mediante electroforesis 1D-SDS-PAGE y 2D-SDS-NEPHGE los patrones de proteínas citosólicas de hepatocitos incubados en medios sin aminoácidos (AAF) y con metionina (AAF+Met). La viabilidad, contenido de proteínas y ARN de las células incubadas durante 2h disminuyeron en AAF (12, 52, y 54%). Mediante 1D-SDS-PAGE se observó que los niveles de proteínas de 133 y 126 kDa aumentan 88 y 176% en AAF, mientras el que otra de 101 kDa disminuye 30% con respecto al control. La presencia de metionina en AAF previene principalmente el cambio de la proteína de 126 kDa. Los citosoles de hepatocitos incubados en AAF exhibieron 217 polipeptidos en 2D-NEPHGE. Respecto del control normal, un 62% de ellos disminuyó y 12% aumentó en magnitud mayor a 1.5 veces. La incubación en AAF+Met aumentó el nivel de 18 polipeptidos y disminuyó el de 39 con respecto al control. Según su Mr y pI, dos de las proteínas modificadas por AAF corresponden a la glutatión S-transferasa GSTM2 y la Acil-coenzima A tioesterasa 1. En conjunto, la respuesta de los hepatocitos aislados a la privación de aminoácidos es similar a la observada in vivo. Los contenidos de varias proteínas vinculadas con el metabolismo energético y estrés oxidativo son controlados por el aporte de aminoácidos. Por lo tanto, el modelo de hepatocitos aislados podría utilizarse para estudiar la regulación de proteínas frente a diferentes situaciones de estrés nutricional. Financiado por CONICET, UNMDP, UNLP.

- 387. (451) INHIBICION DE LAS ACTIVIDADES DE PEROXIDASAS Y CATALASA POR INOSITOL FOSFOGLICANOS. MODULACION DEL NIVEL DE PEROXIDO DE HIDROGENO.** KRAWIEC LEON (1, 2), THOMASZ LISA (2), ARAN MARTÍN (3), IBÁÑEZ JORGE (2), PISAREV MARIO A. (1, 2), JUVENAL GUILLERMO J. (1,2), PIZARRO RAMON A. (2)

CONICET (1) - CNEA (2) - Instituto Leloir (3)

Los inositol fosfoglicanos A y P (IPG-A e IPG-P) son compuestos producidos por la hidrólisis de los glicosil fosfoinositidos presentes en la membrana celular. Además de ser mediadores insulínicos de rápida acción, nuestros resultados demuestran que el IPG-A e IPG-P son inhibidores de peroxidasas y catalasa, lo que genera un aumento en la concentración celular de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los aumentos moderados del nivel basal de este último son señales transductoras en diferentes caminos metabólicos (por ejemplo: aumento de la proliferación celular). La actividad de las peroxidasas se determina por la incorporación de 125I a la tirosina en presencia de H_2O_2 ; la de catalasa por la medición espectrofotométrica del consumo de H_2O_2 y la de 2-cis peroxiredoxina por la reducción del hidróxido de cumeno. El inhibidor, localizado en el citosol de células animales, vegetales y bacterianas actúa sobre peroxidasas y catalasa del mismo tejido (efecto homólogo) o de otros tejidos u organismos (efecto heterólogo). Las inhibiciones son dependientes de la dosis del IPG y pueden alcanzar al 100% de la actividad enzimática. En todos los casos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Son inhibidas enzimas con diferentes grupos prostéticos. Las peroxidasas de tiroides, leche, rábano picante, soja y la catalasa de E. coli contienen hierro como parte del grupo hemo; la glutatión peroxidasa: selenio y la 2-cis peroxiredoxina no posee grupo prostético. La cinética de inhibición demuestra que el IPG actúa en forma no competitiva. El sitio de acción no es el grupo prostético dado que el inhibidor no produce ningún efecto sobre el pico en la región Soret, en presencia o ausencia de H_2O_2 . En conclusión: El inositol fosfoglicano es el inhibidor general de peroxidasas y catalasa involucradas en la modulación del nivel de

peróxido de hidrógeno que actúa en diferentes caminos metabólicos como señal transductora

- 388. (508) EVALUACIÓN IN VITRO E IN VIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE LIGARIA CUNEIFOLIA.** MARCHINI TIMOTEO, DOBRECKI CECILIA, RICCO RAFAEL, GURNI ALBERTO, LLESUY SUSANA, WAGNER MARCELO, EVELSON PABLO

Química General e Inorgánica-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA; Farmacobotánica-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA; PRALIB-CONICET- Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

Ligaria cuneifolia es una especie utilizada en la medicina tradicional argentina de la que se ha reportado que posee diversos efectos sobre la salud que incluyen acciones antivirales, antitumorales, inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Se ha sugerido que estos efectos podrían atribuirse a la capacidad antioxidante que poseen los extractos de esta especie. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad antioxidante in vitro e in vivo de extractos de Ligaria cuneifolia. Se realizó la evaluación in vitro de los extractos crudos, acuosos, metanólicos y en acetato de etilo (AcEt) con técnicas que evalúan la capacidad antioxidante hidrosoluble (con ABTS como sustrato) y liposoluble (con DPPH). Los resultados muestran que el extracto AcEt posee mayor capacidad antioxidante que el crudo con ambos sustratos (ABTS: $5,60 \pm 0,46$ vs $0,32 \pm 0,04$; DPPH: $4,3 \pm 0,2$ vs $2,8 \pm 0,2$ mmol ácido ascórbico/g extracto; $p < 0,01$). Por ello, se estudió la capacidad del extracto AcEt para inhibir la peroxidación de lípidos a través de la medidas de producción de TBARS en homogenizados de hígado y quimioluminiscencia (QL) espontánea de homogeneizados de cerebro de rata. Se observó una inhibición dosis dependiente en ambos casos (control: TBARS: 26 ± 3 pmol/mg prot; QL: 7200 ± 700 cpm/mg prot). Finalmente, se evaluó la capacidad de inhibir el estrés oxidativo en la piel de ratones vivos sometidos a irradiación UV mediante quimioluminiscencia in vivo. Los ratones tratados en forma tópica con la fracción AcEt (solución 10% P/V) mostraron una disminución de la QL in vivo del 50% (control: 52 ± 3 cps/cm²; $p < 0,01$). Los resultados muestran que la fracción AcEt de Ligaria cuneifolia posee capacidad antioxidante tanto en modelos in vivo como in vitro.

- 389. (566) MODELO ANIMAL DE PROTOPORFIRIA. EFECTO DE LA GRISEOFULVINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CATALASA Y EL POOL DE HEMO HEPÁTICO.** MARTINEZ MARIA DEL CARMEN (1),(2), AFONSO SUSANA GRACIELA(1), BATLLE ALCIRA M.C.(1)

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA (1). Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- UBA (2)

La Protoporfirina Eritropoyética (PPE) es una enfermedad hereditaria asociada con una deficiencia en la Ferroquelatasa (Fech), última enzima de la biosíntesis del hemo, que conduce a una acumulación de protoporfirina IX (PPIX) en eritrocitos, hígado y piel. La manifestación más grave es la falla hepática progresiva asociada con colestasis y depósitos cristalinos de PPIX en los canalículos biliares. La Griseofulvina (Gris), antimicótico ampliamente utilizado, desarrolla en animales de laboratorio manifestaciones hepáticas similares a las observadas en pacientes con PPE. La acción porfirinogénica de la Gris se debe a la formación de N-metil porfirinas, poderosos inhibidores de la FeCh. En trabajos previos (SAIC 2003, 2004) demostramos que la administración de Gris induce estrés oxidativo en ratones. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción de Gris sobre la actividad de las hemoproteínas del sistema de defensa antioxidante hepático y sobre el pool de hemo regulatorio en ratones. Se midieron las actividades de catalasa y glutatión peroxidasa, y triptofano pirrolasa, enzima marcadora del pool de hemo, y la expresión del

ARNm de catalasa en el hígado de ratones que recibieron diferentes dosis de Gris en la dieta (0,5%; 1,5% y 2,5%; p/p en el alimento). Se observó una reducción del 50% ($p < 0,05$) en la actividad de catalasa; sin embargo los niveles del ARNm no disminuyeron. La actividad de glutatión peroxidasa disminuyó 40% ($p < 0,05$). El cociente de actividad de holo/apo triptofano pirrolasa decreció hasta la mitad con el aumento de concentración de Gris, lo que indicaría una disminución del pool de hemo. La actividad enzimática de catalasa se restableció con la administración de hemina. En conclusión, los resultados indicarían que la disminución de actividad de catalasa hepática producida por Gris no se debería a una reducción del ARNm, sino a la baja disponibilidad de hemo hepático.

390. (572) FRACCIONES SERICAS ESPECIFICAS EN PACIENTES ADULTOS HIV+. ESTUDIO PRELIMINAR. FELIU MARÍA SUSANA, SILVA CAROLINA, SANCHEZ GABRIEL, SQUASSI ALDO, SLOBODIANIK NORA

Cátedra de Nutrición-Fac.de Farmacia y Bioquímica,UBA; Clínica para la Atención de Pacientes de Alto Riesgo I (CLAPAR I); Fac. de Odontología, UBA

Introducción: Las proteínas séricas son de potencial utilidad en la evaluación de los desequilibrios nutricionales. Objetivo: Analizar la concentración de fracciones específicas en pacientes adultos HIV+. Material y métodos: Se estudiaron 40 pacientes adultos HIV+ con edades comprendidas entre 25 y 51 años de edad, concurrentes por control al CLAPAR I; éstos se dividieron según número de células CD4+: < 200 ; $200-499$ y > 500 . Se determinó la concentración de fracciones proteicas (mg/dL) de: 1) potencial utilidad en estudios de nutrición: Transtiretina (TR), y fracciones C3 y C4 de complemento (C3c, C4c) y 2) fase aguda: Ceruloplasmina (Cerul), y Proteína C Reactiva (PCR). Las muestras de sangre fueron extraídas en ayunas, determinándose las fracciones por inmunodifusión radial cuantitativa sobre placas (Diffuplate, Biocientífica SA). Al analizar los resultados obtenidos entre los 3 grupos, por ANOVA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,01$ en los parámetros estudiados. Los valores obtenidos ($X \pm DE$, mg/dL) para la población total (HIV) se compararon con los valores de referencia (R). Los resultados son: TR= $26,0 \pm 17,0$ vs $31,1 \pm 3,8$; C3c= $81,5 \pm 33,0$ vs $135,0 \pm 27,0$; C4c= $18,6 \pm 8,4$ vs $34,0 \pm 11,0$; Cerul= $49,2 \pm 16,8$ vs $44,0 \pm 8,0$. Se observa disminución significativa ($p < 0,02$) en la concentración de TR, C3c y C4c con aumento significativo ($p < 0,05$) en los niveles séricos de Ceruloplasmina. El 88% de la población presenta valores de PCR dentro de los valores de referencia ($< 0,4$ mg/dL). Es interesante señalar que el 50% de la población presenta niveles de TR y C3c por debajo del valor de referencia. Estos resultados sugieren que parte de la población estudiada se encuentra en riesgo nutricional siendo necesario impartir educación alimentaria junto al tratamiento farmacológico. Financiado por Universidad de Buenos Aires (B060).

391. (583) COEXISTENCIA DE PORFIRIAS CON SINTOMATOLOGÍA AGUDA Y CUTÁNEA EN DOS FAMILIAS. ROSSETTI MARÍA VICTORIA (1,2), MELITO VIVIANA ALICIA (1,2), GEREZ ESTHER (2), BATLLE ALCIRA (2), PARERA VICTORIA ESTELA (1,2)

Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA (1) y Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas - UBA (2)

Las porfirias se originan por una deficiencia parcial y específica de una de las enzimas del camino del hemo. Según la sintomatología se clasifican en agudas, cutáneas y mixtas. La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) y la Porfiria Cutánea Tardía (PCT) se transmiten en forma autosómica dominante y se producen por fallas en los genes que modifican para la Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-D) y la Uroporfirinógeno Decarboxilasa (URO-D) respectivamente. Se estudiaron 2 familias argentinas no relacionadas cuyos datos bioquímicos sugirieron la coexistencia de

Porfiria aguda y cutánea. En una familia se diagnosticaron 2 hermanas (AP e IP) sólo como PCT manifiesta: Porfirinas Urinarias (PU): 1017 y 1832 $\mu\text{g}/24$ h con un patrón de excreción característico; Índice de Porfirinas Plasmáticas (IPP): 2,80 y 3,81; mutación en URO-D: P62L. AP tiene 2 hijas: MC, PAI manifiesta y LC, PAI latente; Mutación en PBG-D: 985del12. MC tiene 4 hijos, 2 de ellos PAI latente. LC tiene 2 hijas, ambas PAI latente. La otra familia estudios bioquímicos y genéticos indicaron que en la paciente ML, con manifestación aguda y cutánea, coexisten PAI y PCT (ALA: 5,4 mg/24 h; PBG: 70,1 mg/24 h; PU: 1071 $\mu\text{g}/24$ h con un patrón de excreción mixto; IPP: 1,68). ML tiene 9 hijos; 4 varones: 3 PAI latente y 1 PAI/PCT y 5 mujeres: 1 PAI manifiesta (MD), 1 PAI latente (MED) y 3 PAI/PCT (OD, YD y AD). OD tiene 2 hijas, KL normal y YL PAI latente. YD tiene 1 hija normal y MED 3 hijos PAI latente. Mutación de PAI: G111R. La actividad de URO-D eritrocitaria está disminuida en todos los integrantes portadores del alelo mutado indicando que se trata de una PCT hereditaria. Ambas familias son PAI/PCT, en una de ellas cada padre aporta un alelo mutado mientras que en la otra la madre contribuye con el alelo que contiene ambos genes mutados. El diagnóstico referencial preciso es relevante en cuanto al tratamiento de estos pacientes ya que las drogas empleadas para la PCT podrían desencadenar un ataque agudo.

392. (728) SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE Y DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC EN PULMON. BIAGGIO VERONICA, GOMEZ NIDIA NOEMÍ, GIMENEZ MARÍA SOFÍA

Fac. de Qca. Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis

La deficiencia nutricional de zinc puede ser frecuente en algunos grupos poblacionales y el déficit de este elemento puede contribuir al desarrollo y progresión de severas patologías. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Gómez y col. 2003 y 2006) demostraron la existencia de un cuadro inflamatorio, con marcado daño oxidativo en pulmón de rata, como consecuencia de una deficiencia moderada de Zinc (ZD). Nuestro objetivo fue determinar si la realimentación, con dieta control, de las ratas Zinc Deficientes (ZD) revierte el daño oxidativo. Para ello 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 (Ral) que recibió una dieta ZD y se realimentó luego por 10 días con una dieta Control. En suero y pulmón se midió el grado de lipoperoxidación de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBAR'S). Por otro lado, se determinó la expresión de NOX-2, SOD, GPX y CAT en pulmón. El RNA total fue obtenido del pulmón usando Trizol. Se separaron alícuotas que se amplificaron por PCR usando primers específicos y β -actina como gen control. Las bandas se cuantificaron por densitometría. Los niveles de TBAR'S tanto en suero como en pulmón aumentaron significativamente en ZD ($p < 0,01$). La enzima GPx aumentó en ZD ($p < 0,05$) y en Ral ($p < 0,01$) respecto al grupo control; SOD y NOX-2 aumentaron significativamente en ZD ($p < 0,05$) en ambos casos y los valores se revirtieron al realimentarlas. CAT no presentó cambios significativos en ninguno de los grupos. Se concluye que la realimentación con zinc, en un cuadro de deficiencia moderado, revierte los niveles de mRNA de algunas de las enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante. No alcanzando este tiempo de realimentación para recuperar todas las enzimas.

NEFROLOGÍA I

393. (730) PRESENCIA DE FLAVONOIDES EN HARINA DE SEMILLAS DE AMARANTHUS CRUENTUS Y SUS EFECTOS FAVORABLES EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE Y PREVENCIÓN DE DEPÓSITOS GRASOS EN HÍGADO DE RATA WISTAR. ESCUDERO NORA, GOMEZ NIDIA NOEMÍ, DOMINGUEZ SUSANA,

SCARDAPANE LUIS, MUCCIARELLI SARA, GIMENEZ MARÍA SOFÍA

Fac. de Química Bioquímica y Farmacia UNSL

Introducción: Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de flavonoides en harina de semilla de *Amaranthus cruentus* (Ac) y correlacionar estos datos con el sistema de defensa antioxidante y la histo-arquitectura del hígado de ratas Wistar alimentadas con dietas cuya fuente proteica provenía de harina de Ac (DHAc), comparadas con dieta que contenía una proteína animal, caseína (DC). **Método:** Se determinó flavonoides totales espectrofotométricamente utilizando catequina como estándar. Se trabajó con 16 ratas Wistar macho adultas alimentadas con dietas adicionadas de 1% de colesterol y 12% de proteína; un grupo control DC y un grupo experimental DHAc durante 28 días. Al término de la experiencia, las ratas se anestesiaron, se le extrajeron los órganos y se recolectó sangre para estudios posteriores. Las secciones histológicas se fijaron con líquido de Bouin, se colorearon con H-E y MG-G. Además, se determinó glutatión total y reducido y tioles totales no proteicos. **Resultados:** La concentración de flavonoides fue de $23,58 \pm 1,35$ (mg/100g). En ratas alimentadas con DHAc aumentaron significativamente glutatión total $p < 0,05$; glutatión reducido $p < 0,001$ y tioles totales no proteicos $p < 0,05$, en todos los casos respecto a DC. El diagnóstico histopatológico indica que las ratas alimentadas con DC presentan el hígado con moderada infiltración grasa, mientras que las ratas alimentadas con DHAc presentan un hígado sin cambio de grasa y con integridad estructural. **Conclusión:** Un aumento de las defensas antioxidantes en la dieta experimental, lo cual se asocia a la presencia de flavonoides en la misma, el diagnóstico histopatológico corrobora los datos obtenidos en la evaluación de los sistemas de defensas antioxidantes.

- 394. (222) ÁREA DE GLOMÉRULOS SUBCAPSULARES VERSUS YUXTAMEDULARES EMPLEANDO DIFERENTES MEDIOS DE FIJACIÓN (FORMOL, BOUIN, PERFUSIÓN) O PRESERVACIÓN (NITRÓGENO LÍQUIDO).** OSSANI GEORGINA PAULA (1), CASTIGLIA NORA INÉS (2), MARTINO MARÍA FERNANDA (1), FARIÑA SILVIA LILIANA (1), UCEDA ANA MARGARITA (1), MONSERRAT ALBERTO JUAN (1)

Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (1) Hospital de Clínicas. Departamento de Docencia e Investigación. Sección de Asesoría Científica. (2)

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, 8 y 10 meses, empleando diferentes medios de fijación o preservación, ampliando datos previamente presentados. Ratas hembra Wistar del Bioterio del Centro de Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA, 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%), la mitad anterior del riñón derecho en nitrógeno líquido y la mitad posterior en Bouin alcohólico (Duboscq-Brazil). Otros riñones de ratas de 2 y 10 meses fueron fijados por perfusión. Todos fueron coloreados con hematoxilina-eosina. El área glomerular se midió con analizador de imágenes, empleando el programa 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 aproximadamente 8000 glomérulos. Los resultados se analizaron estadísticamente realizando un test de ANOVA a 3 vías (programa: 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. El área de los glomérulos yuxtamedulares fue significativamente mayor que la de los glomérulos subcapsulares independientemente del fijador o la edad del animal ($p < 0,001$).

- 395. (238) CAMBIOS VASCULARES EN RATAS SENILES.** FIORI MARIANA CARLA (1), OSSANI GEORGINA PAULA (2), CARAM SILVIA GRACIELA (2), LAGO NÉSTOR RUBÉN (2), MONSERRAT ALBERTO JUAN (2)

Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de General San Martín. (1) Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (2)

El envejecimiento en la rata va usualmente acompañado por una nefropatía crónica progresiva caracterizada por proteinuria, glomerulopatía esclerosante, fibrosis intersticial y atrofia tubular. La patología vascular es incierta. Se estudiaron los cambios vasculares en ratas jóvenes controles y seniles por técnicas morfológicas convencionales de material incluido en parafina y por microscopía óptica de alta resolución (MOAR) de material incluido en Polibed. La remodelación vascular fue evaluada por técnicas de análisis de imágenes de material incluido en parafina y coloreado con metenamida plata cromotropo 2R. Veinticuatro ratas fueron divididas en dos grupos: 12 fueron sacrificadas a los 3 meses de edad (jóvenes) y 12 entre los 18 y 24 meses (seniles). En los cortes coloreados con metenamida plata se seleccionaron las arterias cuyo diámetro externo (DAE) medía entre 50 y 70 micrones y se les midió también el diámetro interno (DAI). Se calculó la diferencia entre DAE y DAI dividido 2 y la superficie de la pared vascular (SPV), siendo los valores significativamente mayores en ratas seniles ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente). Por MOAR se observó hialinosis en vasos de pequeño calibre y engrosamiento de la media en arterias de calibre mayor en ratas seniles. En estas ratas la proteinuria fue significativamente mayor, no observándose diferencia en la presión arterial. Los resultados obtenidos muestran que la nefropatía crónica progresiva de la rata senil va acompañada por cambios de remodelación vascular y de hialinosis de vasos pequeños.

- 396. (280) PERITONEO HUMANO: SUPERFICIE VISCERAL Y PARIETAL SUPRA E INFRAMESOCÓLICAS, DE INTERES EN DIALISIS Y PATOLOGIAS PERITONEALES.** ALBANESE ALFONSO MIGUEL, ALBANESE EDUARDO, MIÑO JORGE, GOMEZ ELENA, GOMEZ MARTA, INGRATTA ADRIANA, MERLO ALICIA

Facultad De Medicina USAL; Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

El conocimiento de la superficie total del peritoneo y de sus porciones adquiere relevancia en la diálisis y en procesos infecciosos o tumorales abdominales. El objetivo fue determinar la superficie de las porciones visceral y parietal supra e inframesocólicas del peritoneo y la superficie total mediante la suma de las mismas. Se seleccionaron 10 cadáveres femeninos de edad (media \pm ES) $75,88 \pm 2,99$ años sin registro de patología abdominal en la historia clínica ni por observación directa, fijados en formaldehído al 5% por lo menos desde 6 meses antes de su uso para asegurar la estabilidad del material. Se aplicó una película de celofán sobre cada una del total de las estructuras: órganos, mesos, epiplones, ligamentos y paredes. Luego los moldes de celofán se transfirieron a papel opaco. Se obtuvieron por escaneo imágenes digitalizadas de los moldes de papel en los que se incluyó una referencia de medida y se determinaron sus superficies por el programa Scion Image for Windows. La superficie (media \pm ES en cm^2) del peritoneo total resultó $14329,62 \pm 824,44$ (visceral $11786,33 \pm 794,59$ y parietal $2543,29 \pm 107,51$). La superficie (media \pm ES en cm^2) del peritoneo del abdomen supramesocólico fue de $4493,46 \pm 196,72$ (visceral $2706,79 \pm 147,86$ y parietal $1786,67 \pm 92,58$) y la correspondiente al abdomen inframesocólico fue de $9836,16 \pm 732,67$ (visceral $9079,54 \pm 722,71$ y parietal

756.62±55.91). Las diferencias entre los valores son significativas ($p < 0.001$ ANOVA). Los resultados de este trabajo indican que el peritoneo visceral del abdomen inframesocólico aporta la mayor superficie no sólo al abdomen inframesocólico sino también al peritoneo total, mientras que el peritoneo parietal es mayor en el abdomen supramesocólico que en el inframesocólico. Estos resultados son de tener en cuenta en prácticas o patologías que involucren al peritoneo.

397. (296) EFECTOS DEL URODILATIN SOBRE LA CAPTACIÓN RENAL DE DOPAMINA. CITARELLA MARISA ROSALÍA, TURCO VANESA, CHOI MARCELO, APRILE FERNANDO, CORREA ALICIA, FERNÁNDEZ BELISARIO

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

El Péptido Natriurético (PN) endógeno renal Urodilatin (URO), el ANF, la Angiotensina II y la Dopamina (DA) regulan la excreción de sodio. Demostramos que el ANF incrementa la captación renal de DA y que la Angiotensina II ejerce el efecto opuesto (Fernández y col. Regul. Pept. 124, 137-144, 2005. Choi y col. Nephron, en prensa, 2006). Estudiamos in vitro los efectos del URO sobre la captación renal de DA en función de la concentración (1pM-100nM URO) y del tiempo en corteza externa y médula renales de ratas Sprague Dawley. Caracterizamos dicha captación e individualizamos el receptor involucrado. Determinamos la captación de 3H-DA en presencia de 10nM URO, bloqueando la captación neuronal. URO aumentó la captación de DA en forma cc-depte (dpm/g.105±ESM, n=7-15), siendo la concentración umbral 100 pM. Controles (C) 4.45±0.09 vs URO 100pM 5.30±0.31*; URO 10nM 5.93±0.31*. Dicho efecto se observó a partir de los 15 min (C 3.78±0.15; 5.20±0.37*). URO aumentó la captación de DA en corteza externa (C 4.40±0.09; 5.90±0.30*) y médula (C 4.60±0.10; 5.80±0.20*). El bloqueo de la captación extraneuronal con 100 µM hidrocortisona (HC), revirtió los efectos del URO (C 4.40±0.09; URO 6.12±0.23*; URO+HC 4.98±0.41). Anantín 10 nM (bloqueante del NPR-A) revirtió el efecto del URO (C 4.45±0.09; URO 5.87±0.21*; URO + anantín 4.22± 0.09), mientras que 10nM ANF 4-23 amida (agonista del NPR-C) no modificó la captación de DA (C 4.44±0.09; URO 6.15±0.26*; URO+ANF 4-23 amida 6.11±0.42*). *:P< 0.05 vs C. URO aumenta en forma cc-depte, la captación renal de DA- HC sensible a los 15 min, en corteza y médula renales, activando receptores NPR-A y descartando los NPR-C, incrementando como el ANF, la DA disponible. De esta manera la DA renal mediaría parte de los efectos natriuréticos del URO.

398. (298) SEÑALES INTRACELULARES QUE MEDIAN EL EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE EL METABOLISMO DE LA DOPAMINA RENAL. CHOI MARCELO ROBERTO, CITARELLA MARISA, APRILE FERNANDO, TURCO VANESA, CORREA ALICIA, FERNÁNDEZ BELISARIO

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

Describimos que la Angiotensina II (ANG II) disminuye la captación in vitro de 3H-DA en cortes de corteza renal de ratas Sprague Dawley de una manera concentración dependiente y a los 30 minutos de incubación. Se caracterizó la captación como extraneuronal (hidrocortisona sensible) y temperatura dependiente. Los efectos fueron mediados por el receptor AT1 sin participación del AT2 (Choi y col., Nephron, en prensa, 2006). Continuamos los estudios con el objetivo de dilucidar los mecanismos intracelulares implicados en el proceso. Se incubó con ANG II 100 nM en presencia de nomifensina 17 µM para bloquear la captación neuronal. El SQ 22536 (SQ) 100 µM (inhibidor de la adenilatoclasa, AC) no bloqueó los efectos del péptido sobre la captación renal de DA (n=6-9): C: 10.34±0.19, ANG II: 7.41±0.21*, SQ: 9.85±0.77, ANG II + SQ: 7.79±0.27*; mientras que el U 73122 (U) 25 µM (inhibidor de la fosfolipasa C, PLC) fue capaz de bloquearlos (n=7-18): C: 10.34±0.37, ANG II: 7.41±0.21*, U: 10.04±0.46, ANG II + U: 9.72±0.51. El LY 294002 (LY) 10 µM

(inhibidor de la IP3 quinasa) no tuvo efectos sobre la captación de DA-ANG II dependiente (n=7-9): C: 10.29±0.31, ANG II: 7.41±0.21*, LY: 10.65±0.56, ANG II + LY: 7.60±0.48*. El chelerytrine (Che) 10 µM (inhibidor de la proteinquinasa C, PKC) revirtió los efectos del péptido (n=5-7): C:10.34±1.03, ANG II: 7.41±0.21*, Che: 11.21±0.72, ANG II + Che: 10.00±0.79. *: P< 0.05 (Student t-test, ANOVA, test de Tukey). Los resultados muestran que el efecto de la ANG II sobre la captación renal de DA se produce a través de la vía de señalización que implica a la PLC y PKC, descartándose la participación de la AC y de IP3 quinasa.

399. (338) MUTANTES DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 (STX2) NEUTRALIZAN EL EFECTO DE LA TOXINA NATIVA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS EPITELIALES TUBULARES RENALES HUMANAS (CERH). PISTONE CREYDT VIRGINIA, CASTRO PARODI MAURICIO, TIRONI FARINATI CARLA, SILBERSTEIN CLAUDIA, IBARRA CRISTINA

Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina - UBA

La Stx2 producida por algunas cepas patógenas de *E. coli* causa colitis hemorrágica en humanos que puede derivar en Síndrome Uremico Hemolítico. Esta toxina esta constituida por una subunidad A y cinco B. Ambas tienen acción citotóxica en CERH. El objetivo del presente trabajo fue obtener mutantes por recombinación genética de la subunidad B de Stx2 (Stx2B) que perdieran la acción tóxica y neutralizaran el efecto de Stx2 observado en CERH. Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de células epiteliales provenientes de corteza renal de pacientes adultos del Servicio de Urología del Hospital de Clínicas. Los mutantes se obtuvieron a partir de la amplificación de fragmentos de la subunidad B por PCR. Una mutante (Stx2Bmut) se clonó en pQE70 y otra (Stx2Bcons) en pRSET-A que agregan 6 histidinas en los extremos C o N-terminal de los respectivos péptidos. Luego se amplificaron en bacterias competentes DH5α o BL-21. Las mutantes se purificaron por cromatografía de afinidad usando columnas de Ni-agarosa y se analizaron por Western blot. El efecto de Stx2B, Stx2Bmut y Stx2Bcons se estudio a 24 y 48hs sobre la viabilidad de CERH. Stx2Bcons no modificó la viabilidad de las células hasta concentraciones tan altas como 10 µg/ml y 48hs de incubación. En cambio, Stx2Bmut modificó la viabilidad de CERH ($p < 0,05$) a 24 hs pero a una concentración 10 veces mayor que Stx2B. A continuación se evaluó la capacidad que tenían ambas mutantes de neutralizar el efecto tóxico de Stx2 sobre CERH. Una neutralización total se logró cuando las células se incubaron con 1ng/ml de Stx2Bmut o Stx2Bcons por 4hs y luego con 1ng/ml de Stx2 por 20hs. Este bloqueo fue parcial cuando las células se lavaron luego de la preincubación con las mutantes. Los resultados demuestran que ambas mutantes son capaces de neutralizar el efecto citotóxico de la toxina, siendo Stx2Bcons totalmente inocua para las células a concentraciones y tiempos de incubación elevados.

400. (428) NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TANDEM (VNTR) EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE LA PROSTACICLINA SINTASA EN RIÑÓN DE RATAS COLINO-DEFICIENTES. DENNINGHOFF VALERIA (1) (2), OSSANI GEORGINA PAULA(1), AVAGNINA ALEJANDRA(2), ELSNER BORIS(2), MONSERRAT ALBERTO JUAN(1)

Centro de Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires(1), Servicio de Patología, CEMIC(2).

La colina cumple diversas funciones en los organismos vivos. Ratas macho recién destetadas, alimentadas con dieta deficiente en colina, con aceite de maíz y aceite vegetal hidrogenado como lípidos, desarrollan insuficiencia renal aguda (IRA) dentro de los siete días posteriores a iniciada dicha alimentación carencial, pudiendo morir como consecuencia del daño renal. Dado que el aceite de pescado tiene un efecto protector en este modelo ex-

perimental y debido a la posible implicancia en la síntesis de prostanoïdes, dicho efecto podría deberse a modificaciones en el tono vasomotor, como así también a la susceptibilidad de cada rata considerada individualmente. Diferentes autores describen una relación entre el VNTR en la región promotora del gen de la prostaciclina sintasa (prPGIS) y diferentes patologías. El objetivo del estudio es verificar la relación entre el VNTR del prPGIS y la reparación renal. Se purificó ADN a partir de riñón incluido en parafina de 10 ratas Sprague-Dawley (SD) alimentadas con dieta deficiente en colina: 6/10 murieron por IRA y 4/10 sobrevivieron a los 21 días y al ser sacrificadas tenían reparación renal. Se desparafinaron los cortes con Xilol-Etanol. La muestra fue digerida en Buffer-PK. Las fracciones lipo-proteicas fueron extraídas con Fenol-Cloroformo-Isoamílico. El ADN purificado fue precipitado y resuspendido. La pureza y el rendimiento del ADN fueron medidos por espectroscopia. Se amplificó un fragmento del prPGIS con primers diseñados para flanquear el VNTR. Todas las PCR fueron evaluadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, visualizadas con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. No encontramos diferencias entre los alelos encontrados en la población de ratas que murieron por IRA y aquellas que sobrevivieron a los 21 días y al ser sacrificadas tenían reparación renal. En conclusión la reparación renal en la rata SD no se debe a diferencias en la secuencia de la región 5' del gen de la prostaciclina sintasa.

401. (647) EXPRESIÓN DE GENES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRARENAL LUEGO DE ISQUEMIA Y DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. MOLINAS SARA MARÍA (1, 2), TRUMPER LAURA (1, 3), MONASTEROLO LILIANA (1,4), CASATI PAULA (5), ELÍAS M. MÓNICA (1, 2)

Farmacología. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario (1). Instituto de Fisiología Experimental-CONICET(2) CIUNR (3) CONICET (4) CEFOTI-CONICET (5)

El SRA es activado en varias situaciones de daño renal, sin embargo, su rol en el desarrollo de la insuficiencia renal aguda isquémica todavía no es claro. Angiotensina II (ANGII) a través de su receptor AT1 posee propiedades vasoactivas y proinflamatorias. En trabajos previos, mediante el bloqueo de los receptores AT1, sugerimos un rol importante de estos receptores en el desarrollo de la injuria isquémica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión en corteza renal de los genes del SRA: renina y el receptor AT1 luego de isquemia-reperfusión. Se evaluó también la expresión de renina luego de isquemia sin perfusión. Se sometió a un grupo de ratas Wistar macho adultas a 40 minutos de isquemia unilateral sin perfusión (I, n=5). Otro grupo se sometió a 40 minutos de isquemia seguidos de 24 horas de perfusión (IR, n=5). Al finalizar cada período se extrajeron los riñones isquémicos, se separó la corteza y se extrajo el ARN. Luego de realizar la transcripción reversa de los ARNm, se realizó una cuantificación relativa de los niveles de ARNm de renina y AT1 por PCR en Tiempo Real utilizando el colorante SYBR Green. Para la cuantificación, ambos genes se normalizaron respecto a la expresión del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Los niveles de ARNm de renina disminuyeron en I (182±42 veces respecto al control) y también en IR (472±150 veces respecto al control). En IR se produjo una disminución de la expresión del ARNm de AT1 (66±30 veces respecto al control). Estos resultados muestran que la injuria causada por I e IR se encontraría asociada con una reducción de los niveles de ARNm de renina. Además, el daño causado por IR se encontró asociado con una disminución de los niveles de ARNm del receptor AT1. Un posible aumento de ANGII, en respuesta a la injuria podría ser responsable, al menos en parte, de la disminución de la expresión de estos genes debido a mecanismos de retroalimentación negativos.

402. (687) EFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL CITOCROMO P450 RENAL SOBRE EL AUMENTO DE LA EXCRECIÓN HIDROELECTROLÍTICA RESULTANTE DE LA EXPANSIÓN DEL VOLUMEN EXTRACELULAR. KIRCHHEIMER

CAROLINA, FEDERIK MARIA DEL MILAGRO, NOWICKI SUSANA

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)

El ácido 20-hidroxi-eicosatetraenoico (20-HETE) es el principal producto del metabolismo del ácido araquidónico (AA) por el citocromo P450 4A renal (CYP 4A). Evidencias previas demostraron su efecto inhibitorio sobre la actividad de la Na⁺,K⁺-ATPasa en el túbulo proximal, y se ha propuesto su participación en la modulación de la excreción renal de sodio. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la inhibición del CYP 4A sobre la excreción hidroelectrolítica provocada por la expansión del volumen extracelular. Se estudiaron ratas Wistar controles (C) ó tratadas con el inhibidor del CYP 4A, 1-aminobenzotriazol (ABT, 50 mg/kg, i.p., 12h antes). Los animales anestesiados fueron preparados para estudios de clearance. Se recogieron muestras de orina durante los períodos basales (B), expansión (E, 5% PC/h con solución de NaCl 0.9%, 30 min), y recuperación (R). No hubo diferencias en la diuresis (V, en uL/min/100g: 1.42±0.15) y natriuresis (UNaV, en uEq/min/100g: 0.047±0.017) basales entre las ratas C y ABT. El ABT redujo la V y UNaV durante el período E (V; C: 3.60±0.22#, ABT: 1.82±0.32*; UNaV; C: 0.299±0.062#, ABT: 0.055±0.006*) y R (V; C: 3.22±0.11#, ABT: 1.59±0.12*; UNaV; C: 0.294±0.022#, ABT: 0.083±0.037*). El VFG tendió a aumentar durante E sólo en el grupo C (en ml/min/100g: B, 0.47±0.08; E, 1.01±0.19). El ABT no modificó el clearance de sodio (Cl de Na en uL/min/100g: 2.83±1.17) ni la excreción fraccional de sodio (EFNa en %: 0.137±0.059) durante el período B, pero redujo ambas en E (Cl de Na, C: 4.930±1.46, ABT: 1.06±0.09*; EFNa, C: 0.213±0.067, ABT 0.071±0.009) y en R (Cl de Na, C: 3.30±0.05, ABT: 1.23±0.41*; EFNa, C: 0.274±0.036, ABT: 0.093±0.026*). # p < 0.05 vs B, * p < 0.05 vs C. Nuestros resultados sugieren que la respuesta diurética y natriurética a la expansión moderada del volumen extracelular requieren de la participación de los productos del metabolismo del AA por el CYP 4A. Estos metabolitos actúan probablemente a nivel tubular.

403. (698) EXPRESIÓN DE NADPH-DIAFORASA, NNOS Y ADRENOMEDULINA EN MÁCULA Densa DE RATAS CON ALTA INGESTA DE SODIO. IBARRA FERNANDO RAÚL (1), DE LUCA SAROBE VERÓNICA (1, 3), IBARRA MARIANO ESTEBAN (2), REY FUNES MANUEL (2), DI CIANO LUIS (1, 3), COIRINI HÉCTOR (2, 4), JUAN JOSÉ LÓPEZ-COSTA (2), ARRIZURIETA ELVIRA E. (1), MARTÍNEZ A (5), LOIDL C. FABIÁN (2)

Inst de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA (1) Área Fisiología, FCV, UBA (3) Instituto de Biología Celular y Neurociencias E De Robertis, Facultad de Medicina, UBA (2) IByME, UBA-CONICET (4) Instituto Cajal, Madrid, España.(5)

En el riñón, la mácula densa (MD) actúa sensando la oferta de sodio a los segmentos distales del nefrón. Por medio de este mecanismo, regula el feedback tubuloglomerular y el balance de Na⁺. La NADPH-diaforasa (NADPH-d) (SAIC 2004) y la isoforma neuronal de la NOS (nNOS) se expresan en la MD. La adrenomedulina (ADM) es un polipéptido vasodilatador y natriurético cuya distribución en riñón acorde al balance de Na⁺ no ha sido descrita. Se estudiaron ratas Wistar macho, 250-350 g de peso, divididas en tres grupos: control (C, dieta habitual), sodio alto por 24hs (HS1, NaCl 1% en el agua de bebida) y sodio alto por 5 días (HS5). nNOS y ADM se detectaron por inmunohistoquímica y NADPH-d por histoquímica. En C, nNOS y NADPH-d se hallaron nítidamente en MD, mientras que ADM se detectó en túbulo proximal y en la hoja parietal de la cápsula de Bowman. En las ratas HS1 no se apreciaron diferencias respecto a C. En cambio, en el grupo HS5, la señal de nNOS permaneció inalterada, mientras que la de NADPH-d disminuyó un 80% comparada con C (p < 0.01). La ADM, presentó además inmunorreacción en MD (p < 0.05 vs C). Conclusión: la ingesta hipersódica crónica (NaCl 1%) modifica el patrón de expresión de varios mediadores/efectores en la MD. Mientras que nNOS permanece constante la disminución

en NADPH-d, podría indicar de manera indirecta menor actividad enzimática. La expresión de ADM en HS5, sugiere que además de desempeñar un rol en el mecanismo de feedback tubuloglomerular, interviene en la regulación del sodio.

ONCOLOGÍA V

- 404. (126) LA RESISTENCIA A VINCRISTINA EN LAS CÉLULAS K562 ESTÁ ASOCIADA A UNA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF-KB.** ASSEF YANINA (1), RUBIO FERNANDA (2), COLÓ GEORGINA (2), DEL MONICA, SILVANA (1), COSTAS MÓNICA (2), KOTSIAS BASILIO A. (1)

Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (1) Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (2)

Los mecanismos que conducen a la multidroga resistencia (MDR) son unas de las razones del fracaso de la quimioterapia y se asocian a la sobreexpresión de P-glicoproteína o P-gp en las células tumorales. Las drogas antineoplásicas promueven la activación del factor de transcripción NF- κ B, aunque en algunos tipos celulares NF- κ B actuaría como supresor de la expresión de P-gp. En el marco del estudio de la regulación de la expresión concertada de las proteínas CFTR y P-gp, en este trabajo utilizamos la línea celular leucémica humana K562 y su derivada resistente a vincristina (K-Vinc) para evaluar la relación entre NF- κ B y el fenotipo MDR. Las células K-Vinc crecen en presencia de vincristina 100 nM, mientras que la viabilidad de las K562 disminuye un 80% en estas condiciones. En ensayos previos observamos por PCR semicuantitativa que la expresión de P-gp en K-Vinc es 15 ± 8 veces mayor que en K562. Confirmamos estos resultados por western blot donde se observó una banda a 170 kDa en K-Vinc correspondiente a P-gp, mientras que no fue detectada en K562. El transporte mediado por P-gp fue evaluado por citometría de flujo midiendo la acumulación de la sonda fluorescente Fluor-3. La intensidad de fluorescencia fue: 33 ± 2 y 11 ± 1 unidades arbitrarias, respectivamente ($p < 0.01$, $n=3$). La actividad de NF- κ B en extractos nucleares fue evaluada por EMSA. Ambos tipos celulares presentaron actividad constitutiva de NF- κ B, siendo menor en K-Vinc ($n=2$) y determinamos por supershift que el complejo κ B está formado por las subunidades p50/p65. Los niveles totales de p65 no difieren en K562 y K-Vinc, siendo p65/tubulina: 1.0 ± 0.2 y 1.1 ± 0.7 , respectivamente ($p > 0.5$, $n=3$). Nuestros datos indican que la resistencia a vincristina en las células K562 está acompañada de una sobreexpresión y un aumento de la capacidad de transporte de P-gp. En adición, las células K-Vinc presentan una disminución de la translocación al núcleo del heterodímero p50/p65 del NF- κ B.

- 405. (138) EFECTO FOTODINÁMICO DE PORFIRINAS SINTETIZADAS A PARTIR DEL ÁCIDO 5 AMINOLEVÚLICO SOBRE CULTIVOS CELULARES.** ALVAREZ MARIA GABRIELA (1), LACELLI MARIA SOFIA (1), RIVAROLA VIVIANA (1), BATLLE ALCIRA (2), FUKUDA HAYDEE (2) (3)

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto (1) CIPYP-CONICET (2) FCEN-Universidad de Buenos Aires (3)

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica en el tratamiento de neoplasias que involucra el pretratamiento de un tejido tumoral con un fotosensibilizador (FS), el cual causa después de la exposición a la luz, la liberación de oxígeno molecular singlete (1O_2), resultando en el fotodaño y la consecuente destrucción del tejido tumoral. El ácido 5 aminolevúlico (ALA) es el precursor del FS protoporfirina IX (PPIX) en el camino de la biosíntesis del hemo. ALA-TFD se aplica en urología, gastroenterología y dermatología. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos fotodinámicos de ALA-PPIX sobre cultivos de

células de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7c3) y de laringocarcinoma humano (Hep-2). ALA es inocuo en la oscuridad en ambas líneas celulares hasta la concentración 1 mM y 24 horas de incubación (por MTT) y se acumula de manera proporcional a la concentración y al tiempo de incubación, llegando a la saturación a las 5 horas en ambas líneas celulares. (3.2 y $8 \mu\text{g}$ PPIX /10 6 células en Hep-2 y MCF-7c3 respectivamente). Los estudios de localización celular demuestran que la droga se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo en las células MCF-7c3 y en el área perinuclear principalmente en los lisosomas en las células Hep-2. Mediante ensayos de índice de supervivencia (por MTT) se comprobó que la acción combinada de ALA-PPIX (1mM) y la luz visible (54 Jcm^{-2}) induce una disminución significativa de la viabilidad en células MCF-7c3 y en las células Hep-2 (90% y 40% respectivamente). Por tinción con Hoechst 33258 de los cultivos celulares tratados con ALA-PPIX (1mM) se encontró que una irradiación de 54 Jcm^{-2} induce el valor máximo de índice necrótico (73%) en células MCF-7c3 y un valor máximo apoptótico (34%) en células Hep-2. Estos resultados fueron confirmados por el ensayo TUNEL. Los estudios indican la aplicabilidad de ALA-PPIX como agente fototerapéutico para la inactivación de células tumorales mediante TFD.

- 406. (324) LA TERAPIA INMUNOMODULADORA CON CICLOFOSFAMIDA (CY) DISMINUYE EL PORCENTAJE DE LINFOCITOS T REGULADORES EN RATAS PORTADORAS DE UN LINFOMA.** RICO MARÍA J (1), MATAR PABLO (1), ZACARÍAS FLUCK MARIANO F (1), GIORDANO RICARDO (2), SCHAROVSKY O GRACIELA (1)

(1) Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R. (2) Laboratorio CIBIC, Rosario

Previamente demostramos que una dosis baja y única de Cy inhibe el desarrollo de metástasis en ratas portadoras del linfoma L-TACB. El tratamiento con Cy indujo un cambio en el perfil de citoquinas de Th2 (IL-10; TGF- β) a Th1 (IL-2; IFN- γ) e inhibición de las metástasis (inmunomodulación antimetastásica). Teniendo en cuenta que los linfocitos T reguladores (CD4+CD25+CTLA-4+Foxp3+) estarían implicados activamente en la inhibición de la respuesta inmune antitumoral, se decidió estudiar el efecto de la Cy sobre esta subpoblación linfocitaria. Se desafiaron ratas e singeneicas con el linfoma L-TACB vía s.c (día 0). En el día 14 los animales se distribuyeron en dos grupos: 1) Tratados: se inocularon con Cy vía i.p. (10 mg/kg de peso); 2) Control: se inocularon con solución fisiológica i.p. Se tomaron muestras de sangre periférica en los días 0, 14 y 21, y se procesaron para la determinación por citometría de flujo de los marcadores linfocitarios CD4, CD25, CTLA-4 y el factor de transcripción Foxp3. Se observó un aumento significativo en el % de células CD4+CD25+CTLA-4+ en el día 21 del grupo control con respecto al día 0 [mediana (rango); día 0: 0,04 (0-0,05) vs. día 21: 0,38 (0,23-1,44); $p < 0,01$] mientras que la misma comparación no mostró diferencias en el grupo tratado. La subpoblación de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ aumentó progresivamente a lo largo del experimento en ambos grupos experimentales (días 0 vs. 21; $p < 0,05$). Sin embargo, en el día 21 el % de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ en el grupo tratado fue significativamente menor que en el grupo control [0,22 (0,03-0,30) vs 1,10 (0,29-1,63); $p < 0,05$]. Se concluye que el tratamiento con Cy disminuye el porcentaje de linfocitos T reguladores en ratas portadoras del linfoma L-TACB. En experimentos en curso se intentará relacionar estos resultados con el cambio en el perfil de citoquinas de Th2 a Th1 inducido por el tratamiento con Cy y su contribución al rechazo inmunológico de las metástasis.

- 407. (325) DERIVADOS ANTRAQUINÓNICOS AISLADOS DE HETEROPHYLLAE PUSTULATA HOOK F. (RUBIÁCEAS) CON ACTIVIDAD FOTODINÁMICA SOBRE CÉLULAS TUMORALES.** FERNANDEZ IVANA MARÍA (1), RUMIE VITTAR BELEN (1), COMINI LAURA (2), NÚÑEZ MONTOYA SUSANA (2), CABRERA JOSÉ LUIS (2), RIVAROLA VIVIANA ALICIA (1)

Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto (1) Departamento de Farmacia - Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba (2)

Heterophyllaea pustulata Hook. f (Rubiáceas), es una especie vegetal fototóxica conocida vulgarmente como "cegada" en referencia a la pérdida de visión que provoca en los animales que la ingieren y se exponen directamente a la luz solar. A partir de sus hojas y tallos fueron aislados derivados antraquinónicos (AQs) mayoritarios. Previamente, se demostró que éstos son agentes fotosensibilizadores tipo I y/o Tipo II, con generación de anión superóxido y/o oxígeno singlete respectivamente. Numerosas sustancias naturales con propiedades fotosensibilizantes poseen variados efectos biológicos con potencial aplicación terapéutica como agentes antivirales, antibacterianos, antifúngicos e incluso anticancerígenos. Debido a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de algunas de estas AQs, soranjidiol (1), rubiadina (2), 1-metil éter de rubiadina (3), damnacantal (4), damnacantal (5), como agentes fotosensibilizantes en la aplicación de terapia fotodinámica (TFD), sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7c3. Se analizó la viabilidad celular (MTT) y se realizaron estudios del tipo de muerte celular desencadenado en las células tratadas (Hoechst 33258). Las AQs analizadas no presentaron toxicidad a las concentraciones de 1-100 µM, en oscuridad. En cambio, en presencia de luz la viabilidad celular fue disminuida entre un 70 a un 90% por acción de estas AQs, destacándose 1, 4 y 5 por producir un 85%, 86% y 90% de muerte respectivamente. Al incubar e irradiar las células con 2 (100 µM) durante 15 min el análisis morfológico de las células despegadas realizado 24 horas post tratamiento, reveló un 70 ± 5% de núcleos con la fragmentación de la cromatina que caracteriza a la apoptosis. En las mismas condiciones experimentales 1 indujo un 60 ± 3% de núcleos apoptóticos. En base a estos resultados podemos concluir que las AQs naturales podrían ser posibles candidatos para ser utilizados en TFD contra el cáncer.

408. (462) CELULAS DENDRÍTICAS HUMANAS CARGADAS CON CELULAS DE MELANOMA APOPTÓTICAS EFECTUANDO EFICIENTEMENTE PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS A LINFOCITOS T CITOTÓXICOS. VON EUW ERIKA MARÍA, BARRIO MARÍA MARCELA, LEVY ESTRELLA MARIEL, FURMAN DAVID, BIANCHINI MICHELE, MORDOH JOSÉ

Fundación Instituto Leloir Centro de Investigaciones Oncológicas FUCA

Resultados previos de nuestro laboratorio en melanoma murino B16 demostraron que la vacunación con células dendríticas (CDs) cargadas con células tumorales (CT) apoptóticas induce protección duradera contra un desafío con CT vivas. En el presente trabajo in vitro, utilizando CDs inmaduras humanas y una mezcla de líneas celulares de melanoma humano apoptóticas (APO), analizamos la fagocitosis, maduración y presentación antigénica. A partir de monocitos de sangre periférica de donores sanos se obtuvieron CDs inmaduras (CD1a+/CD11c+/CD14-) incubando con IL-4 (50 ng/ml) y GM-CSF (800 UI/ml). La apoptosis de las CT fue inducida por radiación gama (70Gy), observándose por FACS 40 ± 10% Anexina V-FITC+ y 12 ± 4.5% Anexina V-FITC+ Ioduro de Propidio+. Tras cocultivar CDs y APO marcadas previamente con PKH26 y PKH6, analizamos la cinética de fagocitosis por FACS y microscopía electrónica. Se observó ya a las 6 hs post-incubación que las CDs inmaduras fagocitan APO, con un máximo de 55 ± 10.5% a las 48hs. La fagocitosis indujo maduración de las CDs según: i) disminución de la endocitosis de Dextrano-FITC (CDs inmaduras 81 ± 5%; CD/APO 33 ± 12%); ii) expresión aumentada de CD80, CD86, CD83, CD40, CCR7, HLA-I y HLA-II, comparable a la inducida por LPS; iii) aumento de la migración de las CD/APO en respuesta a MIP3-β (ensayo en cámara modificada de Boyden). Los cocultivos CDs HLA-A0201/APO indujeron a partir de 6hs de coincubación la secreción de INFγ (> 600 pg/ml) por un clon de linfocitos T CD8+ es-

pecífico para el péptido AAGIGILTV del antígeno MelanA/Mart-1, evidenciando presentación antigénica cruzada luego de la fagocitosis de APO.

409. (487) EFECTOS ANTITUMORALES DEL CELECOXIB INDEPENDIENTES DE LA CICLOOXIGENASA. PELUFFO GUILLERMO, PETERS MARÍA GISELLE, KLEIN SLOBODANKA MARIANA

IOAHR

Los AINEs han demostrado efectos antitumorales en modelos de cáncer experimental. Uno de sus blancos, la COX2, está sobreexpresada en varios tumores. Se demostró que la expresión de esta enzima no es un requisito indispensable para los efectos antitumorales de los AINEs. Las líneas mamarias murinas LM3 y LMM3 difieren en la expresión de COX2. LMM3 tiene baja expresión, mientras es apenas detectable por WB en LM3. El tratamiento de ratones portadores de tumores de ambas líneas resultó en una disminución del desarrollo tumoral y metastásico. In vitro, el celecoxib (Cxb) redujo la viabilidad de las células LM3 y LMM3 en 56 y 51%. El tratamiento con el derivado de Cxb, dimetilcelecoxib (DMC), sin actividad inhibitoria de COX2, redujo la viabilidad en ambas líneas celulares (22 y 21% para LM3 y LMM3). Estos resultados indican que el celecoxib actuaría sobre otro/s blanco/s. Se estudió el efecto de Cxb y DMC sobre la sobrevida y la apoptosis. Se analizó AKT, promotor de sobrevida celular, determinándose que ambas drogas (50µM) inhiben la fosforilación de AKT aproximadamente un 60%. En concordancia con la reducción de la viabilidad, Cxb incrementó 2 veces los niveles de pp38, regulada negativamente por AKT. DMC incrementó pp38 3,5 veces. Dados los niveles reducidos de pAKT, estudiamos otro blanco río debajo, NFκB, implicado en la evasión de la apoptosis. Determinamos que tanto Cxb como DMC (50 µM) reducen la actividad de NFκB (54 y 52%). Los niveles de pJNK fueron reducidos con ambas drogas. A pesar de la reducción del número de metastasis, el tratamiento con ambas drogas de las células LM3 y LMM3 incrementó 3 veces la actividad de MMP9. No obstante, se redujo su capacidad migratoria, sugiriendo que sería éste el mecanismo alterado por Cxb y DMC en cuanto a su efecto antimetastásico. Proponemos que Cxb y DMC inducen una reducción de la progresión de estos tumores de mama murinos de manera independiente de COX2, modulando las vías de señalización de AKT, p38, NFκB y JNK.

410. (496) EXPRESION DE IL-12 E IL-10 EN LA ACTIVACION DE CELULAS DENDRITICAS CARGADAS CON CELULAS APOPTÓTICAS DEL MELANOMA B16. EFECTO PROTECTOR IN VIVO. DODES TRAIAN MARTIN (1), CARDILLO SABRINA (1), POLLAK CORA (1), MORDOH JOSE (1), WAINSTOK ROSA (2)

Instituto Leloir (1) Depto Química Biológica, FCEN, UBA (2)

Previamente demostramos en ratones C57/BL6 que la vacunación con células dendríticas (CD) cocultivadas con células apoptóticas (Apo) de melanoma murino B16 produce 80% de protección al desafío con melanoma B16. Para analizar la influencia que ejercen determinadas citoquinas en dicha protección, estudiamos temporalmente la secreción de IL-12 e IL-10 co-activando las CD-Apo con IFN-gamma y LPS o BCG. Las citoquinas liberadas fueron determinadas por ELISA, y las intracelulares por citometría de flujo. El grupo CD-Apo + IFN gamma + LPS demostró la máxima producción de IL-12 en las primeras 6 horas de co-incubación (Tabla adjunta). Después de 24 horas de co-cultivo, las CD no presentaron reserva intracelular de IL-10 e IL-12 con ninguno de los tratamientos realizados. A pesar de diferencias notorias en los niveles de IL-12 e IL-10, no se observaron diferencias significativas en la protección cuando se vacunaron grupos de 10 ratones C57/BL6 con: CD-Apo + IFN gamma + LPS o CD-Apo + IFN gamma + BCG respecto a los vacunados con CD-Apo solamente. Se evaluó la aparición de tumores hasta las 24 semanas, determinándose una protección de aproximadamente 70% en todos los grupos. La velocidad de crecimiento de los tu-

mores desarrollados en animales no vacunados (100 %) y de aquellos (20-30 %) desarrollados post-vacunación se determinó mediante pulsos de bromodeoxiuridina inyectada intraperitonealmente. Se concluye que la producción por las CD-Apo de IL-12 ó IL-10 no afecta la protección lograda.

Secreción de IL-10 e IL-12 a distintos intervalos de tiempo

Tratamiento/ Tiempo	IL-12 (CD-APO + INF +LPS)	IL-10 (CD-APO + INF + LPS)	IL-12 / IL-10 (CD-APO)
0 - 6 hs	621 ± 138 pg /ml	38.9 ± 12.2 pg / ml	No Detectable
6 - 12 hs	163 ± 15 pg / ml	38.0 ± 11.4 pg / ml	No Detectable
12 - 24 hs	No Detectable	No Detectable	No Detectable

411. (604) ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA RESPUESTA AL FACTOR INHIBITORIO DE LEUCEMIAS EN LA LÍNEA MAMARIA NORMAL HC11 Y EN LAS LINEAS DERIVADAS DEL TUMOR MAMARIO MURINO M38. KRASNAPOLSKI MARTIN ALEJANDRO, QUAGLINO ANA, ROMORINI LEONARDO, KORDON EDITH, BAL DE KIER JOFFE ELISA

Area Investigación. Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" LEGMA. IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

A partir del adenocarcinoma mamario murino M38 formado por células lumbales y mioepiteliales obtuvimos las líneas LM38-LP (mixta), LM38-HP (epitelioide) y LM38-D2 (mioepitelial). Las dos últimas presentan menor tasa de crecimiento y capacidad metastásica que el tumor parental, mostrando la importancia de las interacciones celulares en su comportamiento. LIF, citoquina que activa JAK/STAT y puede también a ERK, induce apoptosis del epitelio mamario en la post-lactancia. Fenómenos asociados a esta involución podrían favorecer la invasividad tumoral y se ha visto LIF y su receptor (LIFRb), y/o la activación constitutiva de Stat3 en tumores, cultivos primarios y varias líneas de tumores de mama, sugiriendo un rol de esta vía en la progresión tumoral. Nuestro objetivo fue evaluar los niveles de expresión de los ARNm de LIF y LIFRb y estudiar los efectos de LIF sobre la activación de STAT3 y ERK y sobre la proliferación en la línea mamaria normal HC11 y en las líneas derivadas del tumor M38. Por RT-PCR observamos que la línea LM38-LP expresa altos niveles del ARNm de LIF y de LIFRb, LM38-HP expresa LIF pero no su receptor y LM38-D2 muestra bajos niveles de ambas moléculas. Por Western blot estudiamos el efecto del LIF (80ng/ml) sobre la activación de Stat3 y ERK1/2 (0-15min). En HC11, LM38-LP y LM38-D2 se indujo la fosforilación de Stat3 y ERK a los 5 min, mientras que LM38-HP, que no expresa LIFRb, no mostró respuesta. Por último evaluamos el efecto de 48h de tratamiento con LIF (1, 5, 20 y 80ng/ml) sobre la viabilidad celular por MTS. El LIF indujo una disminución del 20% en el número de células en las líneas HC11, LM38-LP y LM38-D2. La línea LM38-HP no se vio afectada. Podemos concluir que las líneas derivadas del tumor M38 son un modelo para estudiar el sistema LIF/LIFRb dado que la presencia de células mioepiteliales podría estar asociada a la respuesta al LIF favoreciendo un loop autocrino que podría influir en su capacidad invasiva.

REPRODUCCIÓN V

412. (89) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A ESTRÓGENOS AMBIENTALES ALTERA EL DESARROLLO UTERINO EN LA RATA Y DISMINUYE SU FERTILIDAD. VARAYOUD JORGELINA, RAMOS JORGE G., BOSQUIAZZO VERÓNICA L., MUÑOZ-DE-TORO MÓNICA, LUQUE ENRIQUE H

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Los primeros días de vida postnatal son críticos para el normal desarrollo del útero y son considerados de alta sensibilidad a la exposición de estrógenos ambientales. El gen homeótico Hoxa-10 es esencial tanto para el desarrollo morfogenético del útero como para la regulación del proceso de implantación. Nos propusimos evaluar si la exposición neonatal a los xenoestrógenos bisfenol A (BPA) y dietilstilbestrol (DES), afecta la expresión de Hoxa-10 y altera la fertilidad de ratas hembras adultas. Crías de rata (Wistar) recibieron vía sc aceite de maíz (control), DES (0.2 mg/kg), BPA0.05 (0.05 mg/kg) o BPA20 (20 mg/kg), desde el día posterior al nacimiento (DPN1) hasta el DPN7. En el DPN8 se determinó en el útero la expresión del ARNm de Hoxa-10 por RT-PCR en tiempo real. En DPN8 otro grupo de hembras tratadas fueron sometidas a un test de fertilidad empleando machos de fertilidad comprobada. Se determinó: porcentaje de animales preñados, número de cuerpos lúteos (CLs), sitios de implantación y de reabsorción. En DPN8 las hembras tratadas con ambas dosis de BPA y DES presentaron una disminución en la expresión uterina del ARNm de Hoxa-10 ($p < .0.05$). Los resultados del test de fertilidad indicaron que el porcentaje de animales preñados y el número de CLs/rata ($X=12$) no fue diferente entre los grupos. Las hembras expuestas a xenoestrógenos tuvieron una disminución significativa en el número de sitios de implantación (BPA0.05: 9.9, BPA20: 7.2 y DES: 6.5 versus control: 12.4; $p < .0.05$). Las hembras expuestas a BPA0.05 además presentaron un mayor número de sitios de reabsorción (pérdidas post-implantación, $p < .0.05$). Los resultados demuestran que la desregulación en la expresión de Hoxa-10 en respuesta a la exposición neonatal a DES y BPA es un evento crítico durante el desarrollo morfogenético y sugieren que se traduce en alteraciones reproductivas durante la vida adulta.

413. (100) CAMBIOS ORGANIZACIONALES INDUCIDOS POR PERTURBADORES ENDOCRINOS: ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL GEN DEL VEGF POR EXPOSICIÓN NEONATAL A BISFENOL A Y DIETILSTILBESTROL. BOSQUIAZZO VERÓNICA L, RAMOS JORGE G, VARAYOUD JORGELINA, MUÑOZ-DE-TORO MÓNICA, LUQUE ENRIQUE H

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

En trabajos previos demostramos que la exposición neonatal a xenoestrógenos altera la respuesta proliferativa hormonodependiente del endotelio uterino. Postulamos que el mecanismo que media esta perturbación es una alteración en el control transcripcional del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). En este trabajo estudiamos la influencia de la exposición neonatal a BPA y DES sobre la regulación de la expresión del gen del VEGF en el útero de la rata adulta, usando un modelo que imita los cambios hormonales que ocurren en el período pre-implantatorio. Ratas hembras (Wistar) se inyectaron sc con BPA (50 µg/kg y 20 µg/kg), DES (0.2 µg/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 17 β-estradiol, en dosis que simulan el período pre-implantatorio. Los animales se sacrificaron 20hs después de la última inyección. Se diseccionó el cuerno uterino y se extrajo el ARN total. Se evaluó por RT-PCR en tiempo real la expresión del ARNm del VEGF y de diferentes coreguladores de la respuesta esteroidea: corepresor de receptores nucleares (NCoR), represor de la actividad del receptor de estrógeno (REA), mediador del silenciamiento del receptor de ácido retinoico y tiroideos (SMRT) y coactivadores de receptores esteroides (SRC-1 y SRC-3). Todos los grupos experimentales presentaron una disminución significativa en la expresión del ARNm del VEGF ($p < .0.05$). Las hembras expuestas a DES y BPA (20µg/kg) mostraron un aumento de la expresión del ARNm de SMRT ($p < .0.05$), mientras que las tratadas con BPA en la dosis menor (50µg/kg) presentaron una reducción del ARNm de SRC-3 ($p < .0.05$). Los resultados demuestran que la exposición neonatal a DES y BPA altera la transcripción del VEGF y que este efecto estaría mediado por la modula-

ción de la expresión de factores reguladores de la respuesta esteroidea.

414. (153) LA EXPOSICIÓN IN UTERO A BISFENOL A AUMENTA LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES DE ANGIOGÉNESIS EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE LA RATA. DURANDO MILENA, PERDOMO VIRGINIA, RAMOS JORGE G, LUQUE ENRIQUE H, MUÑOZ DE TORO MÓNICA

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), Fac de Bioquímica y Cs Biológicas, UNL

Previamente demostramos que la exposición in utero al xenoestrógeno BPA provoca lesiones mamarias preneoplásicas caracterizadas por un aumento en la infiltración de mastocitos y de lesiones neoplásicas por una mayor sensibilidad a carcinógenos químicos. La angiogénesis es un proceso clave de la carcinogénesis. Los mastocitos y sus mediadores (ej: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular - VEGF) están postulados como promotores de angiogénesis. Además, se sugiere que los estrógenos estimularían la expresión del VEGF. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la exposición in útero al xenoestrógeno BPA sobre la expresión del VEGF en glándula mamaria (GM) de ratas peripuberales y adultas. Ratas Wistar recibieron desde el día 8 de gestación y hasta el final: vehículo (control) o BPA (25 µg/kg/día). Las crías hembras se sacrificaron a los 50 y 110 días (d) de edad. La proteína del VEGF se detectó en el parénquima mamario por inmunohistoquímica y se cuantificó su expresión por análisis digital de imágenes calculando el área porcentual ocupada por las células VEGF(+) respecto del área parenquimatosa total. El tratamiento in utero con BPA indujo un aumento en el área VEGF(+), tanto a los 50d (control: $2,16 \pm 0,49$; BPA: $12,10 \pm 4,60$; $p < 0,05$) como a los 110d (control: $3,29 \pm 1,20$; BPA: $7,00 \pm 1,06$; $p < 0,05$). Nuestros resultados demuestran que el desarrollo de lesiones mamarias preneoplásicas promovido por BPA se acompaña por un incremento, no sólo en la infiltración de mastocitos, sino también en la expresión del VEGF en el parénquima de la GM. La desregulación de factores pro-angiogénicos inducida por exposición temprana a perturbadores endocrinos (como los xenoestrógenos) favorecerían el desarrollo de lesiones preneoplásicas e incrementarían la sensibilidad de la GM a carcinógenos químicos durante la vida adulta.

415. (258) CÉLULAS DE SERTOLI EXPUESTAS A BISFENOL A INCREMENTAN SUS NIVELES DE GLUTATIÓN POR SÍNTESIS DE NOVO Y RECICLADO. GUALTIERI ARIEL FELIX, SCHTEINGART HELENA F

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

El bisfenol A (BPA) es un monómero utilizado en la producción de plásticos. Se ha reportado que presenta efectos adversos sobre el sistema reproductor. El glutatión (GSH) participa en la protección celular contra el estrés oxidativo y en la detoxificación de xenobióticos. Se produce por síntesis de novo, donde el paso limitante está catalizado por la enzima Glutamato Cisteina Ligasa (GCL) y por reciclado de GSH oxidado, catalizado por la Glutatión Reductasa (GR). La GCL está compuesta por una subunidad catalítica (GCLC) y otra regulatoria (GCLM). El objetivo de este trabajo fue analizar si el BPA modifica los niveles de GSH y de proteína y ARNm de GR y GCL. Células de Sertoli provenientes de ratas de 20 días de edad fueron tratadas con BPA (10 y 50 µM) por 1, 3, 6 y 24h. La citotoxicidad fue determinada por el método de MTS. El contenido de GSH se midió espectrofotométricamente. Los niveles de proteína y ARNm de GR y GCL fueron analizados por Western y Northern Blot. Los datos se expresan como media±DS, n=3, * $p < 0.05$ vs basal. Los tratamientos con BPA 10 y 50 µM no modificaron la viabilidad celular. Tratamientos con BPA por 3 y 24 h indujeron aumentos del GSH intracelular (3h-BPA 10 µM: $186 \pm 37^*$; 50 µM: $246 \pm 50^*$. 24h-BPA 10 µM: $174 \pm 14^*$; 50 µM: $239 \pm 50^*$ pmol GSH/µg ADN). El análisis por Western Blot de GR mostró un incremento luego de 1h (1h-BPA 10 µM: 122 ± 4 ; 50 µM: $176 \pm 41^*$ % de basal). Los niveles de pro-

teína GCLC aumentaron luego de 1 hora (1h-BPA 10 µM: 163 ± 23 ; 50µM: $207 \pm 58^*$ % basal), mientras que para GCLM los estímulos se observaron a tiempos más largos (24h-BPA 10 µM: 114 ± 6 ; 50µM: $125 \pm 6^*$ % de basal). El análisis por Northern Blot de GR mostró un incremento significativo del ARNm luego de 6 y 24h de tratamiento. Estos resultados sugieren que el GSH participa en la defensa contra el BPA en células de Sertoli, aumentando sus niveles por síntesis de novo y reciclado. Este mecanismo podría intervenir en la protección de la progenie germinal.

416. (262) CAMBIOS EN LA DINÁMICA Y EN LA ATRESIA FOLICULAR OVÁRICA POR UN INHIBIDOR DE ANGIOPOYETINAS (AC ANTI ANPT-1). PARBORELL FERNANDA, ABRAMOVICH DALHIA, RODRIGUEZ CELÍN ALEJANDRA, TESONE MARTA

IByME-CONICET

En el adulto, la vasculatura ovárica es uno de los pocos órganos donde ocurre el desarrollo, mantenimiento y regresión de vasos sanguíneos. El adecuado aporte vascular podría ser limitante en la selección y maduración del folículo dominante. Mientras el VEGF es el principal mediador en la angiogénesis; la maduración y la diferenciación de la red vascular, requerirían de la acción coordinada de factores como las angiopoyetinas (ANPT-1 y -2), que actúan vía receptor tirosin kinasa (Tie-2). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el rol de la ANPT-1 sobre la dinámica folicular, la apoptosis ovárica y la expresión de proteínas pro o antiapoptóticas. Ratas prepúberes tratadas con eCG fueron inyectadas con un Ac anti ANPT-1 (1-10 ng/ovario) en un ovario y el contralateral con IgG (C). Se realizó un recuento de folículos a las 12, 24 y 48 hs. post inyección observándose un aumento significativo en el número de folículos atrésicos (C: $24,5 \pm 2,4$; Ac anti ANPT-1: $40,7 \pm 4,8$, $p < 0,05$) y una disminución significativa en el número de folículos antrales (C: $62,4 \pm 2,4$; Ac anti ANPT-1: $46 \pm 4,7$, $p < 0,05$) 48 hs luego del tratamiento con Ac anti ANPT-1 (10ng/ovario). Con la dosis de 2 ng/ovario, no se observaron cambios en ningún estadio. Mediante TUNEL, se observó un aumento significativo en el número de células apoptóticas a las 48 hs. de inyección del Ac anti ANPT-1 (10ng/ovario) (C: $2,29 \pm 0,36$; Ac anti ANPT-1: $6,08 \pm 0,84$ células apoptóticas/campo, $p < 0,05$). Por western blot se observó que la inyección de Ac anti ANPT-1 (10 ng/ovario, 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 en folículos antrales. Conclusión: La inhibición de la actividad de ANPT-1 produciría un aumento en la apoptosis ovárica llevando un mayor número de folículos hacia la atresia causado por la disminución de la vascularización o por un efecto parácrino mediado por su receptor en células de la teca sobre las células de la granulosa.

417. (278) EFECTO DE BISFENOL A SOBRE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A XENOESTRÓGENOS EN YACARÉ OVERO (CAIMAN LATIROSTRIS). GONZÁLEZ MARIANELA, REY FLORENCIA, ZAYAS MARCELO, LUQUE ENRIQUE H., MUÑOZ-DE-TORO MÓNICA

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

Los contaminantes ambientales denominados xenoestrógenos perturban al sistema endocrino imitando la acción de estrógenos endógenos. El bisfenol A (BPA) es un xenoestrógeno utilizado en la industria del plástico. Para detectar la presencia de contaminantes se utilizan especies centinelas que presenten biomarcadores adecuados. El yacaré overo es una especie con características apropiadas para centinela. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la exposición pre y/o postnatal a BPA en hembras de 50 días. Todos los huevos se incubaron a 30 °C (100% hembras), en etapa 20 de desarrollo embrionario un grupo recibió BPA 1.4ppm y otro vehículo. Tanto controles como tratadas, al mes de edad, se dividieron en dos grupos, uno recibió 2 inyecciones de BPA 140ppm espaciadas por 7 días y el otro vehículo. Otro grupo, control positivo, recibió dos dosis de E2 (1 µg/g) postnatal. Sie-

te días después de la última inyección todos los yacarés se sacrificaron. Evaluamos síntesis y secreción de Vtg por inmunohistoquímica, Western blot y ELISA. En oviducto determinamos altura del epitelio por análisis morfométrico y proliferación de células epiteliales por incorporación de BrdU. El tratamiento con E2 provocó inducción de Vtg (0.7mg/ml), mientras que, en ninguno de los grupos expuestos a BPA detectamos Vtg. En las crías tratadas con E2 o con BPA observamos un aumento en la altura del epitelio oviductal (32.8µm en el grupo de E2 y 31.1 µm en los tratados con BPA vs 13.7 µm en los controles, $p < 0.05$) y una marcada desorganización tisular, mayor aún en el grupo tratado con BPA in ovo y postnatal (56µm). Estos cambios se asociaron a un aumento significativo en la proliferación. Concluimos que, aunque BPA no provocó inducción de Vtg en las dosis aplicadas, afectó la morfología del oviducto demostrando la alta sensibilidad de este órgano frente a una contaminación por xenoestrógenos.

418. (279) ALTERACIONES EN LA HISTOARQUITECTURA TESTICULAR DE YACARÉS Y EN LOS NIVELES DE TESTOSTERONA POR EXPOSICIÓN EMBRIONARIA A AGROQUÍMICOS. REY FLORENCIA, GONZÁLEZ MARIANELA, ZAYAS MARCELO, STOKER CORA, LUQUE ENRIQUE H., MUÑOZ-DE-TORO MÓNICA

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

La contaminación ambiental por compuestos químicos con actividad estrogénica (xenoestrógenos) altera la salud del ecosistema y la conservación de las especies. El yacaré overo posee características fisiológicas y ecológicas que favorecen su elección como centinela de contaminación por xenoestrógenos. Huevos de yacaré incubados a 33 °C nacen 100% machos pero si se topican con 17β-estradiol (E2) en estadio 20 de desarrollo embrionario nacen hembras. Endosulfán (END) y atrazina (ATZ) son agroquímicos de uso difundido, con potencial actividad estrogénica y riesgo para la salud. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la exposición in ovo a END y ATZ en gónadas y perfiles hormonales de yacarés machos. Huevos de yacaré se incubaron a 33 °C y en estadio embrionario 20 se topicaron con END (0.02, 2 y 20ppm), ATZ (0.2ppm), E2 (control positivo) o vehículo. A diferencia de lo observado para E2, END y ATZ no revirtieron el sexo. A los 10 días de edad estudiamos cortes histológicos de testículos coloreados con Picrosirius-hematoxilina, inmunomarcados con desmina (para identificar células mioideas) o BrdU (para evaluar actividad proliferativa). En animales tratados con END 0.02, 20ppm y ATZ 0.2ppm se observó un aumento del perímetro de los túbulos seminíferos (382, 427, 434µm respectivamente vs 303µm, $p < 0.05$) y una disminución en la expresión de desmina (28%, 35%, 19% en END 0.02, 2 y 20ppm y 35% en ATZ vs 54% en controles, $p < 0.05$). La actividad proliferativa de células intratubulares no se afectó por el tratamiento. Estos resultados sugieren que el incremento del perímetro tubular se deben a una alteración en la organización peritubular y no a un aumento en el número de células intratubulares. En machos expuestos in ovo a END 20ppm observamos, además, una disminución en los niveles de testosterona (96 vs 149pg/ml, $p < 0.05$) que indicaría alteraciones en la esteroidogénesis. Sugerimos que las perturbaciones observadas podrían afectar la aptitud reproductiva de yacares macho.

419. (733) SCREENING DE ANEUPLOIDÍAS POR PCR FLUORESCENTE. PRIMOST IVANA, MINCMAN JUDITH, GARCÍA ESTANGA PAOLA, COCO IRMA, NEUSPILLER FERNANDO, NEUSPILLER NICOLÁS, COCO ROBERTO

Fecunditas

La aneuploidía es la anomalía cromosómica más frecuente en humanos, ocurriendo en no menos del 5% de los embarazos clínicos. Es causa de no-establecimiento de embarazo, abortos y de nacidos malformados. La mayoría son de origen materno, inherente a la edad, y una minoría paterna no asociada a la edad sino a la mala calidad espermática. El objetivo fue montar el screening

de las aneuploidías más frecuentes por PCRs fluorescentes, utilizando microsatélites marcados de los cromosomas 13, 18, 21, 22, X e Y, con el propósito de aplicarlo en parejas con riesgo aumentado de aneuploidías, y comparar los resultados con los estudios cromosómicos convencionales. Las señales fluorescentes de las muestras se analizaron simultáneamente con los alelos parentales. Se estudiaron 23 líquidos amnióticos, 7 vellosidades coriónicas, 19 productos de abortos espontáneos y 8 mortinatos. En los amniocitos, el estudio cromosómico evidenció 21 estudios normales y dos anormales. El screening concordó con todos ellos, menos uno, en que la muestra estaba contaminada con sangre. Las vellosidades fueron todas cromosómicamente normales y el screening concordó en todas. Una resultó parcialmente informativa. El cariotipo en los abortos fue factible en 6 de ellos y concordaron con el screening. Los restantes por screening resultaron normales para los cromosomas estudiados, excepto uno con trisomía 18. El cariotipo de los mortinatos, resultó normal en dos y anormal en 6, concordando el screening con los cariotipos. La gran concordancia del screening con el cariotipo, la posibilidad de enumerar a todo el complemento cromosómico, obtener resultado en el día, conocer el origen de la aneuploidía y además identificar isodisomías y/o disomías uniparentales, de relevancia para cromosomas con imprinting documentado, son las principales ventajas de su uso en el diagnóstico de aneuploidías cuando estas se sospechan prenatalmente.

MESA INTERDISCIPLINARIA

420. (150) TRANSFERENCIA ACTIVA DE MICA DESDE LA SUPERFICIE DE CÉLULAS TUMORALES A LA SUPERFICIE DE LINFOCITOS T. DOMAICA CAROLINA INES, FUERTES MERCEDES BEATRIZ, GIRART MARIA VICTORIA, ROSSI LUCAS EZEQUIEL, ZWIRNER NORBERTO WALTER

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas y Dpto. de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA

NKG2D es un receptor de células NK y linfocitos T (LT) CD8αβ y γδ que induce la citotoxicidad y secreción de IFNγ. Sus ligandos (NKG2DL) son las proteínas de membrana MICA/B y las moléculas unidas a GPI ULBPs1-3. MICA se expresa en superficie (MICAsup) de algunos tumores y en el citoplasma de LT activados (LTact) pero no en reposo. Objetivo: investigar la expresión de NKG2DLsup en LT luego del contacto con tumores que expresan MICAsup y su relevancia fisiológica. Se investigó por citometría de flujo y microscopía confocal la expresión de MICAsup en LTact con mitógenos, IL2 o LT Th1 y Th2, luego del cultivo con un clon del melanoma humano MEL-LES (MICAsup-) transfectado con MICA (MICAsup+) o con un clon control. Se observó un aumento de MICAsup en un 60-75% de los LTact desde los 5min a 24h de cocultivo. El fenómeno fue dependiente del contacto celular (ensayos en transwell), independiente de la interacción NKG2D-NKG2DL (no hubo bloqueo con AcMo α-NKG2D) y se observó con LT en reposo y células NK (MICA-), por lo que se debe a una transferencia de MICAsup desde la célula tumoral al LT. Además, es inducido por el LT (no se dio con LT fijados) y se observó también con el melanoma MEL-IAN pero no con Mel888 y M8. La transferencia de membrana se comprobó al cultivar LT con melanomas marcados con CFSE. El evento está limitado a NKG2DL con dominios transmembrana (no se observó pasaje de ULBPs1-3). La expresión de MICAsup en LT no los hizo susceptibles a la lisis por células NK ni reguló la secreción de IFNγ. El pool de MICAsup en el LT disminuyó a las 3h y fue nulo a las 24h post-cocultivo. El bloqueo de la endocitosis (cloroquina y citocalasina) fue capaz de sostener la expresión de MICAsup en LT por lo que MICA sería introducido en los endosomas. Conclusión: LT capturan MICAsup de algunos tumores y lo introducen en la vía exógena de procesamiento antigénico, lo que podría constituir un mecanismo de regulación de la inmunidad tumoral.

- 421. (511) LA INHIBICIÓN DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE Ca^{2+} Y CALMODULINA (CAMKII) PROTEGE DEL DAÑO IRREVERSIBLE POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.** SAID MATILDE (1), SALAS MARGARITA (1), VILA PETROFF MARTÍN (1), SAPIA LUCIANA (1), VALVERDE CARLOS (1), PORTIANSKY ENRIQUE (2), MUNDIÑA-WEILENAMNN CECILIA (1), MATTIAZZI ALICIA (1)

Centro de Investigaciones Cardiovasculares - UNLP - La Plata (1) Facultad de Ciencias Veterinarias - Cátedra de Patología - UNLP - La Plata (2)

La CaMKII participa en el acoplamiento excito-contráctil, la señalización hacia la apoptosis y el desarrollo de insuficiencia cardíaca, pero su papel en el infarto de miocardio aun no ha sido establecido. El objetivo del presente trabajo fue examinar la participación de esta quinasa en la injuria irreversible por isquemia y reperfusión (I/R). Se realizaron experimentos en corazones perfundidos de rata (tipo Langendorff) sometidos a un protocolo de isquemia global normotérmica seguida de reperfusión (45 min/120 min) y en miocitos aislados sometidos a I/R simulada (40 min anoxia/60 min reoxigenación), en ausencia y presencia de dos inhibidores específicos de CaMKII (KN-93 y AIP, 1 - 2,5 μ M). En corazones perfundidos (n=4-8) se observó un incremento en la actividad de CaMKII al inicio de la reperfusión, evidenciada por el aumento significativo ($p < 0,05$) de la fosforilación de uno de sus sustratos específicos (residuo Thr-17 de fosfolamban). La inhibición de CaMKII produjo: 1) un modesto pero significativo aumento de la recuperación de la contractilidad en la reperfusión y 2) una disminución significativa del tamaño del infarto ($30,5 \pm 3,3\%$ (I/R+KN) vs. $56,3 \pm 7,5\%$), de la liberación de lactato deshidrogenasa indicadora de necrosis, de la actividad de caspasa-3 y del número de células TUNEL positivas (estos últimos indicadores de apoptosis). En miocitos aislados, KN-93 o AIP previnieron la muerte celular provocada por I/R simulada. Resultados similares se obtuvieron por inhibir el influjo de Ca^{2+} a través del NCX, con el inhibidor específico KB-R 7943, y la función del retículo sarcoplasmático (RS), con rianodina y tapsigarguina. En contraste, la sobreexpresión de CaMKII por infección con adenovirus, disminuyó la viabilidad celular de $52 \pm 3\%$ (controles- β gal) a $26 \pm 2\%$. Estos resultados son los primeros en describir que la CaMKII integra una cascada de señales que participa en los procesos de apoptosis y necrosis de la injuria irreversible por I/R.

- 422. (618) LA INHIBICIÓN DEL FENOTIPO TUMORAL DEL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM3 INDUCIDA POR EL GLIPICANO-3 (GPC3) INVOLUCRA LAS VÍAS AKT, MAPK P38 Y WNT.** PETERS MARÍA GISELLE, STIGLIANO IVAN, PELUFFO GUILLERMO, VAZQUEZ PAULA, PURICELLI LYDIA, BAL DE KIER JOFFÉ ELISA

Area Investigación. Instituto de Oncología Angel H. Roffo

GPC3 ha sido propuesto como un regulador negativo de la proliferación de células tumorales mamarias. Previamente, demostramos que GPC3 inhibe la metástasis in vivo e induce apoptosis in vitro del tumor LM3. Estudiamos si las vías Akt, Erk, p38 y JNK están implicadas en este último efecto. Determinamos así que Akt aparece constitutivamente activa en las células control y que GPC3 induce una disminución de entre 4 y 5 veces de su fosforilación. Por otro lado, GPC3 no moduló las vías Erk ni NFkB. Mientras que las células LM3-vector mantenían inactiva a la vía pro-apoptótica p38, la expresión de GPC3 cuadruplicó los niveles de fosfo-p38. La transfección con una mutante dominante negativa de esta MAPK o el tratamiento con su inhibidor SB202190 revirtieron el aumento de la muerte inducida por GPC3. JNK, molécula central de la vía no-canónica de Wnt asociada con la regulación de la apoptosis y el citoesqueleto, apareció 4,5 veces más fosforilada en las células LM3-GPC3 aunque sin activación de AP-1. Más aún, el tratamiento con el inhibidor de JNK SP600125 no inhibió la apoptosis inducida por GPC3, pero indujo la reestructuración del citoesqueleto de actina (reduciendo las fibras de stress y promoviendo una localización cortical de la F-

actina). También estudiamos la vía canónica de Wnt, que resultó inhibida por GPC3, hallándose 8 veces menos B-Catenina citoplasmática señalizante. Mediante microscopía confocal de fluorescencia e inmunoprecipitación observamos que GPC3 indujo una relocalización de B-Catenina, pasando del citoplasma a la membrana plasmática en asociación con E-Cadherina. Relacionado con la modulación de la vía Wnt, GPC3 indujo mayor adhesión célula-célula y un aumento de la matriz extracelular de colágeno tipo I. Nuestros resultados sugieren que GPC3 modula la apoptosis a través de las vías p38 y Akt. Asimismo, GPC3 regula la morfología celular, adhesión y formación de la matriz probablemente a través de la vía Wnt.

- 423. (209) INSULINA INDUCE LA TRASLOCACIÓN DE P-AKT2 Y LA ACTIVACIÓN DE NNOS EN MITOCONDRIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO: EL ÓXIDO NÍTRICO DIRIGE EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA HACIA LA OXIDACIÓN O HACIA LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO.** FINOCCHIETTO(1,2) PAOLA, BARREIRO(1) FERNANDO, HOLOD(3) SILVIA, PERALTA(1,2) JORGE, FRANCO(1) MARIA CLARA, CONVERSO(1) DANIELA, CARRERAS(1,3) MARIA CECILIA, PODEROSO(1,2) JUAN JOSE

Laboratorio Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas JSM (1), Departamento de Medicina (2), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (3). Universidad de Buenos Aires

Insulina-PI3-K activa Akt. La Oxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS) traslocada a la mitocondria (mtNOS) presenta un dominio fosforilable por Akt en serina 1412. Objetivo: analizar efectos de insulina y Akt sobre la mtNOS y el metabolismo de la glucosa en músculo esquelético de rata. Con este propósito ratas Wistar (200-250g) fueron inoculadas con 0.1U/Kg insulina largina o ClNa 0.9% s.c y se extrajeron los músculos extensoris y soleus a las 3, 12 y 24 h. Las mitocondrias fueron aisladas por centrifugación diferencial y la actividad de mtNOS se determinó por H3-L-Arg. La expresión y/o actividad mitocondriales de nNOS, p-Akt, y GSK-3 α/β se analizaron por Western Blot y por citometría de flujo. La purificación de nNOS se realizó con Tag His6 en N- terminal sobreexpresada en Escherichia Coli y purificada con Kit HisLink 96 Protein Purification System. La fosforilación de mtNOS se estudió en mitocondrias incubadas con insulina, Akt-2 y 32P-ATP γ . Post electroporación e inoculación con siRNA nNOS o Akt2 in vivo, se extrajo el músculo gastrocnemius, se midió la entrada de glucosa con deoxy-D-glucose,2 [1,23H(N)], síntesis de glucógeno con glucose, D-[14C(U)] y utilización de glucosa con glucose D-[5-3H(N)]. Resultados: a) AKT fosforilado trasloca a la mitocondria, b) Insulina-pAkt incrementó 5 veces la actividad de mtNOS por fosforilación, c) siARN nNOS disminuyó un tercio la incorporación de C14-glucose a glucógeno incrementando 3 veces la oxidación a C14O2 y 3H2O, d) siRNA Akt2 redujo la actividad de mtNOS y la síntesis de glucógeno un 70%. Conclusión: insulina vía Akt actúa sobre el metabolismo de la glucosa por su fosforilación y traslocación a la mitocondria. e) p-Akt fosforila mtNOS aumentando su actividad, controlando la transferencia de electrones y promoviendo las vías biosintéticas.

- 424. (297) ROL DEL COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES RAC3 EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS.** (1) COLO GEORGINA PAMELA, (1) RUBIO MARÍA FERNANDA, (1) ALVARADO CECILIA VIVIANA, (1) NOJEK IGNACIO MARTÍN, (1) ECHEVERRÍA PABLO CHRISTIAN, (2) MARIO D. GALIGNANA, (1) NAHMOD VICTOR ELÍAS, (1) COSTAS MONICA ALEJANDRA

(1) Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, (2) Fundación Instituto Leloir

Los coactivadores de receptores nucleares de la familia p160 se encuentran normalmente en cantidades limitantes en células normales, pero sobreexpresados en ciertos tumores. Demostramos

previamente que RAC3 es además un coactivador del factor de transcripción anti-apoptótico NF- κ B, y su sobreexpresión disminuye la sensibilidad a apoptosis. En este trabajo, estudiamos los efectos de la sobreexpresión y/o disminución de RAC3 en líneas celulares no tumorales HEK293 y leucémicas K562 (naturalmente resistentes a TRAIL) bajo estímulos que inducen apoptosis vía mitocondrial (H_2O_2 1-2 mM) y de membrana (TRAIL 25ng/ml) respectivamente. Observamos que HEK293 presenta niveles indetectables y K562 tiene niveles altos del coactivador (Western blot). Aunque la sobreexpresión por transfección de RAC3 en HEK293 disminuyó en un $80 \pm 3\%$ la sensibilidad a apoptosis (Kit Biocolor), su disminución mediante siRNA en clones estables de K562 la aumentó en un $60 \pm 2\%$. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de genes anti- y proapoptóticos de la flia.Bcl-2 (Western blot) en ambas líneas ante altos o bajos niveles de RAC3, aunque su sobreexpresión por transfección en HEK293 disminuyó la activación de Caspasas-9 y 3 en un 41% y 54% respectivamente y la disminución de coactivador por siRNA en K562 aumentó la activación de Caspasas-8, 9 y 3 en 63%, 32% y 15% (Western blot) sensibilizándolas al estímulo de TRAIL. MAPK y AKT participan en cascadas de señales que controlan la proliferación y apoptosis celular. Observamos un aumento en la actividad de AKT y p38 (125% y 37% respecto de no transfectadas) y una disminución del 44% de ERK en células HEK293 que sobreexpresan RAC3 (Western blot). RAC3 contribuye al desarrollo tumoral, incluyendo células leucémicas, protegiendo de apoptosis inducida por distintas rutas y podría constituir un posible blanco de ataque para el tratamiento de tumores.

INMUNOLOGÍA VII

425. (489) EXPRESIÓN DE TRANSGLUTAMINASA 2 EN CÉLULAS EPITELIALES DE INTESTINO. BAYARDO MARIELA, ALLEGRETTI YESSICA, RUMBO MARTIN, CHIRDO FERNANDO

LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

La enzima Transglutaminasa 2 (TG2) participa en diversos procesos biológicos tales como reparación del daño tisular, señalización, diferenciación y apoptosis. Se ha descrito que varios estímulos proinflamatorios y algunas citoquinas modulan la expresión de TG2, entre ellas γ IFN, TGB β y TNF α son fuertes inductores de TG2. La información disponible en bibliografía muestra una elevada variabilidad en los efectos observados, dependiendo en gran medida del linaje celular estudiado. TG2 es fuertemente inducida en intestino delgado en la lesión de la mucosa intestinal observada en pacientes celíacos activos y está involucrada en el mecanismo de daño. Sin embargo, los inductores de TG2 en la mucosa intestinal aún no han sido caracterizados. Se estudió la expresión de TG2 en células de línea de epitelio intestinal humano (Caco-2 y HT-29). Estas células, comúnmente usadas como modelo de enterocitos, fueron incubadas con, TNF α , γ IFN; TGF β , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-15 por distintos tiempos. El RNA total fue extraído y analizado el nivel mRNA de TG2 mediante PCR cuantitativa, amplificando un fragmento de 414pb con primers diseñados sobre la secuencia descrita por nuestro laboratorio (Genbank AY675221). En ambas líneas celulares, la incubación por 24 h con γ IFN produjo un incremento de 3 a 4 veces en los niveles de TG2. No se observaron incrementos significativos mediados por las otras citoquinas. En el análisis por westernblot, usando anticuerpos monoclonales específicos producidos en nuestro laboratorio, se observó una banda correspondiente a la proteína nativa sin degradación, aunque no se evidenciaron cambios relevantes a nivel de la concentración de TG2 para los distintos tratamientos. En conclusión, del panel de estímulos analizados, encontramos que la expresión de TG2 fue incrementada en células Caco-2 y HT-29 estimuladas con γ IFN, siendo éste probablemente el principal inductor de TG2 en la mucosa intestinal en la lesión celíaca activa donde dicha citoquina es abundante.

426. (626) SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INNATA EN EPITELIO INTESTINAL EMPLEANDO UN SISTEMA REPORTERO CCL20-LUCIFERASA. SERRADELL MARÍA DE LOS ANGELES (1, 2), ROMANIN DAVID (1), GARROTE GRACIELA L (1, 2), DE ANTONI GRACIELA L (1, 2), RUMBO MARTÍN (3)

Cátedra de Microbiología- Ciencias Exactas - UNLP (1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)(2) Cátedra de Inmunología-Ciencias Exactas-UNLP (3)

La microflora intestinal normal mantiene una interrelación compleja con el sistema inmune de mucosas, que ha sido poco caracterizada a nivel molecular. Se conocen algunos mecanismos activos de modulación de la respuesta innata en mucosas por microorganismos que ilustran la posible diversidad de vías de modulación existente. CCL20 es una quimoquina producida por células epiteliales, siendo altamente inducible en respuesta a estímulos proinflamatorios, incluyendo la señalización a través de TLR5-flagelina. El objetivo del presente trabajo es seleccionar microorganismos con capacidad de modular la respuesta inmune innata del epitelio intestinal. La selección se realizó empleando una línea celular Caco-2 transfectada en estable con una construcción reportera empleando el promotor de CCL20 humano y la luciferasa de luciérnaga (Caco-2 CCL20-Luc). Monocapas de células Caco-2 CCL20-Luc de 5 días de crecimiento se trataron durante 1h con suspensiones de diferentes lactobacilos, bifidobacterias y levaduras potencialmente probióticas. Se estimuló el sistema empleando flagelina obtenida de Salmonella enterica serovar Enteritidis (1 μ g/mL). Luego de 6 hs de incubación se analizó la actividad luciferasa sobre el lisado celular. Se observó que 3 (L plantarum, L casei y L kefir) de 11 cepas bacterianas estudiadas producen una moderada inhibición (25%), mientras que 2 (S cereviceae y K lactis) de las 3 levaduras analizadas disminuyen en un 40% la activación inducida por flagelina. La actividad moduladora detectada fue dependiente del número de microorganismos coincubados y de la viabilidad de los mismos y no correlacionó con cambios en el pH del medio observados al final de la coincubación. El sistema Caco-2 CCL20-Luc permitió seleccionar para estudios posteriores, cepas de microorganismos con capacidad de modular la respuesta innata en epitelio intestinal.

427. (223) CONTRIBUCIÓN DE TLR-2 Y FAS-L EN LA PATOGENÉISIS DE LA INFECCIÓN POR CANDIDA ALBICANS. RENNA MARIA SOL, FIGUEREDO CARLOS MAURICIO, CORREA SILVIA GRACIELA, SOTOMAYOR CLAUDIA ELENA

Inmunología- Dto Bioquímica Clínica- CIBICI (CONICET) - Facultad de Ciencias Químicas

Candida albicans es un hongo dimórfico y oportunista que crece como miembro normal de la flora oral y gastrointestinal en individuos inmunocompetentes. En las etapas tempranas del proceso infeccioso el hígado constituye una importante barrera de control eliminando levaduras de origen intestinal. En un modelo de candidiasis, reportamos la ocurrencia de apoptosis intrahepática asociada a la infección y un reclutamiento diferencial de la población linfocitaria intrahepática (LIH). Dado que C. albicans interactúa con receptores innatos como TLR-2 estudiamos, por FACS y WB, la cinética de expresión de esta molécula en LIH purificados de animales normales (N) e infectados (Ca) observándose un aumento significativo en el % de células TLR-2+ y en los niveles de expresión de esta molécula durante los 3 primeros días de la infección ($p < 0.05$). La dupla Fas/Fas-L podría participar en la marcada apoptosis observada en este modelo ya que la expresión de Fas en los hepatocitos puede ser modulada por diferentes estímulos y células linfocitarias activadas pueden expresar Fas-L. Hígados de animales N y Ca mostraron una expresión constitutiva e invariante de Fas (WB e InmunoCitoquímica). Por ensayos de WB detectamos un aumento progresivo en la expresión de Fas-L en LIH que infiltran el parénquima hepático. Co-cultivos

de LIH de animales N con *C. albicans* mostraron que la expresión de Fas-L aumenta en esta población a las 6 hs (WB). Ha sido propuesto que la expresión de Fas-L puede ser inducida vía TLR-2. Estudios in vitro de LIH y *C. albicans* revelaron una disminución en la expresión de Fas-L luego del bloqueo de la señal inducida por TLR-2 (WB). La expresión in vivo como in vitro de TLR-2 y Fas-L aumenta luego del contacto con *C. albicans* y los niveles de Fas-L pueden ser regulados por el hongo mediante señales vía TLR-2. Estos resultados sugieren que *C. albicans* a través de TLR-2 induciría la expresión de Fas-L en los LIH, lo que podría llevar a una mayor muerte hepatocelular.

428. (435) COMPONENTES GLUCÍDICOS DE ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE FASCIOLA HEPATICA INDUCEN APOPTOSIS DE EOSINÓFILOS POR UN MECANISMO DEPENDIENTE DE CASPASAS. SERRADELL MARIANELA DEL CARMEN, GUASCONI LORENA, MASIH DIANA TERESA

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. CIBICI-CONICET

El helminto *Fasciola hepatica* infecta un amplio rango de mamíferos, incluyendo al hombre. En estos hospedadores se localiza a nivel de canalículos biliares y libera durante su migración productos complejos con diversos efectos inmunomoduladores denominados antígenos de excreción-secreción (AES). En las infecciones por helmintos los eosinófilos (Eo) representan importantes células efectoras que pueden destruir larvas de estos parásitos. No obstante, estas infecciones son enfermedades crónicas, lo cual implica que los parásitos ponen en marcha estrategias de evasión logrando sobrevivir en el hospedador. Recientemente, hemos demostrado que los AES de *F. hepatica* inducen apoptosis de Eo como un mecanismo de inmunosupresión. En este trabajo investigamos mecanismos intracelulares involucrados en la apoptosis, como es la activación de caspasas y estudiamos además que tipo de componentes de los AES participarían en la inducción de la muerte celular. Eo de ratas Wistar se purificaron mediante gradiente con Percoll y la apoptosis se detectó por microscopía (May Grünwald-Giemsa y Bromuro de Etidio) y por citometría (hipodiploidismo con Ioduro de propidio). La actividad de caspasas se determinó por colorimetría y su participación en la muerte celular se evaluó mediante ensayos de inhibición. Los AES se sometieron a tratamiento térmico y a oxidación con periodato. Se observó un incremento en la activación de caspasas-3, -8 y -9 inducida por AES; en presencia del inhibidor de pancaspasa, Z-VAD-fmk, la apoptosis fue prácticamente abolida ($p < 0,001$). Cuando los AES se sometieron a oxidación de carbohidratos con periodato la apoptosis se vio disminuida correlativamente con la intensidad del tratamiento ($p < 0,005$); en tanto que el calentamiento no produjo modificaciones. Los datos demuestran que los AES de *F. hepatica* inducen apoptosis de Eo a través de la activación de caspasas y que glúcidos presentes en estos productos serían, al menos en parte, responsables de mediar el fenómeno.

429. (292) LA APOPTOSIS INDUCIDA EN NEUTRÓFILOS POR MTB INDUCE CROSPRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS DEL MTB (AG MTB) POR CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC). ALEMÁN MERCEDES (1), ROMERO MERCEDES (1), YOKOBORI NOEMÍ (1), SCHIERLOH PABLO (1), STÉFANO GASTÓN (2), CIALLELLA LORENA (2), ABBATE EDUARDO (2), DE LA BARRERA SILVIA (1), SASIAIN MARÍA DEL CARMEN (1)

Academia Nacional de Medicina (1) Hospital Muñiz (2)

Las DC son células presentadoras de antígeno (CPA) que juegan un rol central en la inducción de una respuesta T efectiva contra Ag Mtb. Este proceso involucra el up-take en pulmón tanto del microorganismo como de células cuya apoptosis ha sido inducida por la bacteria. La presentación a través de moléculas de histocompatibilidad clase I de antígenos internalizados se co-

noce como cros-presentación y tendría relevancia en TB. Al comienzo del proceso inflamatorio los PMN migran rápidamente al pulmón subyaciendo al proceso de apoptosis. Anteriormente demostramos que los PMN apoptóticos inhiben la maduración de DC in vitro. Teniendo en cuenta que en el sitio de infección coexisten PMN apoptóticos (PMNapo) infectados o no con Mtb, evaluamos el efecto de los PMNapo en la cros-presentación de Ag Mtb por DC de pacientes con TB e individuos sanos PPD+. Para ello realizamos ensayos de proliferación enfrentando iDC co-cultivadas con PMN cuya apoptosis fue inducida in vitro 18 hr sin/con Mtb (PMN:Mtb 6:1), con linfocitos autólogos durante 5 días, midiendo incorporación de $[^3H]$ timidina. Resultados: el up-take de PMNapo infectados indujo significativamente la proliferación linfocitaria tanto en PPD+ como TB ($p < 0.01$). El bloqueo de DC-SIGN, el mayor receptor de entrada del Mtb en DC, redujo significativamente la proliferación inducida por Mtb ($p < 0.02$) y no alteró la cros-presentación, confirmando que el efecto no fue inducido por Mtb en forma directa. Por otra parte, la cros-presentación de Mtb Ag se redujo significativamente (60%, $p < 0.002$) al bloquear CD36, receptor involucrado en el up-take de PMNapo. Conclusión: Si bien la apoptosis de los PMN en pulmón moderaría el proceso inflamatorio inhibiendo la maduración de la DC, también permitiría generar una respuesta inmune contra Mtb en el contexto de clase I.

430. (97) EFECTOS DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 (STX2) SOBRE LA DIFERENCIACIÓN A Y MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD) HUMANAS DERIVADAS DE MONOCITOS (MO). FERNÁNDEZ GABRIELA CRISTINA, RAMOS MARÍA V., BENTANCOR LETICIA V., FERNÁNDEZ-BRANDO ROMINA J., ISTURIZ MARTÍN A., PALERMO MARINA S.

División Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

La Stx2 puede inducir una variedad de efectos desde la producción de citoquinas hasta la apoptosis por inhibición de la síntesis proteica. Aquí determinamos los efectos de la Stx2 sobre las CD. Las CD (CD14-) se obtuvieron por diferenciación con GM-CSF+IL-4 por 5 días a partir de Mo (CD14+) humanos. Para estudiar los efectos sobre la diferenciación de las DC, las células fueron incubadas desde el día 1 con LPS (10ng/ml, control de inhibición de diferenciación), Stx2 (1µg/ml), o LPS+Stx2 por 48 hs, y la expresión del CD14 fue determinada por citometría de flujo. Si bien el LPS, solo o con la Stx2, inhibió el descenso del CD14, la Stx2 no causó variaciones en la expresión del CD14 ($n=7$, intensidad media de fluorescencia (IMF) CD14: Basal=62±7, LPS=443±71*, Stx2=70±12#, LPS+Stx2=473±123*†; * $p < 0.05$ vs basal, # $p < 0.05$ vs LPS, † $p < 0.05$ vs Stx2). El LPS indujo un aumento en el porcentaje de apoptosis de los Mo en vías de diferenciación, y los sensibilizó a los efectos proapoptóticos de la Stx2 ($n=11$, % apoptosis: Basal=31.0±3.2, LPS=41.1±2.8*, Stx2=33.7±3.4#, LPS+Stx2=53.4±3.9*#†; * $p < 0.05$ vs basal, # $p < 0.05$ vs LPS, † $p < 0.05$ vs Stx2). Para determinar los efectos de la Stx2 sobre la maduración de las CD, las células fueron diferenciadas y en el día 5 incubadas 24hs con Stx2 (1µg/ml) o LPS (1µg/ml, control de maduración), y se midió la expresión de CD83 y HLA-DR ($n=8$) por citometría de flujo. El LPS, solo o con Stx2, indujo un aumento en el porcentaje de células CD83+ y en la expresión del HLA-DR, pero la Stx2 no causó variaciones en estos marcadores (% CD83: Basal=12±4, Stx2=15±5, LPS=28±5*†, LPS+Stx2=21±3*†; IMF HLA-DR: Basal=1258±115, Stx2=1322±108, LPS 1873±225*†, LPS+Stx2=1840±597*†; * $p < 0.05$ vs basal, † $p < 0.05$ vs Stx2). Además, la Stx2 no inhibió la síntesis proteica ni causó apoptosis en CD inmaduras. El LPS sensibiliza los Mo en vías de diferenciación a los efectos proapoptóticos de la Stx2, pero la Stx2 sola no afecta la diferenciación ni induce maduración de las CD.

431. (214) BRUCELLA ABORTUS MUERTA POR CALOR (HKBA) INDUCE MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A TRAVÉS DE TLR2 Y TLR4. ZWERDLING ASTRID, BARRIONUEVO PAULA, CASSATARO JULIANA,

PASQUEVICH KARINA ALEJANDRA, FOSSATI CARLOS ALBERTO, GIAMBARTOLOMEI GUILLERMO HERNAN

Instituto de estudios de inmunidad humoral (IDEHU)

Se ha establecido que *Brucella abortus* muerta por calor (HKBA) es un poderoso adyuvante Th1. Los mecanismos por los cuales HKBA induce estas respuestas son desconocidos. Recientemente demostramos que las lipoproteínas de *B. abortus* estimulan células del sistema inmune innato e inducen la producción de citoquinas proinflamatorias. En este trabajo investigamos la capacidad de HKBA y sus lipoproteínas para inducir la maduración de células dendríticas humanas (DC). HKBA indujo la maduración de DC determinada como el aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD83, CD80, CD86 y MHC I. La Polimixina B, un inhibidor de la actividad del LPS, no modificó la maduración de DC inducida por HKBA. El LPS de *Brucella* fue incapaz de inducir maduración de DC. El rol de las lipoproteínas de *B. abortus* en la maduración de DC inducida por HKBA, se investigó utilizando la proteína Omp19 como modelo de lipoproteína de *Brucella*. Omp19 aumentó la expresión de CD83, CD80, CD86 y MHC I en DC en forma dosis-dependiente. Además, DC tratadas con HKBA y Omp19 secretaron TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12. El dominio lipídico de Omp19 resultó ser esencial para inducir la maduración. Dada la capacidad de las lipoproteínas de *Brucella*, un ligando TLR2, de inducir la maduración de DC; y la falta de esta actividad en el LPS de *Brucella*, un ligando TLR4, nos propusimos luego caracterizar los receptores tipo toll (TLR) involucrados en la respuesta a HKBA. La preincubación de DC con anticuerpos anti-TLR2 inhibió la producción de IL-12, TNF- α , IL-6, IL-10. Llamativamente, dicha producción también se vio inhibida al preincubar con anti-TLR4. En suma, estos resultados indican que las lipoproteínas de *Brucella*, a través de TLR2, son uno de los principales componentes en la actividad adyuvante de HKBA. Por otro lado, también demuestran que otro ligando TLR4 presente en HKBA, distinto al LPS de *Brucella*, es en parte responsable de la maduración de DC inducida por HKBA.

432. (613) LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS TRATADAS CON ELASTASA INDUCEN LA GENERACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS. MAFFIA PAULO, REITERI MACARENA, GUERRIERI DIEGO, AMIANO NICOLÁS, BARBOZA MARCOS, CHULUYAN EDUARDO

LANAIS-CITO de Medicina

Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que las células dendríticas (CDs) tratadas con elastasa del neutrófilo disminuyen la proliferación de linfocitos en un cultivo mixto alógeno y este efecto es mediado por TGF β . El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de las CDs tratadas con elastasa de generar células T reguladoras. Para ello, las CDs generadas a partir de monocitos humanos de sangre periférica con GM-CSF e IL-4 fueron incubadas (3 hs, 37°C) con elastasa de neutrófilo o medios condicionados (MC) de leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Posteriormente las CDs fueron lavadas y co-cultivadas con células mononucleares alógenas. Transcurridos 5 días del cultivo, los linfocitos se marcaron con CD25 y Foxp3 y la fluorescencia de las CD25+ Foxp3 + fue determinada por citometría de flujo. Las CDs inmaduras inducen un 20% de células T CD25+Foxp3+. Este porcentaje se vio incrementado en 10 \pm 2% cuando las CDs fueron tratadas con elastasa (0.2 U/ml). Lo mismo ocurrió cuando las CDs fueron tratadas con los MC de PMNs. Este efecto de los MC de PMNs se virió cuando los MC fueron pretratados con un inhibidor de serino proteasa específico para elastasa. Estos datos indican que la elastasa neutrofilica induce la producción de linfocitos T reguladores actuando sobre las CDs inmaduras.

433. (299) MONOCITOS (MO) DE SANGRE PERIFÉRICA (SP) DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA (TB) TIENEN ALTERADO EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN A CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC) IN VITRO. ALEMÁN MERCEDES (1), ROMERO MERCEDES (1),

YOKOBORI NOEMÍ (1), SCHIERLOH PABLO (1), BALDINI MATÍAS (2), ROLDÁN NICOLÁS (2), DE LA BARRERA SILVIA (1), ABBATE EDUARDO (2), SASIAIN MARÍA DEL CARMEN (1)

Academia Nacional de Medicina (1) División Tisoneuromonología, Hospital Muñiz (2)

Recientemente demostramos que las DC de TB conservan una población CD14+ durante la diferenciación in vitro. Además, la expresión de CD14 se eleva significativamente durante el proceso de maduración inducido por Mtb. Siendo las DC células presentadoras de antígenos (CPA) claves en la respuesta inmune contra micobacterias, el objetivo de este trabajo fue estudiar las posibles alteraciones en el proceso de diferenciación de Mo a DC en TB y el efecto del Mtb durante el mismo. Para ello, a partir de Mo de sangre periférica (SP) separados por adherencia se generaron DC in vitro, cultivando las células con IL-4 y GM-CSF durante 3 o 6 días y se determinó la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo (CD1a, CD14, CD86) y proliferación celular enfrentándose las CPA con linfocitos autólogos, durante 5 días a 37°C y determinando la proliferación por medio de la incorporación de 3H-timidina (18 hs). Resultados: Luego de 6 días de diferenciación los resultados fueron: %CD1a+: N=83 \pm 4.2 TB=62 \pm 4.8, p< 0.05; %CD14+: N=10 \pm 3.4 TB=40.6 \pm 8.7, p< 0.005. A los 3 días: TB=23.6 \pm 5 N=46 \pm 5.2, p< 0.002; %CD14+: N=55 \pm 3.4 TB=45 \pm 9, p< 0.05. Las DC de los TB mostraron además una elevada expresión de la molécula co-estimuladora CD86. El agregado de Mtb desde el inicio de la diferenciación (relación 3:1 Mtb:Mo) indujo una población CD1a-/CD14-/CD86hi tanto en N como TB que se asoció con la población DC-SIGN-. Además, se observó una reducción del 20-40% en la capacidad linfoproliferativa inducida por Mtb tanto en DC de N como TB. Conclusión: Los Mo de SP de pacientes TB tienen reducida su capacidad de generar in vitro la población CD1a+/CD14-. La presencia de Mtb interfiere con el proceso de diferenciación generando una población CD1a-, que a pesar de expresar CD86hi tiene reducida su capacidad CPA y es de fenotipo DC-SIGN-, representando posiblemente una población de tipo macrofágica.

434. (585) EL ARNSH AUMENTA LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS. CRESPO MARÍA INÉS, PISTORESÍ MARÍA CRISTINA, MORÓN GABRIEL

CIBICI-Universidad Nacional de Córdoba

Recientemente se ha encontrado que el ARN, en una disposición de simple hebra (ARNsh), como en el virus de la influenza, interactúa con las células dendríticas (DCs) murinas a través de TLR7, activándolas. Se ignora si tal interacción estimula el procesamiento y presentación de antígenos y en particular, la presentación cruzada de antígenos (Ag) y la generación de CTLs. En este trabajo se analizó si el ARNsh puede estimular la presentación cruzada de antígenos exógenos. Se utilizó Poly U como modelo de ARNsh y se usaron DCs derivadas de médula ósea (BMDCs) generadas en presencia de Flt3-L. Como antígeno exógeno se usó la proteína ovoalbúmina (OVA) en su forma soluble y en complejos inmunes de OVA (IC-OVA). Se midió por citometría de flujo la variación en la expresión de CD40, CD86 y MHC II por las BMDCs. Luego de incubar 12 horas con Poly U a 10 μ g/ml, las células tratadas mostraron un aumento en la expresión de las moléculas estudiadas con respecto al nivel basal (Δ MF1, media \pm SD, MHCII 6 \pm 2, CD40 20 \pm 7 y CD86 12 \pm 7). Por ELISA, se observó que las BMDCs estimuladas con Poly U secretaron IL-12 (más de 1250 pg/ml). Para ver el efecto del Poly U sobre la presentación cruzada de antígenos, se realizó un estudio de presentación in vitro utilizando el hibridoma de células T CD8+ B3Z, específico para OVA257-264. Poly U produjo un aumento en la presentación de OVA (hasta un máximo de 7,7 veces) y de IC-OVA (hasta 2,6 veces) con respecto a las BMDCs sin estímulo. Para estudiar si este aumento estaba relacionado con un aumento en la captura y endocitosis de antígenos por las BMDCs, se evaluó la captura de OVA marcada con FITC por

citometría de flujo. No se observó un aumento en la captura por la estimulación de las BMDCs con Poly U. Estos resultados preliminares muestran que el ARNsh activa y aumenta los niveles de presentación de Ag mediada por MHC I y en consecuencia muestran un potencial efecto adyuvante sobre la generación de respuesta citotóxica.

435. (213) EXPRESIÓN DE LAS FOSFATASAS INHIBITORIAS SHIP-1, SHIP-2 Y SHP-1 EN CÉLULAS B DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA: SU ASOCIACIÓN CON EL MARCADOR DE MAL PRONÓSTICO ZAP-70. GABELLONI MARÍA LAURA, BERGE MERCEDES, GALLETTI JEREMÍAS, CAÑONES CRISTIAN, FERNÁNDEZ CALOTTI PAULA, SÁNCHEZ ÁVALOS JULIO, GIORDANO MIRTA, GAMBERALE ROMINA

IIHEMA. Academia Nacional de Medicina

La LLC se caracteriza por la acumulación de linfocitos B CD5+. Alrededor de la mitad de los pacientes presentan una enfermedad estable durante años (grupo de buen pronóstico), mientras que en el resto la enfermedad progresa rápidamente (grupo de mal pronóstico). La expresión de la proteína ZAP-70 en las células LLC está asociada con mal pronóstico y una incrementada capacidad para transducir señales de activación a través del receptor para el antígeno (BCR), lo que contribuiría a la mayor agresividad de la enfermedad. Dado que la transducción de señales puede ser regulada por fosfatasa inhibitorias como SHIP-1, SHIP-2 y SHP-1 nuestro objetivo fue determinar si las células LLC de ambos grupos difieren en la expresión y/o funcionalidad de estas fosfatasa. Para ello, evaluamos mediante Western Blot la expresión de las tres fosfatasa en células LLC purificadas de pacientes ZAP-70- (n=17) y ZAP-70+ (n=17). Encontramos que los pacientes ZAP-70- expresaron mayores niveles de SHIP-1 en comparación a los ZAP-70+ (p< 0.01). Asimismo, la fosforilación (activación) basal de SHIP-1 y la fosforilación inducida por homoadgregación del BCR fue mayor en el grupo de pacientes ZAP-70- en comparación a los ZAP-70+ (p< 0.05). Por otro lado, 5 pacientes ZAP-70- mostraron una alta expresión de SHP-1, mientras que SHIP-2 no se detectó en ninguna de las muestras analizadas. En conclusión, nuestros resultados muestran que los pacientes ZAP-70- poseen una mayor expresión y activación de la fosfatasa inhibitoria SHIP-1, la cual podría estar involucrada en la disminuida transducción de señales a través del BCR que presenta dicho grupo. Dado que la señalización a través del BCR es un evento central en la patogénesis de la enfermedad la regulación de la expresión y activación de SHIP-1 podría influenciar el curso clínico de la LLC.

436. (404) LA GALECTINA 1 FAVORECE LA ACTIVACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS B DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA. CAÑONES CRISTIAN, BIANCO GERMAN, GALLETTI JEREMIAS, FERNANDEZ-CALOTTI PAULA, TOSCANO MARTA, GAMBERALE ROMINA, RABINOVICH GABRIEL, GIORDANO MIRTA

Laboratorio de Inmunología Oncológica, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina. Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA

Los linfocitos B de la leucemia linfática crónica (LLC) se expanden in vivo en centros de proliferación gracias a señales que reciben de células estromales y de células del tipo nodriza (nurse-like cells) a las que se encuentran estrechamente unidos. Teniendo en cuenta que la galectina 1 (Gal-1) es un ligando de las células estromales necesario para la activación de los linfocitos pre-B en la médula ósea, el objetivo de este trabajo fue determinar si Gal-1 es capaz de unirse a la membrana de las células LLC y modificar su comportamiento. Para ello se purificaron células leucémicas a partir de sangre periférica de pacientes LLC y se evaluó la unión de Gal-1 recombinante (10, 20 y 40 ug/ml) a la membrana mediante citometría de flujo. En 11 de 12 muestras analizadas encontramos unión de Gal-1 a las células LLC a las 3

concentraciones evaluadas. La incubación con Gal-1 (20 ug/ml) por 48 hs incrementó el porcentaje de células LLC que expresan la molécula co-estimuladora CD86: control: $23,0 \pm 6,9$ vs Gal-1: $31,5 \pm 7,6$, n=9, p<0,01 y el receptor de alta afinidad para IL-2 CD25: control: $52,6 \pm 12,0$ vs Gal-1: $67,7 \pm 10,6$, n=7, p<0,02. Dado que el aumento en los niveles séricos de IL-10 correlaciona con progresión de la LLC se determinó su concentración en los sobrenadantes de cultivo. Se encontró que Gal-1 estimula la secreción de IL-10 por parte de las células LLC: control: $25,1 \pm 12,4$ pg/ml vs Gal-1: $121,4 \pm 44,2$ pg/ml, n=7, p<0,05. La incubación con Gal-1 no modificó los niveles de apoptosis espontánea o inducida por el anti-neoplásico fludarabina. Por otra parte, encontramos que células del tipo nodriza diferenciadas a partir de monocitos de donadores normales o de pacientes LLC por cultivo de 2-3 semanas con células leucémicas activadas unen altos niveles de Gal-1. Proponemos que Gal-1 podría ser un ligando relevante para la activación de las células LLC en los centros de proliferación de médula ósea y órganos linfáticos secundarios.

437. (699) AUMENTO DE GRANULOCITOS Y CELULAS MIELOIDES INMADURAS INMUNOSUPRESORAS EN BAZO DE RATONES PORTADORES DE UN FIBROSARCOMA MURINO EN LA ETAPA DE ECLIPSE INMUNOLÓGICO. CHIARELLA PAULA, BRUZZO JUAN, BUS-TUOABAD OSCAR D, CAMERANO GABRIELA V, MAGLIOCO ANDREA F, DRAN GRACIELA I, RUGGIERO RAUL A, VULCANO MARISA

ILEX-CONICET-División Medicina Experimental. Academia Nacional de Medicina IIHEMA-Academia Nacional de Medicina

El crecimiento del fibrosarcoma murino inmunogénico MC-C cursa con un proceso de inflamación sistémica y un estado de inmunosupresión conocido como eclipse inmunológico que se manifiesta cuando el tumor MC-C ha superado los 500 mm³. En presentaciones anteriores hemos demostrado que un tratamiento antiinflamatorio con el glucocorticoide sintético dexametasona (DX) revertía parcialmente el eclipse inmunológico. En este trabajo examinamos como varían ciertas poblaciones esplénicas durante el crecimiento de MC-C y como se alteran por el tratamiento con DX. Los datos representan la media \pm ES del porcentaje de cada población sobre el total de esplenocitos (numero de ensayos de 4-6). Linfocitos T CD4 en ratones normales (N)= 19.2 ± 1.2 ; portadores de tumor < 500mm³ (Tp)= 15.9 ± 1.4 ; portadores de tumor > 500mm³ (TG)= 4.2 ± 0.9 (p< 0.01). Linfocitos T CD8 en N= 8.0 ± 0.8 ; en Tp= 6.7 ± 1.1 ; en TG= 3.2 ± 0.5 (p< 0.05). Linfocitos T reg CD4/CD25 en N= 0.7 ± 0.05 ; en Tp= 0.8 ± 0.05 ; en TG= 0.1 ± 0.1 . Linfocitos B (CD45B220) en N= 32.3 ± 2.0 ; en Tp= 29.7 ± 1.3 ; en TG= 5.2 ± 0.9 (p< 0.01). Células CD11c en N= 28.7 ± 2.0 ; en Tp= 43.9 ± 1.8 ; en TG= 3.9 ± 1.1 (p< 0.001). Por otro lado, células GR1/MAC1 caracterizadas morfológicamente como granulocitos y precursores mieloides en varios estadios de diferenciación muestran valores bajos en N (4.9 ± 0.8) y en Tp (4.2 ± 0.7) y aumentan significativamente en TG (29.4 ± 1.9 , p< 0.001). La DX revertió parcialmente la caída de linfocitos CD4 (10.6 ± 0.9), de linfocitos B (24.8 ± 2.0) y de CD11c (16.6 ± 1.9) (p< 0.01), no afectando los valores de CD8 y CD4/CD25. Por otro lado DX revertió parcialmente el incremento de GR1/MAC1 (14.9 ± 1.9 , p< 0.01). El efecto de DX sobre las poblaciones esplénicas duro 10 días aproximadamente y fue anulado cuando los ratones fueron tratados con anti-CD3. Estos datos sugieren que el eclipse inmunológico podría estar asociado, al menos en parte, a las células GR1/MAC1 y a la caída de linfocitos T como consecuencia de la presencia de aquéllas.

438. (130) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS ABH EN LESIONES ORALES PREMALIGNAS Y MALIGNAS. CAMPI CARLOS, RACCA AMELIA, GARCIA BORRAS SILVIA, RACCA LILIANA, ESCOVICH LIVIA, CO-TORRUELO CARLOS, BIONDI CLAUDIA

Facultad Odontología. UNR. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA

Los antígenos ABH, productos de la interacción de dos sistemas genéticos Hh y ABO, están sujetos a leyes de herencia y pueden estar localizados no solo en los eritrocitos sino también en la mayoría de las células humanas. El objetivo del presente trabajo fue investigar la expresión antigénica ABH en la superficie celular de lesiones orales precancerosas y cancerosas. Se trabajó con muestras incluidas en tacos de parafina de pacientes con lesiones orales (n= 34). Los pacientes fueron clasificados en 2 grupos: a) lesiones premalignas y malignas (n= 11) y b) lesiones benignas (n=23). Se investigó los antígenos ABH por la técnica de inmunoadherencia específica modificada. Se utilizó la adherencia al tejido vascular como control positivo y al tejido adiposo como control negativo. Los resultados fueron semicuantificados desde adherencia fuertemente positiva a negativa. En 21 de las 34 muestras se observó una débil expresión antigénica en áreas atípicas, y delección total en las áreas histológicamente afectadas por neoplasia. En 8 muestras hubo pérdida total de los antígenos ABH tanto en áreas normales como patológicas, estos pacientes presentaron un mayor grado de malignidad y metástasis que aquellos que conservaron la antigenicidad. Estos hallazgos indicarían la existencia de una asociación entre el grado de malignidad de las lesiones estudiadas y la expresión de los antígenos ABH en las mismas (RO= 29.57; IC 95% de 1.56 a 561.66; p=0.0052). La delección antigénica podría ser utilizada como una herramienta de diagnóstico para la detección y pronóstico del cáncer oral.

439. (104) LECTINAS ENDÓGENAS Y CÁNCER: IMPLICANCIA CLÍNICA DE LA GALECTINA-3 EN CÁNCER COLORRECTAL. THEILLER E, GARNERO N, MINELLA K, DENNER S, SOLÍS E, COSTAMAGNA A, FUENTES M, DE LA VEGA ELENA D., GIUGNI MC, VENERA G.

Cát. Bioq. Clínica y Morfología, FBCB-UNL (Santa Fe). IUNIR (Rosario)

La galectina-3 (Gal-3) parecería jugar un rol en la patobiología y malignidad del cáncer colorrectal. El objetivo fue analizar la expresión y coexpresión de Gal-3 y un marcador pronóstico de la enfermedad, el Antígeno Carcinoembrionario (CEA) en células normales (n=36) y tumorales (n=36) de colon, como así también la variación de la expresión de ambas proteínas con relación al estadio de diferenciación. Para estudiar la expresión celular de Gal-3 y CEA se usó método inmunohistoquímico-inmunoenzimático LSAB2- HRP (DAB)-DAKO. La coloración para CEA fue negativa o débil y superficial en colon normal; difusa y multifocalizada en cánceres, predominando intensidad (+++) en tumores pobremente diferenciados y (++) en los moderadamente diferenciados. Se encontró correlación estadísticamente significativa entre el grado histológico y la intensidad de la coloración celular de CEA (r de Spearman = 0.9191, p < 0.001). Para Gal-3, en colon normal se encontró baja expresión con patrón focal en epitelio y conectivo. Mayor positividad, relacionada al aumento de indiferenciación tisular, se encontró en colon maligno: patrón focal (+) en cánceres bien diferenciados; difuso (++) en los moderadamente diferenciados, situación que se acentuó en los pobremente diferenciados. Se halló correlación estadísticamente significativa entre el grado histológico de diferenciación y la intensidad de la coloración celular de GAL-3 (r de Spearman = 0.9714, p < 0.001). Se analizó la correlación entre intensidad de expresión celular de CEA y GAL-3, encontrándose valores estadísticamente significativos (r de Spearman = 0.9330, p < 0.001) La coexpresión CEA/Gal-3 y el aumento de ambos en cánceres más indiferenciados indicarían una probable cooperación autócrina durante la carcinogénesis y metástasis y sugieren que Gal-3, al igual que CEA, podría actuar como marcador tumoral en la enfermedad.

440. (184) EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN P53 "PER SE" NO REGULA LA EXPRESIÓN DE MICA. ROSSI LUCAS EZEQUIEL, FUERTES MERCEDES BEATRIZ, GIRART MARÍA VICTORIA, DOMAICA CAROLINA INÉS, ZWIRNER NORBERTO WALTER

Diversas células tumorales expresan ligandos del receptor NKG2D (NKG2DL), lo que dispara la citotoxicidad y secreción de IFN- γ y de células NK, Linfocitos T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ CD8+. La expresión de NKG2DL se ha asociado con la inmunidad antitumoral. Entre los NKG2DL se destaca MICA, cuya expresión está regulada por estrés y daño al DNA (DNA damage pathway). Éste, involucra la activación de señales que activan a los anti-oncogenes p53 y p21. La molécula p53 se encuentra mutada en muchos tumores, lo que contribuye al progreso tumoral debido a que no se disparan los mecanismos de reparación del DNA de células normales. Objetivo: investigar si p53 regula la expresión de MICA en células tumorales. Para ello, empleamos 2 estrategias experimentales: a) sobre-expresión de p53 por transfección transiente (48 hs y 72 hs post-transfección) del adenocarcinoma de colon humano HCT116 y del melanoma humano MEL-LES, y b) comparación de la expresión de MICA en células HCT116 con p53 salvaje (wild type o wt) con células HCT116 knock-out para p53 (p53-/-). Se analizó la expresión de MICA por citometría de flujo y western blot. Pudimos observar que los niveles de MICA eran idénticos tanto en células tumorales transfectadas con p53 como en sus respectivos controles transfectados con plásmido vacío. Asimismo, observamos una expresión de MICA sutilmente mayor pero estadísticamente no significativa en superficie de la líneas HCT116 p53-/- respecto de la línea wt. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la molécula p53 no sería un regulador de la expresión de MICA en células tumorales. De este modo, las estrategias de inmunoterapia que tienen por objeto la restauración de la vía de p53 en células tumorales, al no alterar la expresión de MICA, no ejercerían efectos deletéreos o perjudiciales sobre la calidad de la respuesta citotóxica anti-tumoral mediada por células NKG2D+ (células NK y linfocitos T $\alpha\beta$ CD8+ y $\gamma\delta$) a través del reconocimiento de MICA.

441. (308) EL TRANSPORTE RETROGRADO DE MICA HACIA EL CITOPLASMA Y SU DEGRADACIÓN EN EL PROTEASOMA SON RESPONSABLES DE SU RETENCIÓN INTRACELULAR EN MELANOMAS HUMANOS. FUERTES MERCEDES BEATRIZ, GIRART MARÍA VICTORIA, ROSSI LUCAS EZEQUIEL, DOMAICA CAROLINA INÉS, RABINOVICH GABRIEL ADRIÁN, ZWIRNER NORBERTO WALTER

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA

Las células tumorales expresan ligandos del receptor activador de citotoxicidad NKG2D, presente en células NK, linfocitos T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ CD8+. A pesar de ello progresan en su crecimiento. Entre los ligandos de NKG2D se destaca la proteína polimórfica de membrana MICA. Recientemente describimos un novedoso mecanismo de escape tumoral en melanomas basado en la retención de MICA en el retículo endoplásmico (RE) y demostramos que su sobre-expresión promueve un rechazo tumoral y apoptosis in vivo más eficientes mediados por células NK. Objetivo: elucidar el mecanismo bioquímico responsable de prevenir la expresión de MICA en superficie celular. Analizamos la secuencia de MICA en las 10 líneas de melanomas estudiadas y concluimos que la retención no está asociada a la expresión de alelos de MICA en particular. Por ultracentrifugaciones diferenciales y western blot detectamos expresión de MICA en la fracción citoplásmica del melanoma humano MEL-LES (no expresa MICA en superficie por retención en RE). Además, realizamos cultivos de MEL-LES con el inhibidor del proteasoma Bortezomib y analizamos la expresión de MICA por citometría de flujo. La inhibición de la degradación de proteínas en el proteasoma durante 24h indujo un aumento en la expresión de MICA en superficie en MEL-LES de 2,26 \pm 0,6 veces (n=3 experimentos). Por otro lado, cuando inhibimos la síntesis proteica de novo con cicloheximida durante 4h, no detectamos expresión de MICA en MEL-LES pero sí en el melanoma MEL-IAN (que expresa MICA normalmente en superficie). Conclusiones: nuestros resultados sugieren la existencia de un trans-

porte retrógrado de MICA desde el RE hacia el citoplasma, lo que promueve la degradación de este NKG2DL en el proteasoma, en melanomas que retienen a esta molécula en el RE. Además, esta retención es debida a una mayor inestabilidad de la proteína, por lo que la combinación de estos 2 efectos sería la responsable de prevenir la expresión de MICA en superficie.

442. (538) INMUNOGENICIDAD DEL BENZIL ALFA DISACÁRIDO DE THOMSEN-FRIEDENREICH UTILIZANDO LYS5 COMO LINKER. SENDRA VICTOR G., NORES GUSTAVO A., IRAZOQUI FERNANDO J.

CIQUIBIC-CONICET/ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Oligosacáridos de las cadenas de O-glicanos del tipo mucinas están frecuentemente sobre-expresados y aberrantemente glicosilados en células de tumores epiteliales. El core 1 (Gal β 1-3GalNAc α -O-) de O-glicanos tipo mucinas, también llamado disacárido de Thomsen-Friedenreich (TFD), es un ejemplo de estructuras crípticas que se sobreexponen en células tumorales debido a modificaciones en el perfil de sus glicosiltransferasas. Esta molécula es un atractivo modelo para el estudio de la inmunogenicidad de moléculas glucídicas pequeñas, como también un potencial candidato para inmunoterapia específica en pacientes con cáncer. El objetivo del presente trabajo es estudiar variantes estratégicas en la síntesis del inmunógeno, con la intención de dirigir la respuesta inmune al TFD. Aquí se ensayó la utilización de un linker en la TFD a una proteína carrier (KLH). Mediante la unión conjugación del Bzl covalente del linker Lys5, se lo conjugó a KLH succinilada. El BzlaTFD fue oxidado utilizando galactosa oxidasa y posteriormente conjugada a Lys5-KLH por aminación reductiva. El glicoconjugado sintetizado fue utilizado como inmunógeno en ratones Balb-c, a los que se les estudió la respuesta humoral. Ensayos de ELISA demostraron que los anticuerpos así obtenidos (IgG e IgM) fueron capaces de reconocer a BzlaTFD-BSA como también el antígeno tumoral T-MUC1. Mediante ELISA competitivo pudo apreciarse que esa interacción era mediada por la región glucídica. Ensayos de inmunofluorescencia y cell ELISA muestran que estos anticuerpos son capaces de reconocer líneas celulares de tumores epiteliales humanos como HT29, MCF7 y T47D. Esta interacción también es mediada por estructuras relacionadas al TFD, como puede observarse en ensayos de inhibición con carbohidratos. El presente trabajo demuestra potenciales beneficios del uso TFD, en el intento de dirigir una respuesta inmune a Lys5 como linker del Bzl humoral hacia moléculas relacionadas al TFD expresadas en células de tumor epitelial.

443. (353) CRECIMIENTO TUMORAL E INFLAMACION SISTEMICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL. BRUZZO JUAN, CHIARELLA PAULA, BUSTUOABAD OSCAR DAVID, RUGGIERO RAÚL ALEJANDRO

ILEX-CONICET. División Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina

Se sabe que en sitios de inflamación crónica, existe una mayor probabilidad para el desarrollo tumoral. Además, en algunos modelos experimentales, se ha descrito un fenómeno de inflamación sistémica, que desaparece poco después que el tumor se ha implantado. En este trabajo hemos evaluado la presencia de inflamación sistémica durante todo el crecimiento de un fibrosarcoma inmunogénico de ratón (MC-C) y no sólo durante su implantación. Utilizamos como parámetros de inflamación sistémica el porcentaje de polimorfonucleares (PMN) circulantes y la concentración sérica de TNF- α y de la proteína A amiloide (SAA). Se realizaron frotis de sangre periférica para determinar la fórmula leucocitaria y se midió la concentración de TNF- α (pg/ml) y de SAA (μ g/ml) en el suero de ratones normales y portadores de MC-C de diferentes días, mediante kits de ELISA. El crecimiento de MC-C fue acompañado por inflamación sistémica, evidenciada por neutrofilia y un aumento de la concentración

sérica de TNF- α y SAA. Hubo un pico de TNF- α a los 2 días (219 ± 10 pg/ml), y de SAA a los 3 días (628 ± 15 μ g/ml), que cayeron a valores normales al día 7 (86 ± 11 para TNF- α y 41 ± 9 para SAA), para luego comenzar a incrementarse hasta alcanzar valores de 429 ± 21 para TNF- α y 1158 ± 75 para SAA a los 41 días de implantado el tumor. Una variación similar fue vista en el porcentaje de PMN circulantes. El número de determinaciones fue 6 en cada caso y las diferencias observadas con respecto a los valores normales fueron altamente significativas ($p < 0.001$). Cuando se implantó MC-C por vía s.c 3 días después de la inoculación i.p de tioglicolato, que genera una inflamación sistémica transitoria, el crecimiento del tumor se mostró acelerado mientras duraba esa inflamación. Estos resultados muestran que el tumor MC-C podría utilizar el fenómeno de inflamación sistémica que genera, como parte de su estrategia de crecimiento.

444. (122) PARTICIPACIÓN DE MOLÉCULAS HLA I NO CLÁSICAS Y DE LTGAMMA/DELTA EN TRASPLANTE RENAL ALOGENEICO HUMANO. RACCA ANDREA LAURA (1), BAILAT ALEJANDRA (1), VEAUTE CAROLINA (1), ARRIOLA MARIANO (2), GAITE LUIS (2), MALAN BOREL ILEANA (1)

Cátedra de Inmunología Básica - Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas - Universidad Nacional del Litoral (1) Clínica de Nefrología, Urología y Enfermedades Cardiovasculares - Santa Fe (2)

A diferencia de moléculas HLA clase I clásicas, las no clásicas exhiben un patrón restringido de expresión y un menor polimorfismo. HLA-G inhibiría la función citotóxica de células NK y LT γ δ . Por otra parte, MICA, molécula expresada en células como respuesta a estrés, activaría la lisis mediante su interacción con receptores presentes en LT γ δ , LT CD8 $\alpha\beta$ y células NK. A efectos de determinar la posible participación de estos parámetros en el rechazo del aloinjerto renal humano, en el presente trabajo se analizó, mediante RT-PCR semicuantitativa, la expresión de ARNm para HLA-G, MICA y TCR γ δ en biopsias renales provenientes de pacientes trasplantados cursando rechazo agudo celular (RA) (n=4) o necrosis tubular (NT) (n=3). Las mismas fueron obtenidas dentro de los 14 días de producido el trasplante. Se analizaron, además, muestras de tejido renal normal (Control, n=3). Los niveles de ARNm fueron expresados como la intensidad de banda del ADNc de los genes target relativa a la β -actina. A diferencia de lo observado en los pacientes trasplantados, las muestras controles no expresaron dichos parámetros. Los resultados obtenidos, para pacientes RA, fueron: 0,827; 0,231; 0,566; 0,174 (HLA-G); 0,375; 0,177; 0,394; 0,145 (MICA); 0,779; 0,131; 0,214; 0,288 (TCR γ δ) y los correspondientes a pacientes NT: 0,098; 0,164 y 0,131 para HLA-G; observándose en dos de éstos expresión de MICA (0,243; 0,424) y de TCR γ δ (0,282; 0,160). Teniendo en cuenta la función de HLA-G y de LT γ δ en los mecanismos de tolerancia y el hecho de haberse encontrado su expresión en células de pacientes trasplantados cursando rechazo agudo, estos resultados sugieren la participación de dichas moléculas en los mecanismos que conducirían a superar dicho proceso. La expresión de MICA indicaría la injuria sufrida por el órgano injertado.

445. (372) SÍNDROME DE REITER COMPLETO EN UN NIÑO: ESTUDIO CLINICO E INMUNOLOGICO DE LA POSIBLE BACTERIA IMPLICADA. LACOSTE MARÍA GABRIELA (1), CARGNELUTTI DIEGO (1), TAMASHIRO HÉCTOR (2), DI GENARO MARÍA SILVIA (1)

Inmunología. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. 5700 (1) Complejo Sanitario San Luis. Caídos en Malvinas 110. (2)

El Síndrome de Reiter (SR) se caracteriza por la tríada de uretritis, artritis y conjuntivitis y se asocia con un antecedente de infección gastrointestinal o urogenital. Los microorganismos asociados con patologías gastrointestinales son Yersinia, Salmonella

y Shigella. SR no es común en niños y adolescentes y la tríada de síntomas usualmente no ocurre en ellos. El objetivo es reportar el caso de un niño de 12 años que presentó la tríada completa del SR tres semanas después de un episodio de diarrea, describir el perfil clínico e identificar la posible bacteria implicada. El paciente manifestó conjuntivitis, disuria y artritis. Luego del diagnóstico clínico de SR, se analizó la respuesta de anticuerpos contra Yersinia enterocolitica, Salmonella enteritidis y Shigella flexneri. Todas las inmunoglobulinas e IgA contra diferentes componentes bacterianos fueron analizadas en suero y líquido sinovial (LS) por ELISA y Western blot. Los antígenos bacterianos utilizados fueron: lisado crudo (LC), proteínas de membrana externa (PME), fracción citosólica (FC), proteínas de sobrenadante de cultivo (SN) y lipopolisacárido (LPS). En LS, por ELISA, se destacó la respuesta de inmunoglobulinas totales contra SN de Shigella. Similares resultados se observaron con IgA. En suero, se detectó respuesta contra LC, PME y FC de Yersinia, pero la IgA fue positiva sólo para antígenos de Shigella (PME, LC y LPS). Western blot para Shigella fue positivo en suero y LS, destacándose la reacción contra una banda proteica de 94 kDa en SN de esta bacteria. Concluimos que proteínas de SN y PME podrían ser los antígenos más específicos de Shigella en este caso. Conocer los componentes bacterianos implicados podría llevar a conocer las causas del SR y ayudaría a diseñar métodos de diagnóstico para la identificación de Shigella como agente implicado. Además, se reporta un SR completo en un niño haciendo un aporte a la documentación de los mismos.

446. (163) CONTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS AFRICANOS AL POLIMORFISMO DEL SISTEMA RH EN LA POBLACIÓN DE ROSARIO. COTORRUELO CARLOS, MUNINI GABRIEL, GARCÍA BORRÁS SILVIA, RACCA LILIANA, DI MÓNACO RENÉ, BIONDI CLAUDIA, RACCA AMELIA

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

Los genes RHD y RHCE se encuentran dispuestos en tandem y sus alelos forman 8 posibles unidades génicas o haplotipos (RHD-RHCE) cuyas frecuencias varían en los distintos grupos étnicos. En trabajos anteriores hemos demostrado un aumento de la frecuencia del haplotipo Dce, característico de individuos africanos, en la población de Rosario (5,8% vs 2,5%). El objetivo de este trabajo fue estudiar a nivel molecular el haplotipo Dce. Se seleccionaron 32 trios (padre, madre e hijo) que presentaban el haplotipo Dce. En los 96 individuos se caracterizaron a nivel molecular los alelos del gen RHCE (RHc y RHe) determinando polimorfismos frecuentes en la etnia negra. Se estudiaron por PCR alelos específicos las mutaciones G48C en el exón 1 y C733G en el exón 5 del gen RHCE. Además investigamos la presencia de la inserción de 109 pb en el intrón 2 característica del alelo RHC. El polimorfismo C48 (presente en el alelo RHC y frecuente en alelos RHc de africanos) fue encontrado en el 51,5% de los alelos RHc y la presencia G733 (variante alélica RHes, y responsable del antígeno VS, marcador negroide) se observó en el 36,4% de los alelos RHe que forman el haplotipo Dce. La ausencia de inserción de 109 pb en el intrón 2 permitió descartar alelos RHC. Los estudios familiares establecieron 4 polimorfismos moleculares para el haplotipo Dce: el 48,5% con C en la posición 48 [Dc(48C)e], el 33,3% presentaban G en la posición 48 y G en la posición 733 [Dc(48G)es], el 15,2% con G en la posición 48 [Dc(48G)e] y el 3,0% tenía C en la posición 48 junto con G en la posición 733 [Dc(48C)es]. Estos hallazgos indican la contribución de alelos africanos al pool genético de nuestra población y podrían ayudar a estimar su mezcla genética. La caracterización molecular del haplotipo Dce, considerado el más ancestral del sistema Rh, y su distribución de frecuencias, podrían contribuir al estudio filogenético de los distintos haplotipos Rh.

447. (129) POLIMORFISMO DE LOS ALELOS HLA-DRB1 EN PACIENTES DE LEPRO. GARCÍA BORRÁS SILVIA (1), GARCÍAS CELESTE (1), COTORRUELO CARLOS(1), RECARTE MÓNICA(2), BIONDI CLAUDIA(1), RACCA LILIANA(1), BOTTASSO OSCAR(3), RACCA AMELIA(1).

(1) *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.* (2) *Servicio de Dermatología. Hospital Carrasco.* (3) *Facultad de Ciencias Médicas. UNR*

El hecho de que la Lepra no se manifiesta en todos los sujetos infectados con el Mycobacterium leprae, plantea la participación de factores genéticos del huésped en el desarrollo de esta patología. Dado que el polimorfismo de las moléculas HLA de clase II parece ser uno de los determinantes primordiales de la respuesta inmune a agentes infecciosos, en el presente trabajo se compararon las frecuencias de los alelos HLA-DRB1 en enfermos de Lepra. Se estudiaron 118 individuos de la ciudad de Rosario, 71 pacientes y 46 personas sanas, sin diferencias en sexo y edad. Los alelos fueron tipificados mediante la técnica de PCR-SSP. En los enfermos y en los controles (Co) se identificaron 13 y 15 alelos distintos respectivamente. Los alelos más frecuentes entre los pacientes fueron: DRB1*1404 (20.4%); DRB1*1503 (12.0%); DRB1*0808 (9.9%); DRB1*0409 (9.2%); DRB1*1001 (8.5%); DRB1*1601 (4.9%). Los más prevalentes del Co correspondieron a los siguientes alelos: DRB1*0701 o DRB1*1103 (13.4%); DRB1*0808 (12.1%); DRB1*1303 (9.7%); DRB1*1304 o DRB1*0102 (7,3%). Comparado con los Co, los pacientes mostraron frecuencias significativamente mayores para los siguientes alelos (razones de Odds): DRB1*1601=22.8 (IC 95% 1.3-402.2, p=0.005); DRB1*1001=9 (1.1-67.3, p=0.02); DRB1*1503=6.3 (1.4-27.9, p<0.01); DRB1*1404=2.4 (1.1-5.3, p<0.05), mientras que denotaron frecuencias estadísticamente inferiores para los alelos DRB1*0701 3 (1.2-8.1, p<0.01) y DRB1*1304 2 (1.01-5.3; p<0.05). La mayor proporción de alelos DRB1*1601, DRB1*1001, DRB1*1503 y DRB1*1404 en los pacientes sugiere un papel predisponente de los mismos, no así para los alelos DRB1*0701 y DRB1*1304 cuya menor frecuencia indicaría un efecto protector para esta patología. Tomados en su conjunto estos hallazgos apuntan a un rol contribuyente del polimorfismo HLA-DRB para el variado espectro de respuestas inmunes individuales desarrolladas hacia la micobacteria.

448. (621) POLIMORFISMO DE GENES KIR EN CAUCASICOS Y AMERINDIOS ARGENTINOS. FLORES ANA CLAUDIA(1), MARCOS CINTIA(1), PALADINO NATALIA(1), CAPUCCHIO MÓNICA(1), THEILER GRACIELA(1), ARRUVITO LOURDES(1), PARDO RAÚL(2), HABEGGER ALICIA(3), FAINBOIM LEONARDO(1)

Laboratorio Inmunogenética, Hospital de Clínicas (1) Hospital Rural Nueva Pompeya (2) Histocompatibilidad e Inmunogenética, Hospital J. C. Perrando (3)

Los receptores KIR (Killer immunoglobulin-like receptors) son moléculas inhibitoras y activadoras de citotoxicidad que se expresan en células natural killer. Es posible identificar un alto nivel de polimorfismo en la población de acuerdo al número de genes KIR y de sus alelos presentes. Con el objetivo de caracterizar dicho polimorfismo, el contenido génico de KIR y de sus ligandos HLA-I fue determinado por PCR-SSOP (Sequence-Specific Oligonucleotide Probing) en caucásicos argentinos (n=402) y en tres comunidades cerradas de aborígenes del norte argentino (19 Wichis de Salta y 82 de Chaco y 54 Chiriguano de Salta). KIR2DL4, 3DL2/3 y 3DP1 estuvieron presentes en todos los individuos mientras que KIR2DL1/3, 2DS4, 3DL1 y 2DP1 mostraron una frecuencia entre 84 y 96% y KIR2DS1/2/5, 2DL2/5 y 3DS1 entre 32 y 63%. KIR2DS3, el receptor activador con 29% de frecuencia en la población caucásica, estuvo ausente o presente en muy baja frecuencia en las poblaciones amerindias (Chiriguano y Wichis Chaco vs. caucásicos: p=0.0001; Wichis Salta vs. caucásicos: p=0.003). Teniendo en cuenta que el haplotipo A contiene un único gen activador (KIR2DS4) y que el genotipo AA fue más frecuente en las poblaciones amerindias, se estudió en individuos con genotipo AA la presencia de la forma funcional de este gen. El 98% de los amerindios vs. el 68% de los caucásicos AA tuvieron al menos una copia del gen funcional (Wichis Chaco y Chiriguano vs caucásicos: p< 0.05). En 10 familias Wichis de Chaco se encontraron sólo 3 haplotipos: A, B5 y un haplotipo B que contiene a los genes KIR2DS4, 3DL1, 2DS2 y 2DL2. La

predominancia de estos haplotipos carentes del gen KIR2DS3 justifica su baja frecuencia en esta población y posiblemente en las otras poblaciones amerindias. En conclusión, en cuanto a la frecuencia del gen KIR2DS4, 2DS3 y del genotipo AA, las poblaciones amerindias mostraron diferencias con la población caucásica argentina y similitudes con poblaciones asiáticas reportadas.

449. (714) CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES DE SANGRE PERIFÉRICA Y RESPUESTA IN VITRO A ANTÍGENOS BACTERIANOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASMA ATÓPICO. FINIASZ MARTA REGINA (1), MARTÍNEZ VERÓNICA (1), PAZ RUBÉN D.(2), GALASSI NORA (1), TEPPER ALEJANDRO (2), KOHAN MARCELO (2), BEZRODNIK LILIANA (2), FINK SUSANA (1)

IIHema. Academia Nacional de Medicina (1) Hospital de Niños R. Gutiérrez (2)

En la fisiopatogenia del asma interviene la respuesta inmune celular con predominio de citoquinas tipo Th2, que estimulan el crecimiento, diferenciación y reclutamiento de basófilos (Ba), eosinófilos (Eo) y linfocitos B productores de Ig E (B/E). Objetivo: Caracterizar poblaciones celulares relevantes y respuesta in vitro a dos tipos de bacterias M. tuberculosis (M) y S.pneumoniae (Sp) pues los asmáticos son susceptibles a infecciones respiratorias, sin mayor prevalencia aparente de tuberculosis. Se evaluaron los eosinófilos, basófilos y linfocitos B que expresan IgE; las células T regulatorias que expresan CD4 y CD25 de alta intensidad (Treg, que serían capaces de inhibir el desarrollo de respuestas Th2), así como las células que expresan el receptor T $\gamma\delta$ (T $\gamma\delta$), de función aún desconocida en asma. Para evaluar la respuesta, se cultivaron las células por 48 horas con M y Sp, o sin ellos (C) y se determinó el porcentaje de células activadas (expresión de CD69). Por otra parte se estudió la apoptosis linfocitaria (Apo) inducida por M y Sp evaluando núcleos con yodo de propidio. Se estudiaron 19 pacientes asmáticos, 7 en crisis asmática (CR) y 18 en período intercrisis (IN), y 11 niños sanos (S). Resultados: media (%) \pm error estándar. Eo: CR 5,5 \pm 1,7; IN 7,6 \pm 1,1*; S 2,5 \pm 0,3; Ba: CR 1,0 \pm 0,4; IN 0,8 \pm 0,1; S 1,0 \pm 0,2; B/E: CR 11,5 \pm 1,6; IN 7,6 \pm 1,1*; S 5,9 \pm 1,5. Treg: CR 2,8 \pm 0,5*; IN 2,1 \pm 0,5; S 1,5 \pm 0,3. T $\gamma\delta$: CR 3,2 \pm 0,8*; IN 3,7 \pm 0,7*; S 7,2 \pm 1,4. CD69: CR: C 3,6 \pm 0,6; M 10,1 \pm 2,4; Sp 7,6 \pm 1,4; IN: C 4,1 \pm 0,4; M 13,7 \pm 1,3*; Sp 8,8 \pm 1,0*; S: C 3,5 \pm 0,9; M 10,8 \pm 2,6; Sp 11,1 \pm 2,1. Apo: CR: C 24,7 \pm 4,3; M 38,4 \pm 10,2; Sp 29,7 \pm 5,2; IN: C 27,0 \pm 3,6; M 35,4 \pm 3,6; Sp 33,0 \pm 4,1; S C 16,4 \pm 1,6; M 25,1 \pm 2,2; Sp 24,5 \pm 4,1. *p < 0,05. Conclusiones: se observó una mayor respuesta de activación con M respecto de Sp en los asmáticos, lo que podría contribuir a explicar la susceptibilidad diferencial de los asmáticos a contraer determinadas infecciones.

450. (716) ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA: DISOCIACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO. ORNANI ALICIA, OLEASTRO MATÍAS, PEREZ LAURA

Hospital de Pediatría Prof. Dr. J. P. Garrahan

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una deficiencia de la actividad microbicida oxígeno dependiente de los fagocitos por una alteración en una de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa. La evaluación del estallido respiratorio de polimorfonucleares con la prueba de 123-dihidrorhodamina (DHR) por citometría de flujo se utiliza en el diagnóstico de la enfermedad y en la detección de portadoras. Además, permite diferenciar las formas ligadas al cromosoma X (EGC-X) de las autosómicas recesivas (EGC-AR) por dos características del histograma de intensidad de fluorescencia: índice de estimulación (IE) y coeficiente de variación (CV). El IE es la relación entre las Medias Geométricas de la intensidad de fluorescencia de los PMN estimulados y no estimulados. Se ha reportado que las EGC-X presentan un IE entre 0.9 a 2.2 y un CV de 18.1 a 48.8, mientras que las EGC-AR muestran valores diferentes (IE: 3.5 a 52.1 y CV: 49.3 a 100). Describimos las dificultades en el diagnóstico y caracterización de dos hermanos varones con EGC. Caso 1: 5 años

de edad con adenitis cervical crónica. El histograma de fluorescencia de la prueba de DHR mostró un IE de 32 y un CV de 29. Caso 2: 3 años de edad con antecedente de una única lesión cutánea piógena autolimitada. En la prueba de DHR, el IE fue de 30 y el CV de 34. El estudio de DHR de la madre fue compatible con estado de portadora de EGC-X. Conclusiones: Los resultados muestran que los IE obtenidos son de un orden diez veces mayor a lo reportado para las formas de EGC-X, superponiéndose a los de EGC-AR, lo que demuestra discordancia entre el fenotipo DHR y el genotipo EGC. La evaluación de la madre por la prueba de DHR es fundamental para esclarecer el tipo de herencia en casos con actividad enzimática residual, permitiendo un adecuado asesoramiento familiar. Las escasas manifestaciones clínicas presentadas por los pacientes podrían estar relacionadas con la actividad remanente de la NADPH oxidasa.

451. (398) MUTACIONES EN EL GEN NEMO EN DOS LACTANTES VARONES CON ALTERACIONES MUCOCUTÁNEAS E INFECCIONES SEVERAS. BASILE NATALIA, YANCOSKI JUDITH, ORNANI ALICIA, ZELAZKO MARTA, ROSENZWEIG SERGIO, OLEASTRO MATÍAS

Servicio de Inmunología Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan

El factor de transcripción NF-kB responde a factores intra y extracelulares iniciando respuestas celulares involucradas en la inmunidad adaptativa e innata, proliferación celular, apoptosis y desarrollo. Su activación depende de la fosforilación de su inhibidor, mediada por un complejo multimérico cuya subunidad reguladora es NEMO. Mutaciones en NEMO, gen localizado en el cromosoma X, se asocian a incontinentia pigmenti (IP) en mujeres heterocigotas, con severos trastornos en el desarrollo fetal y muerte in utero de varones afectados, y a grados variables de inmunodeficiencia (ID) y/o displasia ectodérmica ligados al X. Presentamos dos lactantes varones, no relacionados, con defectos en NEMO. Analizamos los datos clínicos y resultados de exámenes complementarios RESULTADOS: Los pacientes presentaron alteraciones cutáneomucosas, diarrea crónica y fallo de medro desde los primeros días de vida. Se constató BCG diseminada en ambos, asociado en uno de ellos a neumonitis por Pneumocystis jiroveci y en el otro a infección multiorgánica por CMV. Los niños fallecieron a los 4 y 3 meses de edad, respectivamente. Los estudios inmunológicos (dosajes de inmunoglobulinas, recuento y fenotipo linfocitario, proliferaciones linfocitarias, análisis del repertorio del receptor T, búsqueda de quimerismo linfocitario materno) no mostraron alteraciones significativas sugestivas de IDs clásicas. Dado el posterior diagnóstico de IP en sus madres se realizó análisis mutacional en el gen NEMO, hallándose mutaciones en DNA genómico en un paciente y en ambas progenitoras Conclusiones: Las alteraciones en NEMO condicionan susceptibilidad a infecciones por gérmenes oportunistas, virus y micobacterias, y deben incluirse en el diagnóstico diferencial de pacientes con ID de temprano inicio. Se requieren estudios inmunológicos más amplios para evidenciar el defecto inmune. Los datos clínicos y estudios de biología molecular maternos apoyan el rol patogénico de las mutaciones encontradas.

452. (103) FRECUENCIA DE LOS ANTÍGENOS PLAQUETARIOS ESPECÍFICOS EN LA POBLACIÓN ARGENTINA. DE LA VEGA ELENA CARLOS DANIEL, NOGUÉS NURIA, OYONARTE SALVADOR, SOLIS EDITA, BLANZACO PLACIDO DANIEL, THEILLER ELVIRA, RAILLON MIGUEL ANGEL, CHIALINA SERGIO, FERNÁNDEZ MONTOYA ANTONIO, CRESPO FERRER VICENTE, CAMPOS MUÑOZ ANTONIO, MUÑOZ-DÍAZ EDUARDO

Depto. Bioq. Clínica - FBCB - UNL; Servicio de Medicina Transfusional - Hospital Italiano Garibaldi - Rosario - Argentina; Banc de Sang I Teixits. Barcelona. España; Depto. de Histología. Universidad de Granada. Granada. España

Los aloantígenos plaquetarios específicos son estructuras polimórficas presentes en la membrana plaquetaria, capaces de generar una respuesta inmune en individuos susceptibles al ser expuestos durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante. Su distribución en una población es un condicionante de la prevalencia y gravedad de los cuadros clínicos relacionados con la aloinmunización: la trombocitopenia feto-neonatal aloinmune, la púrpura trombocitopénica post-tranfusional, la trombocitopenia asociada al trasplante (de precursores y de órganos sólidos) y la refractariedad a la transfusión de plaquetas. El objetivo de este trabajo fue investigar en la población argentina las frecuencias de los antígenos plaquetarios específicos de mayor relevancia clínica. Se caracterizaron 192 donantes de sangre no relacionados del Hospital Italiano Garibaldi de la ciudad de Rosario, utilizando sangre total anticoagulada con EDTA como fuente de DNA. Los individuos fueron genotipificados para los sistemas HPA-1,-2,-3,-4,-5,-6 y -15 en función del patrón de bandas observado en la electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación alelo-específica (PCR-SSP). Las frecuencias alélicas encontradas fueron: 0,878 para HPA-1a, 0,122 para HPA-1b; 0,875 para HPA-2a, 0,125 para HPA-2b; 0,612 para HPA-3a, 0,388 para HPA-3b; 1,000 para HPA-4a, 0,000 para 4b; 0,927 para HPA-5a, 0,073 para HPA-5b; 1,000 para HPA-6a, 0,000 para HPA-6b; 0,510 para HPA-15a y 0,490 para HPA-15b. Las frecuencias alélicas de los sistemas HPA son similares, en general, a las de otras poblaciones caucásicas estudiadas. El estudio de estos polimorfismos en la población representa el primer paso en el esclarecimiento de cuadros patológicos que se sospechan subdiagnosticados en nuestro medio. Adicionalmente hemos establecido un panel de individuos caracterizados, necesario para el serodiagnóstico de la sensibilización en gestantes y pacientes.

453. (620) ICOS EN INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE. CARELLI DANIELA, BEZRODNIK LILIANA, GARCÍA VERÓNICA, QUIROGA FLORENCIA, ISABEL GAILLARD

Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

En la IDCV el compromiso funcional de las subpoblaciones linfocitarias resulta en una falla en la cooperación T-B. La molécula coestimuladora inducible (ICOS) se expresa en linfocitos T, estimulando la secreción de citoquinas y la cooperación T-B para la producción de Inmunoglobulinas (Igs). La ausencia total de ICOS está descripta como un subtipo de IDCV. Objetivo: evaluación de la cooperación T-B mediante la expresión de ICOS y el patrón de citoquinas inducido por esta vía de estimulación en pacientes con IDCV y buscar correlación con las características clínicas y de laboratorio (dosajes de Igs, poblaciones linfocitarias). Materiales y Métodos: PBMC de 10 pacientes (P) IDCV y 10 dadores sanos (D). Medición de la expresión de ICOS por Citometría de Flujo (CF) post estimulación con PHA por 48hs. Estimulación vía ICOS con anti ICOS y medición de citoquinas (INF γ , TNF α , IL2, IL4, IL5, IL10) en sobrenadantes de cultivo a las 48hs por CF. Resultados: La expresión de ICOS (%) fue: P:19 \pm 10; D:33 \pm 6 (p < 0.0019). Valores de citoquinas Me de P/D(pg/ml): INF γ 1516/2177 (p: 0,28), TNF α 17.5/26 (p:0.69), IL2 0/0 (p:0.37), IL4 3.3/4.7(p:0.77), IL5 7.65/9.6 (p:0.91), IL10 172/85 (p:0.19). 3/3 pacientes con autoinmunidad(AI) tuvieron valores no detectables de IL4. Conclusiones: En IDCV obtuvimos menor expresión de ICOS sin correlación directa con los niveles de Igs séricas al diagnóstico. No encontramos ausencia de expresión de ICOS en nuestro grupo de IDCV. La estimulación vía ICOS no induce respuesta proliferativa, si producción de citoquinas TH1 y TH2 sin tendencia hacia ningún perfil, aun en pacientes con baja expresión. La producción de IL10 fue elevada siendo aun mayor en IDCV.

454. (160) NIVELES DE TCD8 NAIVE, MEMORIA Y EFECTORES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS HIV (+). BALBARYSKI JEANETTE, CANDI MARCELA, RAIDEN SILVINA, CANTISANO CLAUDIO, QUIROZ HECTOR, BARBONI GRACIELA, GADDI EDUARDO

Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

Luego del reconocimiento antigénico los TCD8 se diferencian desde células naive (N) a células de memoria central (MC), que proveen un refuerzo inmune luego de una re-infección y células efectoras (ME), que mediante citólisis y citoquinas específicas contribuyen al control de la replicación viral. El patrón de expresión de CD27 en combinación con CD45 isoforma RA, refleja los distintos estadios de este proceso gradual de diferenciación. Los fenotipos N, MC y ME fueron identificados sobre los TCD8 de sangre periférica en 52 niños HIV(+) en distintos estadios inmunológicos: (1) CD4 > 25%, n:20 ; (2) CD4:15-25%, n:18; (3) CD4 < 15%, n:14. Se incluyó un grupo control (Co) de 15 niños sanos HIV(-). Se realizó una inmunomarcación usando anticuerpos monoclonales anti CD45,45RA(FITC),CD14,CD27(PE),y CD4, CD8(PerCP). Los porcentajes de CD8 N RA+27+ en los niños HIV(+) se encontraron disminuidos significativamente (P < 0.05) con respecto al grupo Co (28.8 \pm 13.4 vs 52.8 \pm 11.2), mientras que las células CD8 de ME RA-27- y ME RA+27- se encontraron aumentadas significativamente (P < 0.05) con respecto al grupo Co (ME RA-27- HIV :31.0 \pm 12.2, Co: 6.9 \pm 6.1 ; ME RA+27- HIV: 22.4 \pm 9.7, Co :13.9 \pm 7.7). Los niveles de células N RA+27+ disminuyeron en forma significativa (P < 0.05) en función del estadio inmunológico: (1): 39.3 \pm 9.8 ; (2): 26.8 \pm 11.8 ; (3):22.2 \pm 10.2. No se encontraron diferencias en los niveles de células de MC RA-27+ entre los niños HIV(+) y el grupo Co. La disminución de las células TCD8 N secundaria al deterioro inmune, conduciría a alteraciones en las nuevas respuestas mediadas por dichas células. El aumento observado en los niveles de TCD8 con fenotipo ME sería un mecanismo reactivo frente a la mayor carga antigénica a la que están expuestos los niños HIV(+).

455. (570) CUANTIFICACIÓN DE LAS SUBCLASES DE IGG EN LLAMAS (LAMA GLAMA). DE SIMONE EMILIO ADRIAN (1,2), SACCODOSSI NATALIA (1), LEONI JULIANA (1)

IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (1) Cátedra de Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. (2)

Introducción: En 1993 Hamers-Casterman y col., descubrieron la existencia de inmunoglobulinas (Igs) sin cadena liviana (IgGHH) en el suero de los camélidos. Actualmente se conocen por lo menos 3 subclases de IgG (IgG1, IgG2 e IgG3), de los cuales la IgG2 e IgG3 son de tipo IgGHH, mientras que la IgG1 mantiene la estructura convencional (IgGH2L2). Considerando variaciones en la secuencia de aminoácidos de la región bisagra se clasificaron distintos subtipos, la IgG1 cuenta con dos subtipos (IgG1a e IgG1b) y la IgG2 con 3 (IgG2a, IgG2b e IgG2c). Hasta el presente se ha inferido las cantidades relativas de cada subclase pero la falta de antisueros específicos impidió su cuantificación. Objetivo: Cuantificar las diferentes subclases de IgG en llamas mediante la técnica de ELISA. Materiales y métodos: En trabajos preliminares se desarrollaron antisueros policlonales específicos contra IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3 inmunizando con péptidos sintéticos y recombinantes. Actualmente se desarrolló el antisuero contra la IgG1 inmunizando con una proteína de fusión formada por la GST y el dominio CH1. Con estos elementos y con el anti-IgG total marcado con peroxidasa desarrollado anteriormente se procedió a elaborar los ELISA. Resultados: La cuantificación de las diferentes subclases de Igs arrojó los siguientes valores: IgG1 6,491 mg/mL D.S. 1,628; IgG2: 0.4370 mg/mL D.S. 0,1713 e IgG3 1.531 mg/mL D.S. 0.1713; n=20. Conclusiones: Se logró medir la concentración de los subtipos de IgG en llamas, los cuales hasta el momento no se habían podido cuantificar por la falta de antisueros específicos. Poco se conoce de las características inmunológicas de las IgGHH en las especies que las producen así como su respuesta frente al desafío con diferentes tipos de antígenos. Cuantificar las fracciones de IgG en llamas nos permite una primera aproximación acerca del rol que puedan tener este tipo de anticuerpos en el contexto de las especies que los producen.

456. (348) SÍNTESIS Y UTILIZACIÓN DE UN DECAPÉPTIDO INVOLUCRADO EN EL EPITOPE RECONOCIDO POR UN ANTICUERPO MONOCLONAL DIRIGIDO CONTRA RE-

CEPTORES DE VARIAS CITOQUINAS. BELLOC CG, PEÑA C, BLANK, V.A, RETEGUI LA*IQUIFIB (UBA-CONICET)- Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA*

El MAb denominado R7B4 reconoce un epítipo presente en los receptores de la superfamilia de citoquinas, que incluye a las prolactinas y las hormonas de crecimiento (GH). Con el propósito de identificar dicho epítipo se enfrentó el MAb a varios péptidos sintéticos que contenían la secuencia común Trp-Ser-X-Ser-Trp y a partir de los resultados obtenidos se estableció el péptido consenso His- Gly-Tyr-Trp-Ser-Glu-Trp-Ser-Pro-Glu como parte del determinante antigénico reconocido por el MAb. Puesto que el MAb inhibe la unión de la GH de origen humano (hGH) a microsomas de hígado, el péptido consenso debería bloquear el paratope del MAb e impedir su acción. Así, en un experimento representativo, la unión de la 125I-hGH a los receptores de hígado de rata disminuyó de 61.700 cpm \pm 1.800 cpm a 39.500 cpm \pm 700 cpm en presencia de 12.5 mg/ml del MAb, mientras que el agregado de 100 mg/ml del péptido revirtió parcialmente la acción del Ab, ya que la cantidad de 125I-hGH unida fue 41.300 cpm \pm 230 cpm ($p < 0.02$). Resultados similares fueron obtenidos con muestras de origen humano. Por otro lado, los Ab dirigidos contra el péptido consenso deberían simular la acción del MAb R7B4. Se halló, en efecto, que varios antisueros obtenidos a partir de ratones inmunizados con diferentes dosis del péptido sintético inhibían en forma directa la unión de la 125I-hGH a microsomas de hígado de rata y humano. Los resultados fueron significativos con $p < 0.05$ a $p < 0.0001$. Simultáneamente, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica con el propósito de estudiar el espectro de expresión del epítipo R7B4. Hasta el momento se halló que el MAb se une específicamente a líneas celulares tanto de origen humano como murino: N Munc, Wish, MCF7 y CHO. Los resultados obtenidos sugieren que el péptido consenso que hemos sintetizado forma parte del epítipo reconocido por el MAb R7B4, y que dicho epítipo se expresa en varios tipos celulares no relacionados entre ellos.

457. (673) DETECCIÓN DE ANTÍGENOS EMPLEANDO FRAGMENTOS VHH DE LLAMA ESTABLES EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES. DOÑA VANINA (1), URRUTIA MARIELA(2), BAYARDO MARIELA (1), GOLDBAUM FERNANDO (2), CHIRDO FERNANDO (1)*LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (1); Fundación Instituto Leloir. Buenos Aires (2)*

El empleo de agentes reductores y desnaturalizantes en la extracción de analitos de muestras con matrices complejas parece ser una alternativa adecuada para aquellas situaciones, como la certificación de alimentos para consumo por enfermos celíacos, donde se requiere la máxima recuperación del analito. Sin embargo, aún bajas cantidades residuales de dichos agentes interfieren con la determinación cuantitativa cuando se usan inmunoensayos. Conociendo que los camélidos producen un tipo de anticuerpos de una sola cadena, donde la unión al antígeno ocurre por un dominio (VHH) muy compacto y estable, en trabajos previos se produjo una biblioteca de display en fagos de fragmentos VHH de Llama específicos de gliadinas. De la biblioteca, se seleccionaron los fagos que conservasen la capacidad de reconocimiento de antígeno en condiciones desnaturalizantes: presencia de etanol, cloruro de guanidinio (G) y 2-mercaptoetanol (2ME). Los seis clones seleccionados en primer lugar presentaron una secuencia aún no descrita para VHHs con un puente disulfuro en el CDR3, cuatro tuvieron la misma secuencia (clones 11, 19, 33 y 36), uno difirió en un residuo (clon 13) y el clon 26, el más estable, tiene 10 residuos diferentes. El clon 26, tuvo capacidad de reconocer al antígeno nativo aún en presencia de etanol 15%, 0.5% 2ME, 0,5M G. Además, fue posible desarrollar un ensayo cuantitativo con un nivel de detección de 5 ng de gliadinas/ml. En una segunda estrategia, empleando antígeno desnaturalizado, se seleccionó un solo clon (230) que reconoce tanto el antígeno nativo como al desnaturalizado, y mantuvo su

capacidad de reconocimiento aún en presencia de etanol 15%, 0,5% 2ME, 0,5M G. En conclusión, se obtuvieron fagos con fragmentos VHH capaces de reconocer solo el antígeno nativo o tanto al nativo como desnaturalizado. Los clones seleccionados son resistentes a etanol, 2ME y G, y permiten el desarrollo de ensayos de cuantificación con niveles adecuados de detección.

458. (551) ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS. SACCODOSSI NATALIA (1), DE SIMONE EMILIO (1,2), LEONI JULIANA (1)*IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. (1) Cátedra de Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. (2)*

El suero de los camélidos presenta una fracción importante de inmunoglobulinas (Igs) homodiméricas de cadena pesada (IgHH) que carecen de cadenas livianas y del dominio CH1. Los isotipos IgG2 e IgG3 son del tipo IgHH, mientras que la IgG1 mantiene la estructura convencional. Por otra parte las Igs de las especies relacionadas como los ovinos, bovinos y porcinos no presentan IgHH. Los camélidos sudamericanos que se encuentran en Argentina son el guanaco, la vicuña y la llama. Previamente realizamos el análisis de las secuencias constantes de los subisotipos de la IgG2 (IgG2a, IgG2b e IgG2c) de llama observando que las mismas contienen un alto grado de identidad (61-72) % con el resto de las IgG de mamíferos. Además estas presentan motivos conservados como el sitio de unión al C1q, los sitios de unión al receptor Fc α R1 y a las proteínas A y G. También generamos antisueros contra los distintos isotipos y subisotipos presentes en llama. En esta segunda etapa, nuestro objetivo es analizar las regiones constantes de las IgG de guanacos y vicuñas comparándolas con las secuencias constantes obtenidas previamente en llamas. A partir del RNA de los linfocitos de sangre periférica de vicuña y guanaco se realizaron RT-PCR con oligonucleótidos complementarios a regiones conservadas de los frameworks y de los CH3 de las IgG de llama. Se obtuvieron las secuencias constantes de las IgG2b e IgG2c de guanaco y vicuña las cuales presentaron un alto grado de identidad (98-99) % con las IgG2b e IgG2c de llama respectivamente. Además actualmente estamos realizando, también por la técnica de RT-PCR, la búsqueda de otros isotipos de cadena pesada (IgM, IgA, IgD e IgE) que estén presentes en llamas. Estos resultados nos permiten utilizar racionalmente los reactivos generados hasta el momento para el serodiagnóstico de llamas, en guanacos y vicuñas; estos reactivos son de suma utilidad para el control sanitario de estas especies.

ENDOCRINOLOGÍA V**459. (83) MECANISMOS MOLECULARES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL HIPOTÁLAMO: ACCIÓN DEL DIETILSTILBESTROL SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA (REA). MONJE LUCAS, VARAYOUD JORGELINA, MUÑOZ-DE-TORO MÓNICA, LUQUE ENRIQUE H., RAMOS JORGE G.***Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac Bioquímica y Cs Biológicas, UNL*

La expresión dimórfica del REa es crítica para el proceso de diferenciación sexual del área preóptica del hipotálamo (APO). La exposición neonatal a xenoestrógenos puede revertir este dimorfismo, provocando alteraciones reproductivas. Investigamos los mecanismos transcripcionales que median la alteración de la expresión del REa en el APO de hembras expuestas al xenoestrógeno DES. Se trabajó con crías de ratas macho, hembras controles y hembras inyectadas con DES (20 μ g/kg sc) desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta DPN7. En DPN8 se determinó por RT-PCR en tiempo real la abundancia relativa de transcritos provenientes de los promotores OS, ON, O, OT, E1 y el ARNm total del gen del REa en el APO. Por inmunohistoquímica se cuantifi-

có el REa en el APO medial y periventricular. En DPN21 se evaluó el patrón de metilación de los promotores activos por análisis de restricción de ADN bisulfitado. En DPN8 las crías macho controles y las hembras inyectadas con DES presentaron una menor expresión del ARNm y la proteína del REa que las hembras controles ($p < 0.05$). Se determinó que en el período neonatal sólo los promotores O, OT y E1 regulan la expresión de REa en ambos sexos. La menor transcripción del REa en los machos se debió al silenciamiento parcial de los 3 promotores ($P < 0.05$), mientras que en las hembras DES se debió al silenciamiento total de los promotores O y OT ($P < 0.05$). El promotor E1 en las hembras DES presentó una mayor actividad transcripcional que en hembras y machos controles ($P < 0.01$). No se observaron diferencias en el patrón de metilación de los promotores entre los grupos experimentales. Los resultados muestran que el DES disminuye la expresión del ARNm del REa en el APO de la hembra haciéndolo igual al de los machos controles. Sin embargo el control transcripcional del REa sigue siendo diferente entre las hembras DES y los machos controles. La represión del gen del REa por el DES no utilizaría un mecanismo de metilación diferencial.

- 460. (170) BMP-4 INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS HIPOFISARIAS CORTICOTROFAS E INTERACCIÓN CON EL ACIDO RETINOICO.** GIACOMINI DAMIANA (1), PÁEZ-PEREDA MARCELO (2), CASTILLO VICTOR (3), THEODOROPOULOU MARILY (2), LABEUR MARTA (2), REFOJO DAMIÁN (2), GEREZ JUAN (1), CHERVIN ALBERTO (4), BERNER SILVIA (4), RENNER ULRICH (2), STALLA GÜNTER K. (2), ARZT EDUARDO (1)

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (1) Max-Planck Institute of Psychiatry, Kraepelinstr. 10, 80804 Munich, Germany (2) Unidad de Endocrinología. Hospital Escuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (3) Hospital Santa Lucía, 1232 Buenos Aires, Argentina (4)

Los mecanismos moleculares que regulan la patogénesis de los adenomas hipofisarios secretores de ACTH se encuentran todavía bajo estudio. Mas aún en la actualidad el tratamiento farmacológico para dichos tumores es limitado. Anteriormente hemos demostrado la participación de BMP-4 en el desarrollo de prolactinomas y su interacción con los estrógenos. En este trabajo reportamos la expresión de BMP-4 en las células corticotrofas de la adenohipofísis adulta normal, sin embargo se observa una expresión reducida (12 de 15 casos) en los corticotrofinomas derivados de pacientes con enfermedad de Cushing en comparación a la pituitaria normal. El tratamiento con BMP-4 (10-200ng/ml) in vitro de las células corticotrofas AtT-20 inhibe de manera dosis respuesta tanto la secreción de ACTH ($p < 0.001$) como la proliferación celular ($p < 0.001$). Al estudiar el rol in vivo de BMP-4 en el desarrollo de corticotrofinomas, se observó que clones estables AtT-20 para la forma dominante negativa del transductor de señales de BMP-4, Smad-4 (Smad-4dn), o el inhibidor del receptor, Noggin presentan una mayor capacidad tumorigénica. La activación del receptor de ácido retinoico (RA) ha demostrado tener un acción inhibitoria en la progresión de la enfermedad de Cushing, es por ello que analizamos una posible interacción entre ambas vías. Efectivamente el RA induce tanto la actividad transcripcional ($p < 0.001$) como la expresión de BMP-4. Paralelamente estudios en perros con enfermedad de Cushing demostraron que el tratamiento con RA controló la secreción hormonal, disminuyó el crecimiento tumoral y revirtió los síntomas clínicos de la enfermedad. Por lo tanto el RA induce a BMP-4, que a su vez participa en la los efectos antiproliferativos de RA. Este nuevo mecanismo ofrece un potencial blanco para el desarrollo de terapias en el tratamiento de la enfermedad de Cushing.

- 461. (347) FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF2) EN HIPÓFISIS DE RATONES KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 (D2R-/-, KO).** CRISTINA CAROLINA, PÉREZ MILLÁN MARÍA INÉS, SYCZ

GABRIELA, ORNSTEIN ANA MARÍA, DÍAZ-TORGA GRACIELA, BECÚ-VILLALOBOS DAMASIA

IBYME-CONICET

Los ratones D2R-/- desarrollan hiperplasia hipofisaria de lactotropos y son un modelo de prolactinomas. Estos tumores frecuentes en hipofísis responden a la terapia con agonistas dopaminérgicos salvo un bajo porcentaje que es resistente. Nosotros demostramos que las células foliculoestrelladas hipofisarias producen mayores niveles de VEGF que las wt, promoviendo la angiogénesis y el crecimiento celular (Endocrinology 146,2005). En este trabajo estudiamos los efectos de FGF2 en nuestro modelo experimental. FGF2 es un potente angiogénico con efectos proliferativos sobre muchos tipos celulares. FGF2 indujo la liberación de PRL en células adenohipofisarias de ambos genotipos. A la dosis de 10 ng/ml, estimuló la proliferación de las células ko y wt evaluada por captación de ^3H -Timidina (% de aumento $38,5 \pm 4,5$ y $28,1 \pm 6,1$ para ko y wt, respectivamente) y por la técnica de MTS donde obtuvimos resultados similares. Al estudiar los mecanismos moleculares relacionados a la acción proliferativa de FGF, vimos que éste indujo una activación de MAPKs superior en ko, lo que correlacionó con los mayores niveles de FGFR1 en este genotipo (IHQ y Western Blot $207,6 \pm 30,5$ y $88,9 \pm 20,9\%$ para ko y wt respectivamente, Western $p < 0.05$). Sin embargo, por ELISA e Inmunofluorescencia los niveles de FGF2 fueron menores en ko que en wt (0,79 y 2,16 ngr/ugr proteína, $p < 0.001$ en homogenatos, y 0,67 ko vs 3,03 wt pgr/ ug proteína, $p < 0.001$ en lisados celulares). No obstante los niveles séricos de FGF2 no mostraron diferencias entre grupos. El medio condicionado de células hipofisarias de ambos genotipos estimuló la proliferación de células endoteliales HUVEC, efecto que fue revertido por un anticuerpo contra FGF2. La baja expresión de FGF2 en ko puede asociarse a la benignidad, al lento crecimiento de los prolactinomas, y a la baja frecuencia de metástasis. El estudio de factores de crecimiento en estos tumores es importante para su seguimiento y diseño de nuevas terapéuticas.

- 462. (482) CAMP INDUCE LA LIBERACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO INTRAMITOCONDRIAL.** CASTILLO ANA FERNANDA, CORNEJO MACIEL FABIANA, CASTILLA ROCIO, MALOBERTI PAULA, PAZ CRISTINA, PODESTA ERNESTO J.

Facultad de Medicina UBA

Los mecanismos involucrados en la compartimentalización de ácidos grasos de cadena larga y sus respectivos ésteres de CoA son eventos aún no claramente descriptos. La acción selectiva de los ácidos grasos o sus productos de metabolización como mensajeros intracelulares puede estar mediada por la liberación de los mismos en sitios específicos de la célula ante estímulos fisiológicos. Nuestro grupo de trabajo ha descrito un nuevo camino metabólico de liberación de ácido araquidónico (AA) como mensajero intracelular. En el mismo actúan en forma concertada una acil-CoA sintetasa y una acil-CoA tioesterasa mitocondrial (Acot2). En el presente trabajo describimos que el cAMP produce la liberación de AA en un compartimento específico de la célula (la mitocondria). Esta liberación intramitocondrial de AA produce un incremento en el transporte de colesterol y está precedida por la captación de araquidonol-CoA por la mitocondria. Estos resultados fueron obtenidos midiendo la incorporación de AA radioactivo en células de Leydig de la línea MA-10 controles o tratadas con cAMP. El AA fue extraído de las diferentes fracciones subcelulares y analizado por cromatografía. Los spots radioactivos fueron analizados utilizando un Storm Phosphorimager (Amersham). El cAMP produce un incremento de aproximadamente 3 veces en el contenido de AA en la mitocondria: DO (media \pm DS, en unidades arbitrarias) $1,3 \pm 0,3$ vs. $3,1 \pm 0,5$, $p < 0,01$. El incremento en la liberación de AA mitocondrial por cAMP fue inhibido cuando se inhibió la actividad o la expresión de Acot2, indicando que esta liberación está mediada por el nuevo camino metabólico de liberación de AA. Esta es la primera evidencia de una liberación específica de AA en la mitocondria mediada por hormona.

463. (706) ESTUDIO DEL ORIGEN CELULAR DE TUMORES TESTICULARES EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN EL ANTÍGENO T DEL SIMIAN VIRUS 40 (SV40T) BAJO LA DIRECCIÓN DEL PROMOTOR DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA. QUINTANA SILVINA, VENARA MARCELA, REY RODOLFO, CHEMES HÉCTOR

Laboratorio de Fisiología y Patología Gonadal. CEDIE. Hosp. Niños Gutiérrez. Bs. As

En estudios anteriores, utilizando un modelo de ratones portadores de un transgén en el que la expresión del oncogén SV40T está dirigida por el promotor de AMH (ratones AT), caracterizamos tumores testiculares mixtos Sertoli-Leydig, a predominio de Leydig, precedidos desde el mes de vida por una hiperplasia Leydigiana. Nuestro objetivo fue explorar el origen celular de estos tumores mediante técnicas inmunohistoquímicas. Se estudiaron embriones (12,5 y 14,5 días) y ratones postnatales (7 días), AT y controles, con marcadores de células de Sertoli (antígeno del tumor de Wilms WT1, y AMH), Leydig (3β hidroxisteroide deshidrogenasa: 3β -HSD) y SV40T. En los controles no hubo expresión del SV40T, hiperplasias ni tumores. 3β -HSD fue positiva en todas las células de Leydig de embriones controles y transgénicos. Estos últimos co-expresaron focalmente SV40T en las células de Leydig. La AMH y el SV40T se expresaron en células de Sertoli de embriones AT de ambas edades, disminuyeron a los 7 días y fueron negativas en ratones AT mayores. El WT1 fue positivo en células de Sertoli de controles y transgénicos en todas las edades. A los 7 días postnatales las hiperplasias focales en el intersticio testicular en ratones AT fueron positivas para 3β -HSD y SV40T y negativas para AMH y WT1. El SV40T fue positivo en los focos hiperplásicos de células de Leydig y tumores a todas las edades. El presente hallazgo que el transgén SV40T, destinado a expresarse en las células de Sertoli, está activo en células de Leydig desde el período fetal sugiere un origen común o transdiferenciación entre células de Sertoli y Leydig y explica el desarrollo de tumores mixtos. Estos resultados indicarían que el transgén presente en las células de Leydig determina su inmortalización y tumorigénesis porque las mismas carecen del mecanismo paracrino de inhibición del promotor de la AMH que opera normalmente en las células de Sertoli postnatales.

464. (674) EL HEXACLOROBENCENO ALTERA LA MORFOLOGÍA DEL FOLÍCULO TIROIDEO E INDUCE LA EXPRESIÓN DE TGF- β Y DE PROTEÍNAS APOPTOGENICAS. ALVAREZ LAURA, CHIAPPINI FLORENCIA, RANDI ANDREA, KOLLIKER-FRERS RODOLFO, KLEIMAN DE PISAREV DIANA

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El hexaclorobenceno (HCB) es un persistente contaminante ambiental, inductor de enzimas microsomales hepáticas, hipotiroxinemia y de tirotofina sérica en algunos casos. Produce cáncer hepático y de tiroides en ratones, hamsters y ratas. Se describió una alta frecuencia de bocio en víctimas de una intoxicación accidental en Turquía, así como un exceso de casos incidentales de neoplasmas de tiroides en individuos con altos niveles de HCB en suero. Estudiamos el efecto del HCB sobre parámetros reguladores del crecimiento tiroideo. Para ello se evaluó el efecto del HCB sobre la morfología, la proliferación celular, la expresión de TGF- β 1 (regulador negativo, inductor de apoptosis) y los niveles de las proteínas pro- y anti-apoptóticas, Bax y Bcl-2, en tiroides de ratas Wistar, intoxicadas con HCB (1, 10, 100 y 1000 mg/kg de p.c.) durante 30 días. El HCB: a) aumenta el tamaño del coloide (HCB 100, 39% y 1000, 41%; $p < 0,05$), b) no modifica el número total de células foliculares, ni el número de células en división medido por incorporación de 5 Br-deoxiuridina; c) la expresión de TGF- β 1, (medida por RT-PCR) aumenta con HCB 100 (39%) y 1000 (32%), ($p < 0,05$); d) Los niveles de Bax, evaluados por Western blot aumentan respecto al control (67, 75, 30 y 32%; $p < 0,05$) en los grupos HCB (1, 10, 100 y 1000 respectivamente).

Los niveles de Bcl-2 aumentan respecto al control (73, 15,10 y 39%; $p < 0,05$) en los grupos HCB (1, 10, 100 y 1000 respectivamente). El Bax evaluado por inmunohistoquímica, aumentó en HCB 1000, 87% ($p < 0,05$); e) el ensayo del TUNEL, aumentó un 600, 660 305 y 280% en HCB (1, 10, 100 y 1000 respectivamente). Conclusión: La regulación del crecimiento de la glándula tiroides estaría afectado por el HCB mediante la alteración en los niveles de TGF- β 1, un regulador negativo del crecimiento celular e inductor de apoptosis. El aumento en los niveles de proteínas pro- y antiapoptóticas sugiere que no sólo la vía mitocondrial estaría activada.

465. (193) R-SUME PARTICIPA EN LOS MECANISMOS DE MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL REGULANDO LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL. DRUKER JIMENA (1)(3), CARBIA-NAGASHIMA ALBERTO (1), GEREZ JUAN (1), LIBERMAN ANA (1), RHEIN THEO (2), HOLSBOER FLORIAN (2), ARZT EDUARDO (1)

LFBM, Dep. FBMC, FCEN, UBA, IFYBINE-CONICET (1), Beca José. A. Estenssoro Fundación YPF (3) Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania(2)

La actividad de las hormonas esteroideas como andrógenos (A) y antiinflamatoria de los glucocorticoides (GC) está mediada por mecanismos que involucran la unión directa de los receptores al DNA así como también por una interacción física con factores de transcripción específicos (FT) que regulan la expresión génica. La actividad del receptor de GC (GR) y A (AR) está regulada positiva o negativamente por modificaciones postraduccionales. Se ha clonado recientemente en nuestro laboratorio un gen, R-SUME (RWD Containing- Sumoylation Enhancer) que forma parte del mecanismo de sumoilación. Mediante ensayos de transfección transiente realizados en las líneas celulares COS-7 y linfoide T (EL4) estudiamos si R-SUME al igual que SUMO aumenta la transactivación del GR y observamos que efectivamente lo realiza (48% y 70% respectivamente $p < 0.05$), disminuyendo la del AR. Utilizando una construcción del GR que carece del sitio de unión al ligando (LBD) observamos que aun en ausencia de LBD, R-SUME conserva la capacidad de modular positivamente la actividad transcripcional del GR. Los ensayos de Western blot demuestran un aumento de la sumoilación del GR en presencia de R-SUME y este efecto es revertido cuando se transfecta una mutante estructural de R-SUME. Ensayos de transfección transiente realizados en diferentes tipos celulares demuestran que R-SUME no potencia el efecto inhibitorio del GR sobre el elemento de respuesta a NF κ B. Sin embargo se observa un incremento en la transrepresión del GR sobre la actividad de AP-1 en presencia de R-SUME (30% $p < 0.05$). Mientras R-SUME potencia la transactivación del GR y esto está relacionado con un incremento en la sumoilación del receptor, no afecta la transrepresión del GR sobre NF κ B mientras que si lo hace para AP-1. R-SUME a través de la sumoilación afecta diferencialmente las distintas actividades transcripcionales del GR, cuyas implicancias sobre la funcionalidad del GR podrían ser útiles en aplicaciones farmacológicas.

HEMATOLOGÍA III

466. (624) MÉTODO DE ALTA SENSIBILIDAD PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL DOMINIO ABL KINASA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA Y RESISTENCIA AL IMATINIB. GARGALLO PATRICIA, BIANCHINI MICHELE, ALÚ MARIA FERNANDA, BARREYRO PAULA, BENGIO RAQUEL, LARRIPA IRENE

Depto de Genética, Academia Nacional de Medicina; Depto de Clínica Médica, Academia Nacional de Medicina

A pesar de la eficacia del imatinib en el tratamiento de la LMC, una proporción de pacientes desarrollan resistencia, especialmente

te aquellos con enfermedad avanzada. Las mutaciones de punto dentro del dominio Abl es el mecanismo más frecuente de reactivación de la actividad kinasa. Nosotros desarrollamos una metodología de detección mutacional basada en PCR anidada y posterior tamizaje por CSGE (conformational sensitive gel electrophoresis). En cada muestra, amplificamos un fragmento de 1200pb con oligonucleótidos dirigidos hacia las regiones BCR y ABL por transcripción reversa-PCR. De este modo enriquecemos selectivamente el sustrato de la segunda reacción con el alelo quimérico BCR/ABL. Una posterior PCR genera un amplímero de 580 pb correspondiente al dominio kinasa de ABL que se analiza por CSGE. También realizamos el análisis amplificando individualmente los exones 4 y 6 del dominio Abl kinasa a partir de ADN genómico. Un total de 22 pacientes resistentes se estudiaron por ambas metodologías, las cuales identificaron 4 casos (4/22:18%) con patrones de corrida anormal. La secuenciación reveló la presencia de las siguientes mutaciones: G250E, E255K (2casos) y T315I. En tres casos adicionales la técnica de PCR anidada/CSGE que evalúa en un solo experimento los exones 4-7 identificó las mutaciones: L298V, M351T y F359C. En total, esta última metodología detectó mutaciones en el 32% (7/22) de los casos analizados. En conclusión, el método propuesto basado en PCR anidada y CSGE es altamente sensible y específico. Provee un sistema rápido y económico para el tamizaje de mutaciones en pacientes resistentes al imatinib, aplicable a laboratorios de baja complejidad y testeo de muestras a gran escala. La detección de mutaciones en el dominio Abl kinasa es de importancia clínica ya que ayuda a definir opciones terapéuticas como aumento de dosis de imatinib o bien el uso de inhibidores de segunda generación.

467. (111) EFECTO DE LA HIPEROSMOLARIDAD SOBRE LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS POR AGENTES QUIMIOTÁCTICOS. GIAMBELLUCA MIRIAM SOLEDAD, GENDE OSCAR ALFREDO

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, UNLP, La Plata

En la resuscitación del shock hemorrágico, la infusión rápida de pequeños volúmenes de solución salina hipertónica moviliza agua desde el compartimento intracelular al intravascular y normaliza la microcirculación. Se ha observado que también reduce la injuria por reperusión postisquémica, disminuyendo la activación de los leucocitos. Para dilucidar el mecanismo que produce esta respuesta este trabajo evalúa la atenuación de la señal de calcio provocada por quimiotácticos en neutrófilos en soluciones hipertónicas. La concentración de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) en los neutrófilos aislados se determinó luego de la incubación con un indicador fluorescente (FURA 2 AM, 10 μ g/ml, 30min, 37°C) en una solución salina ($[Ca^{2+}]_o=1mM$). Luego de 10 min de estabilización en solución isotónica (iso, $[ClNa]_o=140mM$) o hipertónica (hiper, $[ClNa]_o=240mM$), los neutrófilos (un millón de cél/ml) se estimularon con fMLP 0.1 μ M. Se observó una reducción significativa del pico de $[Ca^{2+}]_i$ (iso 272 ± 15.6 nM, hiper 243 ± 17.5 nM) y un aumento en la velocidad de caída de esta señal (t 50%: iso 38.5 ± 1.67 seg, hiper 33.0 ± 1.96 seg). En soluciones sin calcio extracelular ($[Ca^{2+}]_o=0$, $[EGTA]_o=0.1mM$) se produjo, en medios hipertónicos, una reducción significativa de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ provocada por la movilización de calcio desde los depósitos intracelulares. Soluciones hipertónicas por agregado de N-metilglucamina o manitol mostraron una depresión similar de la respuesta a quimiotácticos, indicando que este efecto es debido al cambio de osmolaridad y no a la alteración de la composición iónica. Estos cambios en la señal de calcio se traducen posteriormente en alteraciones de la activación de los neutrófilos en condiciones de hiperosmolaridad.

468. (113) LOS SALICILATOS INHIBEN EL EFECTO ANTI-APOPTÓTICO DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES. NEGROTTO SOLEDAD (1), MALAVER ELISA (1), PACIENZA NATALIA (1), D'ATRI LINA PAOLA (1), POZNER ROBERTO GABRIEL (1), GOMEZ RICARDO MARTIN (2), SCHATTNER MIRTA (1)

Academia Nacional de Medicina (1) Universidad Nacional de La Plata (2)

Previamente demostramos que la aspirina (ASA) y el salicilato de sodio (NaSal) inhiben la sobrevida de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) mediada por lipopolisacáridos bacterianos (LPS). En este trabajo profundizamos estos estudios. Los PMN fueron aislados de sangre periférica de dadores sanos y resuspendidos en medio RPMI con suero fetal bovino (5%). La apoptosis se midió luego de 18 horas por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. El tratamiento de los PMN con ASA y NaSal suprimió el efecto antiapoptótico mediado por LPS (0.5 μ g/ml) y por IL-1 α (10ng/ml) ($EC_{50}=1.39mM$ y $1.28mM$, $n=6$). Ambas drogas ejercieron un efecto proapoptótico directo solo en altas concentraciones (10mM). La acción de los salicilatos no es debido a la inhibición de las ciclooxigenasas ya que otros inhibidores estructuralmente no relacionados como la Indometacina (Indo) y el Ibuprofeno (Ibu) no produjeron ningún efecto (1-100 μ M, $n=4$). La ASA y el NaSal (3mM), aunque no la Indo o el Ibu, bloquearon la degradación del inhibidor de NF κ B (I κ B) mediada por LPS (0.5 μ g/ml) detectada por Western Blot ($n=5$). La acción antiapoptótica del GM-CSF (independiente de NF κ B) no fue regulada por los salicilatos ($n=5$). El efecto antiapoptótico de LPS e IL-1 α no fue observado en PMN obtenidos de personas que habían ingerido ASA (2g). En un modelo de peritonitis inducida por tioglicolato, los ratones tratados con ASA o NaSal mostraron no solo una disminución en el número de células reclutadas al foco inflamatorio (1.3 ± 0.3 , $1.7 \pm 0.4 \times 10^3$ células/ μ l) sino también un aumento en el porcentaje de PMN apoptóticos (28 ± 5 , $23 \pm 2\%$) y de fagocitosis de PMN por macrófagos residentes (45 ± 4 , $48 \pm 6\%$, tinción de preparados con May Grunwald-Giemsa) con respecto al control ($3.3 \pm 0.3 \times 10^3$ células/ μ l, $9 \pm 2\%$, $17 \pm 5\%$, $n=5$). Los salicilatos favorecen la resolución de la inflamación inhibiendo las señales de sobrevida mediadas por NF κ B y acelerando la remoción de los PMN del foco inflamatorio.

469. (157) ESTUDIO DE LA MUTACIÓN V617F DEL GEN JAK2 EN PACIENTES CON SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS DE LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA: RESULTADOS PRELIMINARES. BASQUIERA ANA LISA, SORIA NÉSTOR, BUSTAMANTE MARÍA F, PALAZZO EMILIO D., BORELLO ADRIANA, STURICH ANA G., SALGUERO MIRIAM, ALONSO MARTÍN, BERRETTA ADRIANA R, BONAFÉ MIRIAM, MORENO BARRAL JOSÉ, GARCÍA JUAN J

Hospital Privado Centro Médico de Córdoba, Centro Piloto de Detección de Errores Metabólicos (CEPIDEM), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba Servicio de Hematología, Clínica Privada Velez Sarsfield

Introducción: Síndromes mieloproliferativos crónicos (SMC) clásicos incluyen: Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Idiopática (MFI). En el año 2005, se describió una mutación adquirida en el gen JAK2 (V617F) en 65 a 97% de pacientes con PV y en 35 a 57% de pacientes con TE y MFI. Nuestro objetivo fue determinar la prevalencia de la mutación en pacientes con SMC y la correlación con la evolución clínica. Métodos: Separación de ADN y detección de la mutación V617F/JAK2 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando dos variantes: alelo específica (AE) y con enzima de restricción BsaXI. Las muestras se obtuvieron de: granulocitos de sangre periférica (SP) de pacientes con SMC (criterios WHO) y controles; linfocitos de SP de pacientes y controles, hisopados bucales y médula ósea (MO) de pacientes. Resultados: Entre abril y junio de 2006 se estudiaron 33 pacientes con SMC (edad media 56,8 años, rango 14-80; 13 varones). La distribución de la mutación fue: PV 16/17 (94,1%), TE 11/15 (73,3%) y MF 1/1. MO fue positiva en 4/4 casos (todos positivos en SP). Todas las muestras de controles ($n=11$) y muestras de linfocitos ($n=31$) e hisopados bucales ($n=15$) de pacientes fueron negativas. La concordancia entre los dos ti-

pos de PCR fue 95,9% (dos casos positivos sólo por PCR AE). En una mediana de seguimiento de 3,7 años, esplenomegalia, eventos tromboticos y hemorrágicos se registraron solamente en pacientes positivos para la mutación: 13/28 (46,4%), 7/28 (25%) y 3/28 (10,7%), respectivamente. En pacientes con TE, la presencia de la mutación se asoció a valores más altos de hemoglobina ($p=0,03$), hematocrito ($p=0,05$), reticulocitos ($p=0,005$) y glóbulos blancos ($p=0,04$). Conclusiones: En nuestra serie encontramos un porcentaje alto de positividad para V617F/JAK2, usando dos tipos de PCR. Ciertas características clínicas podrían asociarse a este genotipo, sin embargo, esto deberá confirmarse con un número mayor de pacientes.

470. (166) BIOESTIMULACIÓN LÁSER EN CRISTALOPATÍAS INDUCIDAS EN RATAS. REINOSO CLAUDIA, SIMES JUAN CARLOS, MOYA MÓNICA, PICCINI DANIEL, PALMA JOSÉ ATILIO, CAMPANA VILMA

Cátedra de Física Biomédica - Facultad de Cs. Médicas - Universidad Nacional de Córdoba UNLAR Cátedra de Anatomía Patológica - Facultad de Cs. Médicas - UNC

El depósito intraarticular de cristales que se produce en distintas enfermedades articulares agudas y crónicas, resulta de la combinación de factores sistémicos y locales. En búsqueda de una terapia para contrarrestar sus efectos adversos, se propone el láser de baja potencia. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antiinflamatorio del láser de He-Ne en modelos experimentales de artropatías por cristales en ratas a través de la determinación de marcadores plasmáticos inflamatorios: fibrinógeno y L-citrulina y estudio anatomopatológico. La artropatía se indujo por inyección intraarticular en ambos miembros posteriores de cristales de hidroxapatita y de pirofosfato cálcico en grupos diferentes. En un 1er grupo se inyectó 2 mg de cristales durante 3 días consecutivos. En un 2º grupo se inyectó durante 3 semanas (día de por medio). El tratamiento con láser (7 mW) se realizó diariamente por 3 días consecutivos sobre las articulaciones afectadas (8 J/cm²) en el 1º grupo y por 5 días en el 2º. La determinación de los marcadores se realizó por espectrofotometría y se utilizó test de Fisher para comparaciones múltiples ($p < 0,05$). Los resultados de los grupos inyectados tanto con hidroxapatita como con pirofosfato cálcico y tanto durante 3 días o 3 semanas muestran un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,001$) de los valores de fibrinógeno (mg/dL) y L-citrulina (mM) al compararlo con el control y con el grupo inyectado y posteriormente tratado con láser, estos resultados se correlacionan con la involución histológica observada por estudio anatomopatológico, hechos que demuestran el efecto antiinflamatorio del láser de He-Ne en un modelo de artropatías inducidas por cristales en ratas.

471. (176) EFICACIA DEL LÁSER DE BAJA ENERGÍA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA EXPERIMENTAL. SIMES JUAN CARLOS, MOYA MÓNICA, REINOSO CLAUDIA, PICCINI DANIEL, PALMA JOSÉ ATILIO, CAMPANA VILMA

Cátedra de Física Biomédica - Facultad de Ciencias Médicas - UNC - UNLaR

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del láser de He-Ne en ratas con agresión tisular por inyección intramuscular de adrenalina, a través de la determinación plasmática de marcadores inflamatorios: fibrinógeno y L-citrulina (coproducto del óxido nítrico), y estudio anatomopatológico. Se utilizaron 24 ratas separadas en tres grupos. El 1º grupo, ratas intactas. El 2º grupo fue inyectado durante 5 días consecutivos con 0.05 mg/rata de adrenalina en el mismo músculo de un miembro posterior y luego sacrificados los animales para la extracción de sangre y músculo afectado. El 3º grupo fue inyectado al igual que el 2º pero posteriormente tratado diariamente con láser por 5 días, aplicando 8 J/cm² en el músculo inyectado. La determinación de fibrinógeno (mg/dL) y L-citrulina (mM) se realizó por espectrofotometría. Se utilizó el test de Fisher para comparaciones múltiples, considerando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En el 2º grupo los valores de fibrinógeno (281.85 ± 25.27) y L-citrulina (4.53 ± 0.31) mostraron un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) comparado con los niveles del grupo control: fibrinógeno (201.9 ± 9.58); L-citrulina (3.54 ± 0.15) y del 3º grupo: fibrinógeno (222.2 ± 8.62); L-citrulina (3.17 ± 0.14). Sin encontrar diferencia significativa entre los valores de ambas variables del 1º y 3º grupo. Los resultados nos inducen a pensar que en el modelo experimental de agresión muscular por inyección con adrenalina en ratas, la fototerapia con láser de He-Ne es efectiva alterando el metabolismo celular y el estrés oxidativo, disminuyendo los parámetros plasmáticos inflamatorios medidos, fibrinógeno y L-citrulina, corroboradas además las lesiones y su evolución por estudio anatomopatológico. El láser actuaría sobre la actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial de la molécula fotoreceptora, lo que explicaría sus efectos biológicos benéficos en patologías inflamatorias.

472. (704) MODELO MURINO DE HIPOXIA NORMOBÁRICA. VEUTHEY TANIA VANESA, DANNA MARIA CECILIA, SANCHEZ MARIANELA, GATTI CHRISTIAN, LOPEZ GUSTAVO, ROQUE MARTA

Universidad Nacional del Sur

El diseño de un Modelo Animal de Hipoxia permite generar condiciones con bajo aporte de O₂ a los tejidos para estudiar la respuesta al estímulo eritropoyético. Los objetivos fueron: a) diseñar una cámara Hipóxica en nuestro laboratorio para el desarrollo de Modelos Animales Hipóxicos; b) optimizar un protocolo experimental para medir la relación entre HCT y Eritropoyetina (EPO) en hipoxia normobárica. Cámara Hipóxica Normobárica: diseñada con las normas de fabricación comercial. Presión Parcial de O₂ de 1atm, equivalente a 2000m sobre el nivel del mar y temperatura estable de 22 °C. Se utilizó una cámara de vidrio con una mezcla de 8,5%O₂-91,5%N₂. Esta mezcla ingresa a la cámara a un flujo regulado de 100ml/min y a una presión de llenado de 150bar, controlada por 2 reguladores en serie. Control de la humedad: Silicagel. Ratones hembra CF1(32g±2) (n=20) divididos en: GRUPO NORMÓXICO (GN): (21%O₂) fuera de la cámara 16 días (n=10); GRUPO HIPÓXICO (GH): mantenido 16 días en la cámara con un fotoperíodo de 12 hs (n=10). Apertura de la cámara cada 2 días para cambio de alimento, agua, control de peso y determinación de parámetros hematológicos. Se valoró el HCT cada 2 días (n=3). Los niveles de EPO se dosaron por Quimioluminiscencia (días:0,4)(n=3). El peso de los animales no varió en la experiencia (32g±1). El GH mostró poliglobulia manifiesta el día 6 (HCT:55%±2), respecto al día 0 (HCT: 46%±2), mientras que, entre los días 8-16, no hubo cambios significativos (51%±1,1). El HCT del GN (46%±2) fue constante. El nivel de EPO del GH mostró un aumento marcado el día 4 (647pg/ml±55) respecto al GN (260pg/ml±28). Los cambios hematológicos observados muestran que los niveles de O₂ indujeron un estímulo hipóxico que generó eritemia manifiesta en ratones por la liberación de Epo. Este diseño es útil para reproducir situaciones fisiológicas o fisiopatológicas análogas a las observadas en residentes sobre el nivel del mar y en trastornos crónicos donde haya compromiso del eritrón.

INMUNOLOGÍA VIII

473. (152) ANÁLISIS DE FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE EVENTOS TROMBÓTICOS EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES). BENCHETRIT ANDRÉS, GRIMAUDO SEBASTIÁN, SUAREZ LORENA, SARANO JUDITH

Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari"

Tanto la trombosis venosa como la arterial son serias complicaciones en pacientes con LES. La presencia de anticuerpos anticardiolipinas (aCL) y antiβ₂glicoproteína1 (aβ₂GP1) se ha

asociado a eventos tromboticos. Sin embargo, estos fenómenos también se han observado en pacientes sin estos anticuerpos. Nuestro objetivo fue evaluar la asociación de distintos factores con la presencia de trombosis en pacientes con LES. Se estudiaron retrospectivamente 30 pacientes conformando dos grupos: LES con al menos un evento trombotico (LESt), y LES sin trombosis durante su evolución (LESnt). Se diseñó un estudio caso-control, con pareamiento individual. Se estudiaron los siguientes factores: sexo, edad, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes, dislipemia, compromiso renal, presencia de aCL IgG e IgM positivos(+) (> 20 UI/ml) y $\alpha\beta$ 2GP1 IgG e IgM positivos(+) (> 20UI/ml) (ELISA The Binding Site, Biocientífica), nivel de inmunosupresión, trastornos valvulares, criterios y actividad al diagnóstico del LES y daño al inicio y al final de la enfermedad. Para el análisis estadístico se aplicaron los test de McNemar y Wilcoxon. Se detectaron 24 eventos tromboticos: 12 venosos, 11 arteriales y 1 síndrome antifosfolipídico catastrófico. Al comparar LESt vs LESnt sólo se observaron diferencias significativas en: criterios al diagnóstico de LES (mediana 4 vs 3, respectivamente, $p=0.036$), actividad al diagnóstico de LES (12 vs 9, $p=0.047$), aCL IgG+ (11/14 vs 3/14, OR 9, CI 95% 1.18–189.76, $p=0.027$) y $\alpha\beta$ 2GP1 IgG+ (7/12 vs 1/12, OR 15, CI 95% 1.51-152.47, $p=0.041$). A diferencia de los factores de riesgo conocidos para trombosis en la población general, en este trabajo se observó que, en pacientes con LES, las principales variables asociadas son un mayor número de criterios y de actividad al diagnóstico, así como la presencia de aCL IgG y $\alpha\beta$ 2GP1 IgG. El monitoreo de este tipo de factores permite evaluar el riesgo de desarrollar eventos tromboticos en pacientes con LES.

- 474. (156) ACCIÓN ANTI-INFLAMATORIA DE LA ERITROPOYETINA RECOMBINANTE HUMANA EN ARTRITIS REUMATOIDEA. EVIDENCIAS CLÍNICO-ANATOMOPATOLÓGICAS.** SARRIÓ LEANDRO (1), FRACALLOSSI NESTOR MATÍAS (1), ZORREGUIETA MARIANO (1), JAMÍN ALEXIS (2), MARQUEZ SUSANA (3), MELETTI BEATRIZ (3), COINTRY GUSTAVO (4), FELDMAN SARA (1)(4)

Cat Quim Biolog Fac Cs Médicas Univ Nac de Rosario (1) Sanatorio de la Mujer (2) Cat Anat Patológ Fac Cs Médicas Univ Nac de Rosario (3) Area Metodolog. Investig. Fac Cs Médicas Univ Nac Rosario (4)

La artritis reumatoidea (RA) es una patología auto-inmune caracterizada por inflamación de las articulaciones, proliferación de membranas sinoviales, erosión de cartílagos y huesos yuxtarticulares. Citokinas como IL-1 y óxido nítrico(ON) tendrían un papel fisiopatogénico. Si bien existen evidencias de que pacientes con RA que presentan anemia tendrían una mayor alteración a nivel de las articulaciones que aquellos en los que la anemia es satisfactoriamente tratada, faltan estudios que consideren los efectos del aporte exógeno de eritropoyetina en la evolución del proceso inflamatorio. Se han desarrollado modelos experimentales de artritis inducidas por antígenos (AIA) donde ocurren similares patrones de sinovitis, formación de panus, erosión de cartilago y variaciones a nivel de citokinas pro-inflamatorias a las observadas RA en humanos. Se estudiaron las rodillas de conejos hembras neocelandeses de 3 meses, controles o con AIA, tratados o no, a posteriori, con Eritropoyetina recombinante humana durante 30 días de manera subcutánea, ($n= 4$ /grupo, 1.000 U. EPOrh en buffer fosfato/ Kg. / 24 hs): los diámetros transversos de las articulaciones femorotibiorotuliana (FTR) a nivel de la línea inter-articular de conejos con AIA que recibieron EPOrh no mostraron diferencias respecto a los de las articulaciones de rodillas de conejos controles, pero si los AIA que no recibieron EPOrh ($p< 0.01$). Estudios a nivel clínicos, anatomopatológicos así como de resonancia magnética mostraron que el tratamiento con EPOrh produce una disminución del proceso inflamatorio, de severo a moderado. Los niveles de ON séricos se incrementaron frente a la AIA (50 μ M), respecto a los animales controles (30 μ M), y disminuyeron frente al tratamiento con EPOrh (40 μ M), ($p< 0.05$). Profundizar en los mecanismos de acción de esta molécula pleiotrópica ampliarían las propuestas de estrategias terapéuticas a considerar frente a fenómenos inflamatorios desencadenados por la artritis reumatoidea.

- 475. (232) PROSTATITIS AUTOINMUNE: MECANISMOS PATOGENICOS Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE LA FERTILIDAD MASCULINA.** MOTRICH RUBÉN DARÍO (1), GATTI GERARDO A. (1), MACKERN OBERTI JUAN P. (1), GUIDOBALDI HÉCTOR A. (2), MACCIONI MARIANA (1), RIVERO VIRGINIA E. (1)

Inmunología, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. (1) Centro de Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. (2)

Recientemente, reportamos presencia de alteraciones espermáticas en pacientes con prostatitis crónica autoinmune, siendo estos resultados reproducidos en nuestro modelo animal. En el presente trabajo, investigamos los mecanismos inmunopatogénicos involucrados y la relación entre prostatitis autoinmune e infertilidad. Se indujo prostatitis autoinmune en ratas Wistar mediante la inyección de un extracto de antígenos prostáticos (EP) o Prostataína purificada (PSBP). Animales autoinmunes y controles fueron sometidos a electroeyaculación y se obtuvieron muestras de semen, donde se analizaron parámetros de calidad espermática; y los niveles de anticuerpos anti-antígenos prostáticos, TNF-alfa, IFN-gama, ON y ROS en plasma seminal. Se evaluó la cinética y apoptosis espermática en experimentos mezcla de plasma seminal autoinmune y espermatozoides normales. Finalmente, se realizaron experimentos de apareamiento con hembras fértiles y se analizaron parámetros de fertilidad. Los animales autoinmunes (EP y PSBP) evidenciaron elevados niveles de apoptosis espermática ($p< 0.01$); de citoquinas inflamatorias (TNF-alfa e IFN-gama) ($p< 0.05$) y de metabolitos inflamatorios (ON y ROS) ($p< 0.05$) en semen y plasma seminal respectivamente. La respuesta autoinmune local se evidenció al detectar elevados títulos de anticuerpos anti-antígenos prostáticos en plasma seminal ($p< 0.05$). A partir de los experimentos mezcla, se determinó que componentes del plasma seminal autoinmune gatillaban el daño observado en los espermatozoides y que citoquinas como TNF-alfa e IFN-gama estaban involucradas, disminuyendo la cinética y aumentando la apoptosis espermática. Este efecto fue revertido mediante anticuerpos neutralizantes. Hembras fecundadas por estos animales presentaron reducidos índices de fertilidad y un aumento en la pérdida embrionaria ($p< 0.01$). Como conclusión, podemos afirmar que una respuesta inflamatoria generada como consecuencia de autoinmunidad hacia próstata afecta la fertilidad masculina.

- 476. (605) TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DEL NF-KB EN EPITELIO PROSTÁTICO EN PROSTATITIS EXPERIMENTAL.** QUINTAR AMADO ALFREDO, LEIMGRUBER CAROLINA, ROTH FÉLIX DANIEL, AOKI AGUSTÍN, MALDONADO CRISTINA ALICIA

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

Las células inmunes reconocen patógenos a través de receptores tipo Toll (TLRs). TLR4 es activado por el LPS de la pared de bacterias Gram (-), desencadenando una cascada de señales que culmina en la traslocación del NF- κ B al núcleo celular y la subsecuente transcripción de genes implicados en la respuesta inmune. Previamente describimos la expresión de TLR4 en el epitelio prostático, por lo cual nuestro objetivo fue caracterizar la respuesta de la glándula prostática a la inflamación en dos modelos de prostatitis en rata: 1) Prostatitis Bacteriana (PB) por inoculación intraprostática de E. coli, 2) prostatitis por Obstrucción Parcial de la Uretra (OPU). Se extrajo la próstata ventral a diferentes tiempos luego de iniciado el estímulo (6, 24, 48 y 72 hs) para investigar características morfológicas y la expresión de TLR4, NF- κ B, TNF- α , IL-1 β e IL-6 por inmunocitoquímica y por western blot. El grupo PB mostró infiltrado de neutrófilos y una fuerte estimulación epitelial con incremento de TLR4 (ANOVA $p< 0,01$), que a nivel ultraestructural se polarizó a la membrana apical

y microvellosidades. NF- κ B exhibió una distribución preferentemente nuclear en la mayoría de la células epiteliales, especialmente a las 48 hs postinoculación y aumento del contenido epitelial de TNF- α . En OPU, la respuesta fue heterogénea, con infiltrado polimorfonuclear y aumento de TLR4 epitelial (ANOVA $p < 0,01$). Sin embargo, no se observó traslocación de NF- κ B al núcleo en OPU en ninguno de los tiempos ensayados. Concluimos, en primer término, que el epitelio prostático es capaz de generar la respuesta inflamatoria de manera similar al sistema inmune innato. Por otro lado, la translocación diferencial de NF- κ B en los modelos analizados sugiere TLR4 se upregula en respuesta a una amplia variedad de señales, pero que la activación de NF- κ B es un mecanismo altamente regulado en las células epiteliales prostáticas.

477. (619) NIVELES DE APOPTOSIS Y CITOQUINAS EN LA ARTRITIS INDUCIDA POR COLAGENO REGULADOS POR PROTEINAS DERIVADAS DE LA PLACENTA. CORTÉS MICAELA, CANELLADA ANDREA, GENTILE TERESA

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr. Ricardo Margni-CONICET-UBA/Facultad de Farmacia y Bioquímica

Resultados previos indican que los tratamientos in-vivo con factores placentarios (FP) y con una fracción de 12-24 kDa derivada de la placenta; reducen el índice de severidad artrítica, disminuyen los niveles séricos de anticuerpos anti-colágeno de tipo II (CII) y afectan la relación IgG1/ IgG2. Con el objetivo de estudiar otros mecanismos inmunorreguladores de las proteínas derivadas de la placenta sobre la remisión de la artritis, se realizaron ensayos in-vitro evaluando los efectos de los FP y de la fracción 12-24 kDa (no caracterizada aun) sobre la apoptosis y sobre los niveles de IFN γ (Th1) e IL-10 (Th2) de células auto-reactivas. Se determinó el índice de severidad artrítica de ratas hembras Wistar ($n=10$). Las células esplénicas de animales artríticos y controles fueron cultivadas en presencia o ausencia de CII y de 20% FP o de 1 μ g de la fracción proteica (12-24 kDa). En los sobrenadantes de cultivos se determinaron por ELISA los niveles de IFN γ e IL-10. La apoptosis se analizó por citometría de flujo mediante la detección de Annexin-V y de Ioduro de Propidio. El tratamiento de los cultivos celulares con FP incrementa la apoptosis en presencia o ausencia de CII, reduce los niveles de INF γ en un 70% (64 pg/ml vs 149 pg/ml del control $p < 0.01$) y triplica los niveles de IL-10 (343 pg/ml vs 110 pg/ml del control, $p < 0.001$) secretados por los esplenocitos-antígeno activados de hembras con CIA. Por otro lado, la fracción proteica-derivada de placenta 12-24 kDa incrementó en un 22% ($p < 0.001$) la susceptibilidad de los esplenocitos a la apoptosis inducida por antígeno (CII) respecto al control. Estos resultados indican un desvío de la respuesta Th1 hacia el fenotipo Th2 y la inhibición de células Th1-proinflamatorias mediante la apoptosis de células activadas. Nuestras observaciones sugieren que los factores derivados de la placenta en ratas con CIA podrían ser parcialmente responsables de la supresión de los procesos artríticos asociados con la preñez.

478. (623) ALTERACIONES INMUNOENDOCRINAS ASOCIADAS AL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ARTRITIS REUMATOIDEA. RONDELLI FLAVIA, ALFONSO JOSÉ, GOÑI MARIO, PONS ESTEL BERNARDO, GENTILETTI ALBERTO, BOTTASSO OSCAR, BAY MARÍA LUISA

Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR

La AR es un proceso inflamatorio articular de naturaleza crónica y con base autoinmune que también repercute sobre el eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA). Nos propusimos investigar la correlación clínica que podrían tener las modificaciones en los niveles de interleucinas (IL-) pro y antiinflamatorias y hormonas del eje HPA (cortisol:GC y dehidroepiandrosterona:DHEA), en pacientes aún no tratadas cuya enfermedad denotaba diferentes tiempos de instalación. La severidad de la AR se evaluó por el nº de articulaciones afectadas (NA) y el índice articular de Thompson. Se incluyeron enfermas cuya dolencia se había iniciado (tiempo

de evolución:TE) < 12 meses (CE; $n=8$) y > 36 meses (LE; $n=8$) y controles sanos (Co; $n=16$) similares en edad. Se determinaron por EIA los niveles séricos de IFN γ , IL-10, IL-6 (pg/ml), TGFbeta (ng/ml), GC y DHEA (nM), proteína C reactiva (PCR-mg/l) y factor reumatoideo (FR-UI/ml). El análisis por TE mostró sólo diferencias estadísticas respecto de los Co para (media \pm ee) IFN γ , Co: 8,00 \pm 0,00; CE: 36,07 \pm 26,26, $p < 0,004$; LE: 56,4 \pm 36,74, $p < 0,001$; TGFbeta, Co: 353,56 \pm 19,32; CE: 452,09 \pm 20,17, $p < 0,01$; IL-10, Co: 1,06 \pm 0,23; LE: 7,55 \pm 3,83, $p < 0,01$; IL-6, Co: 5,19 \pm 2,19, LE: 40,46 \pm 20,41, $p < 0,0001$; GC, Co: 290,46 \pm 25,76; LE: 372,43 \pm 33,74, $p=0,04$; como DHEA tendió a disminuir en los AR se vio afectada la relación GC/DHEA, Co: 29,71 \pm 7,09; CE: 60,89 \pm 18,35 ($p < 0,04$) LE: 44,08 \pm 9,00 ($p < 0,03$). El NA se correlacionó con los niveles de GC ($r=0.49$, $p < 0.05$) y también se observaron asociaciones entre, IFN γ -IL-10, $r = 0.68$, $p < 0.01$; IFN γ -DHEA $r = 0.51$, $p < 0.05$; TE-IL6, $r = 0.73$, $p < 0.01$; IL-6 -GC $r = 0.53$, $p < 0.05$. Esta asociación también se verificó en Co ($r = 0.73$, $p < 0.05$). Los resultados sugieren distintos perfiles inmunoendocrinos (subyacentes a la fisiopatología de la AR) según la antigüedad del cuadro clínico. En pacientes de CE primaria células productoras de TGFbeta, mientras que en las de LE lo harían aquellas secretoras de IL-10.

479. (452) CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DE UN FRAGMENTO PEPTÍDICO DE GLOBULINAS DE SOJA QUE PRESENTA REACTIVIDAD CRUZADA CON CASEINAS DE LECHE BOVINA. CURCIARELLO RENATA, FOSSATI ALBERTO, PETRUCCCELLI SILVANA, DOCENA GUILLERMO H.

LISIS y CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

Frecuentemente se emplea como sustituto lácteo en pacientes alérgicos a leche bovina (LB) formulaciones a base de soja. En aproximadamente el 40% de los casos estos pacientes manifiestan una intolerancia, sin haber estado expuestos a proteínas de soja. Previamente hemos descrito una reactividad cruzada entre caseínas de LB y una globulina 11S de soja (A4A5B3). Sin embargo, al estudiar una variante de soja (RAIDEN) que carece de este componente, observamos que existe una alergenidad residual. El objetivo de este trabajo fue identificar otros componentes proteicos de soja que presenten reactividad cruzada con caseínas bovinas. Se emplearon métodos inmunoenzimáticos (immunoblotting y ELISA), anticuerpos específicos de LB (anti-sueros, anticuerpos monoclonales y sueros de pacientes alérgicos) y componentes antigénicos (proteínas nativas purificadas, proteínas recombinantes y péptido mutantes). Se identificó a las subunidades alfa y beta de la beta-conglicina (7S) como nuevos alérgenos de reactividad cruzada (nativos y recombinantes). Estas poseen homología de secuencia con otras globulinas 7S y 11S, lo cual podría explicar la reactividad observada. Se obtuvo en forma recombinante un péptido mutante de alfa (alfa -CTD) que contiene las regiones con homología de secuencia (zonas expuestas de alfa hélice). Este componente es reconocido por los distintos anticuerpos específicos de LB (antisueros, anticuerpos monoclonales y sueros de pacientes alérgicos). La reactividad observada es independiente de la presencia de glicanos. Por lo tanto, se obtuvieron componentes recombinantes de soja que mantienen la reactividad cruzada, como sus contrapartidas naturales, y un fragmento peptídico que será empleado para realizar un mapeo de epítopes. La identificación de los epítopes inmunodominantes presentes en las globulinas 11S y 7S, permitirá plantear la formulación de un producto de soja hipoalergénico, mediante la alteración y/o eliminación de los mismos.

480. (628) GAMOPATÍA CON DOS PICOS M Y AMILOIDOSIS. FIEZZONI KARINA, GRIMAUDDO SEBASTIÁN, ALVAREZ CLARISA, CASELLAS ANGELA

Instituto de Investigaciones Médicas "A. Lanari"

Las amiloidosis se caracterizan por el depósito de proteínas fibrilares, amiloide (A) en tejidos y órganos. Entre ellas las cade-

nas livianas (L) de inmunoglobulinas monoclonales, secretadas por un clon linfocitario, visualizadas como componente M o pico M. Las gamopatías tienen una frecuencia en la población general entre 1 y 3%, dentro de estas, en el 1%, se observan simultáneamente 2 picos M que sugieren biconalidad. Objetivos: Analizar el hallazgo de 2 bandas en zona gamma en proteinogramas de suero y orina de una paciente y determinar las características del A revelado en la autopsia. Materiales y métodos: análisis del tipo de cadenas pesadas (H) o livianas (L) en proteínas M por inmunofijación. Estudio de los depósitos de A: tinción con rojo Congo y tratamiento oxidativo. Resultados: La inmunofijación del suero mostró dos bandas discretas de IgG-lambda. Este patrón sugiere gamopatía biconal IgG lambda. La autopsia mostró una amiloidosis sistémica con compromiso predominantemente vascular. Se hallaron acúmulos de amiloides rojo Congo positivos en pulmón y en menor proporción en glomérulos. Los depósitos de A, en diferentes formas clínicas, muestran propiedades morfológicas y tinteas en común: fibrillas rígidas en paralelo, con plegamiento beta y típica birefringencia verde en cortes de tejido teñidos con rojo Congo vistos con luz polarizada. La identificación del A tiene importancia diagnóstica. Es el caso de amiloidosis por cadenas livianas, cuyas manifestaciones clínicas son extremadamente heterogéneas y algunos patrones característicos de los órganos comprometidos son indistinguibles de otras amiloidosis sistémicas. La secuencia aminoácida de las L lambda confirmaría las propiedades amiloidogénicas atribuidas a su región variable cuando sus residuos sufren deleciones o sustituciones evidenciadas por la distinta movilidad de las dos bandas.

NEFROLOGÍA II

- 481. (110) PROTECCION TISULAR EN RIÑON DE RATAS UNINEFRECTOMIZADAS SHR Y WKY MEDIANTE BLOQUEO AT1.** ANGEROSA MARGARITA, CAO GABRIEL, MADALENA LETICIA, TOBLI JORGE

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán

Introducción: El SRA a través de Ang II ejerce efectos proinflamatorios y genera fibrosis. La hipertensión arterial (HA) severa e insuficiencia renal son dos situaciones donde el SRA ejerce su acción proinflamatoria. El inhibidor del activador del plasminogeno (PAI-1) es inducido por Ang II y es un mediador del recambio de matriz extracelular (MEC). PAI-1 presente en estados inflamatorios, tanto circulante como tisular, se asocia a menor degradación de MEC produciendo un desbalance entre el depósito y la remoción de la misma con el consecuente incremento de colágeno (Col) intersticial. La terapéutica con agentes anti-SRA, ha probado ser efectiva en reducir el daño tisular. La rata espontáneamente hipertensa (SHR) con uninefrectomía (UNx), es una combinación de severa HA y daño renal progresivo. Objetivo: Evaluar la respuesta terapéutica a nivel renal del bloqueo AT1 de Ang II mediante Valsartan (VAL), en relación con la expresión de PAI-1; actina de músculo liso (α -SMA) y depósito de Col III en riñón de rata con severa HA y daño renal progresivo. Métodos: 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: PAI-1; α -SMA y Col III. Resultados: Al sexto mes: ($p < 0.01^*$ vs. todos G; $p < 0.01^{**}$ vs. G2 & G3; $p < 0.01^{***}$ vs. G2). PAI-1 (%/área): G1= $20.7 \pm 3.1^*$, G2= 8.7 ± 2.4 ; G3= $13.9 \pm 1.8^{***}$, G4= $5.1 \pm 1.4^{**}$. α -SMA (%/área): G1= $26.7 \pm 3.5^*$, G2= 13.8 ± 2.4 ; G3= 16.5 ± 2.1 , G4= $5.7 \pm 2.9^{**}$. Col III (%/área): G1= $18.8 \pm 3.6^*$, G2= 8.9 ± 1.7 ; G3= 9.7 ± 2.2 , G4= $2.3 \pm 1.1^{**}$. Conclusiones: El bloqueo AT1 con Valsartán, reduce la inmunoexpresión de PAI-1 α -SMA y COL III controlando la respuesta inflamatoria y expansión de MEC en riñón de UNX-SHR y UNX-WKY.

- 482. (206) DIFERENCIA DE GÉNERO EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL POR EL SISTEMA KALIKREINA KININA EN RATAS WISTAR.** ODDO ELISABET (1), OBIKA LEONARD (2), MARTIN RODOLFO (1), IBARRA FERNANDO (1), ARRIZURIETA ELVIRA (1)

Lab. de Nefrología Experimental, IIM Alfredo Lanari, Fac. Med., UBA (1) Benin City University, Benin, Nigeria (2)

Ratas adultas gonadectomizadas (Gx) a los dos meses de vida, con y sin reducción de la masa renal, han mostrado una mayor excreción de kallikreina urinaria (KU) que hembras y machos intactos o uninefrectomizados (uNx) al ser estudiados tres meses más tarde, estando, en esa etapa, todos los grupos, normotensos. El aumento de KU se asoció con una mayor expresión (mRNA) y contenido de kallikreina renal sugiriendo que el SKK estaría modulado por las hormonas sexuales. Por otra parte, hallazgos previos han mostrado que cuando la Gx se efectúa en una etapa prepuberal, se observa un aumento de la concentración de Aldosterona plasmática que también influye en la excreción de KU disminuyendo la presión arterial. Para dilucidar la importancia que el SKK pudiera tener en la regulación de la presión arterial y profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados se midió la concentración plasmática de Aldosterona y la presión arterial media (PAM) y KU, antes y después de la inhibición del SKK, en animales intactos y uNx de distinto sexo con y sin gonadectomía en la etapa adulta. La inhibición del SKK se realizó en la mitad de los animales de los distintos grupos, mediante la administración i.p. de Aprotinina a una dosis de 30.000 UIK/d por 4 días o con el antagonista específico del receptor de bradikina (HOE-140) con minibombas osmóticas, a razón de 50 μ g /d/rata, por 4 días, midiéndose a continuación la PAM (mmHg) y excreción de KU (nkat/d/100g pc). Los animales no tratados se utilizaron como control. La inhibición del SKK indujo un aumento de la PAM de 108.5 ± 2.99 (n:34) a 123.6 ± 3.63 (n:22), ($p < 0.002$) solamente en ratas hembras, mientras que la KU descendió de 25.6 ± 2.56 a niveles no detectables en los animales tratados con aprotinina. Los niveles de Aldosterona plasmática (204.5 ± 81.37 pg/ml) se mantuvieron dentro de límites normales en todos los casos. El SKK interviene en la regulación de la presión arterial en ratas hembras independientemente de la masa renal. La Gx postpuberal incrementa la KU por un mecanismo no dependiente de Aldosterona.

- 483. (225) DEFICIENCIA DE COLINA, LÍPIDOS DE LA DIETA Y ESTRÉS OXIDATIVO RENAL.** OSSANI GEORGINA PAULA (1), REPETTO MARISA GABRIELA (2), BOVERIS ALBERTO (2), MONSERRAT ALBERTO JUAN (1)

Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. (1) Cátedra de Química General e Inorgánica. Departamento de Química Analítica y Físicoquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. (2)

Ratas recién destetadas alimentadas con dieta deficiente en colina (CD) desarrollan insuficiencia renal aguda (IRA). La patogenia es incierta. La cantidad y calidad de los lípidos de la dieta influyen en el desarrollo de la IRA. El aceite de pescado tiene un efecto protector alto. Se estudió el rol patogénico de la peroxidación lipídica en la IRA por CD con dietas con aceite de maíz y vegetal hidrogenado o aceite de pescado como lípidos. Treinta y nueve ratas Wistar macho, recién destetadas fueron divididas en cuatro grupos: grupo 1: dieta CD con aceite de maíz y aceite vegetal hidrogenado como lípidos; grupo 2: similar dieta que el grupo 1, pero suplementada con colina (CS); grupo 3: dieta CD con aceite de pescado como lípido; grupo 4: similar dieta que el grupo 3, pero suplementada con colina (CS). Los animales fueron sacrificados al tercer o sexto día. Se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxido de tert-butilo (QL) en homogeneizados renales en todos los grupos y QL en fracciones

subcelulares (microsomal, mitocondrial y lisosómica) en los grupos 1 y 2. El contenido de TBARS en homogeneizados renales fue mayor al día 3 ($p < 0,05$) y la QL al día 6 ($p < 0,01$) en el grupo 1 con respecto al grupo 2. La QL en fracciones subcelulares fue mayor al día 6 ($p < 0,05$). No hubo diferencia significativa entre los grupos 3 y 4, ni en TBARS ni en QL. Las ratas CS (grupos 2 y 4) no mostraron daño histológico renal, como así tampoco las ratas CD del grupo 3. Las ratas CD del grupo 1 sacrificadas al tercer día no mostraron daño renal, en tanto que 9/12 sacrificadas al sexto día mostraron necrosis renal. La peroxidación lipídica podría ser un mecanismo patogénico involucrado en el daño renal por deficiencia de colina. El efecto protector del aceite de pescado podría relacionarse con su acción en la generación de prostanoïdes y su rol en la modulación del tono vascular.

484. (649) TGF- β 1 PLASMÁTICO (TGF- β 1PL) Y β 1-MICROGLOBULINA URINARIA (β 1- μ GOR) EN ESTADIOS TEMPRANOS DE LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE (ADPKD). AZURMENDI PABLO J (1), SANTELHA STEFAN JOSÉ S (1), FRAGA ADRIANA R (1), GALÁN FELICITA (1), ARRIZURIETA ELVIRA E (1), MARTIN RODOLFO S (1,2)

(1) Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Fac de Med, UBA; (2) Hospital Universitario Austral

La evolución de ADPKD a insuficiencia renal crónica no puede predecirse en sus etapas tempranas. En esa fase de filtrado glomerular (FG) normal existen procesos inflamatorios/fibróticos poco conocidos, que pueden ser de utilidad para la patogenia y seguimiento clínico. En este trabajo estudiamos el comportamiento del TGF- β 1pl como índice de mecanismos fibróticos y α 1- μ Gor como marcador de daño tubular, que fueron comparados con valores de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y albúmina urinaria (ALBor). Se estudiaron 40 pacientes con ADPKD temprana (ADPKDt), de 26 ± 1 años, con FG estimado por MDRD (eFG) $> 80 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ y sin proteinuria, que fueron comparados con 20 controles (C) y con 6 pacientes con ADPKD avanzada (ADPKDa) con eFG < 80 y/o proteinuria ($> 300 \text{ mg/g Cror}$). Se consideró microalbuminuria (MAor) y proteinuria tubular (TPor) como $> 20 \text{ mg/g Cr}$ de ALBor y α 1- μ Gor respectivamente. TGF- β 1pl fue de $1328 \pm 261 \text{ pg/ml}$ en ADPKDt, comparado con 346 ± 53.9 en C ($P < 0.006$), con valores comparables de eFG (106 ± 3 vs. 111 ± 6 ; PNS). TGF- β 1pl ascendió a 4445 ± 1481 en ADPKDa, valor mayor que en los otros dos grupos ($P < 0.006$). En el análisis de los tres grupos se encontró correlación inversa entre TGF- β 1pl y eFG ($P < 0.001$), no encontrándose relación con el resto de los parámetros medidos. La ALBor y MCP-1 urinario fueron de $15.6 \pm 3.2 \text{ mg/g Cr}$ y $128 \pm 15 \text{ } \mu\text{g/g Cr}$ en ADPKDt, comparados con C ($4.5 \pm 0.4 \text{ mg/g Cr}$ y $67 \pm 10 \text{ } \mu\text{g/g Cr}$, respectivamente; $P < 0.002$). La α 1- μ Gor no fue diferente entre C y ADPKDt, y en dos pacientes del grupo ADPKDa se encontró TPor y MAor. En poliquistosis existe una activación de la fibrosis sistémica, efecto observado en enfermedades cardiovasculares crónicas, pero detectado en fases muy tempranas de ADPKD. La presencia de microalbuminuria no se debería a un daño tubular y podría explicarse por un origen glomerular. Los datos pueden contribuir al diagnóstico precoz de evolución en esta enfermedad.

485. (587) ROL PROTECTOR RENAL DEL PEPTIDO NARIURETICO ATRIAL SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA PROVOCADA POR SOBRECARGA AGUDA DE SODIO EN LA RATA. DELLA PENNA SILVANA LORENA, ROSON MARIA INES, GORZALCZANY SUSANA, PANDOLFO MARCELA, CAVALLERO SUSANA, TOBLI JORGE E., FERNANDEZ BELISARIO E.

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán

El péptido natriurético atrial (ANP) además de sus efectos hipotensores y natriuréticos, posee una acción antiinflamatoria. Anteriormente, demostramos que una sobrecarga aguda de sodio en ratas normales desencadena una respuesta inflamatoria túbulo-intersticial renal en ratas normales (Kidney Int., en prensa, 2006). Como objetivo evaluamos el efecto del ANP exógeno sobre la respuesta inflamatoria. Se infundieron ratas Sprague Dawley con una sobrecarga aguda de sodio 1.5M durante 2 hs. (0.04 ml/min), en ausencia y en presencia de ANP (1 y 5 $\mu\text{g/kg/h}$). Se evaluaron diversos marcadores de inflamación en tejido renal por inmunohistoquímica. El clearance de creatinina y la reabsorción tubular de sodio (mEq/min) aumentaron luego de la sobrecarga salina. (334.3 ± 18.7 vs Control: 209.6 ± 27.0 , $p < 0.05$), sin cambios en la presión arterial media. Este aumento fue inhibido por ANP 5 $\mu\text{g/kg/h}$ (228.9 ± 26.4 , $p < 0.05$). Se observó el incremento de marcadores de inflamación en el tejido renal con sobrecarga de sodio 1.5M, comparados con solución fisiológica: RANTES (%/mm²: $38.4.3 \pm 0.8$ vs 2.9 ± 0.6 , $p < 0.001$), TGF- β 1 (%/mm²: 35.3 ± 1.0 vs 5.0 ± 0.7 , $p < 0.001$), α -actina de músculo liso (%/mm²: 15.6 ± 0.7 vs 3.1 ± 0.3 , $p < 0.001$), NF-kappa-B (células/mm²: 9.4 ± 1.3 vs 2.2 ± 0.5 , $p < 0.001$), factor inducido por hipoxia (HIF-1 α) (células/mm²: 38.2 ± 1.7 vs 8.4 ± 0.8 , $p < 0.001$) y angiotensina II (%/mm²: 35.9 ± 1.3 vs 8.2 ± 0.5 , $p < 0.001$). Estos aumentos se inhibieron por ANP 5 $\mu\text{g/kg/h}$: RANTES (9.2 ± 0.5 , $p < 0.001$); TGF- β 1 (13.2 ± 0.7 , $p < 0.001$) y α -actina de músculo liso (4.1 ± 0.4 , $p < 0.001$). La inhibición por ANP se asoció con una menor activación de NF-kappa-B (3.2 ± 0.4 , $p < 0.001$), angiotensina-II (8.2 ± 0.5 , $p < 0.001$) y una disminuida hipoxia evaluada a través del factor HIF-1 α (8.4 ± 0.8 , $p < 0.001$). Los resultados muestran evidencias de un rol protector del ANP en la prevención de la inflamación renal, en ratas con sobrecarga aguda de sodio.

486. (637) ESTABILIZACIÓN DE LA NA+/K+-ATPASA POR HSP70 EN OMCD DURANTE LA RECUPERACIÓN POST DIETA HIPOPROTEICA. RUETE MARIA CELESTE, CARRIZO LILIANA, MANUCHA WALTER, VALLES PATRICIA IMBECU

La injuria renal por isquemia inducida por privación proteica compromete a las células de la médula externa (Vallés y col. Nephron Physiol 99(3):90-100, 2005). Estudios previos indican que sobreexpresión de HSP70 disminuye la disociación de Na+/K+-ATPasa (NKA) del citoesqueleto luego de la injuria por isquemia. El objetivo de este trabajo fue estudiar los niveles en el citoesqueleto de NKA en el modelo de dieta pobre en proteínas y su interacción con HSP70 durante la recuperación proteica. Materiales y Métodos: Ratas wistar hembras (n=8) destetadas, tres grupos: normoproteica por 14 días (24%, NP), hipoproteica (8%, LP) por 14 días y recuperación 14 días con 8% mas 14 días con 24% (RP). Las muestras se homogeneizaron en buffer con 0.1% de Tritón. Se analizaron los niveles de NKA y HSP70 por western blot. Se realizó coimmunoprecipitación de las proteínas. La actividad de NKA se midió en túbulos microdisecados, colectores corticales (CCD) y de la médula externa (OMCD). Resultados: Se observó aumento en la disociación de NKA en la fracción soluble como resultado de la dieta hipoproteica vs. control (196.5 ± 4.5 vs. 151 ± 5 , $p < 0.05$). Mientras que disminuyó la HSP70 en esta misma fracción de ratas desnutridas (179.3 ± 10.5 vs. 224.7 ± 1.85 , $p < 0.05$). La actividad de la NKA se redujo como resultado de la privación proteica vs. control (CCD, 42 ± 1.2 vs. 67 ± 1.5 ; OMCD, 24 ± 1.3 vs. 66 ± 0.90 , $p < 0.05$). Se observó la translocación de la HSP70 a la fracción de citoesqueleto injuriada por desnutrición y un aumento en la disociación de NKA por inhibición in vitro de la HSP70. La disociación de NKA fue revertida luego de la recuperación con incremento en los niveles de HSP70 en la fracción no asociada al citoesqueleto. Conclusiones: El aumento en la disociación de la NKA del citoesqueleto por desnutrición se revirtió in vivo asociado al aumento de HSP70, sugiriendo la participación de esta chaperona en la estabilización del citoesqueleto luego de recuperación proteica.

487. (675) IMPORTANCIA DEL TIEMPO Y LA MAGNITUD DE LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA ENDÓGENA EN LA EX-

CRECIÓN DE NA⁺ Y AGUA DURANTE LA EXPANSIÓN ISOTÓNICA DE VOLUMEN. DE LUCA SAROBE VERÓNICA (1,3), DI CIANO LUIS (1, 3), LEVIN GLORIA (2), ARRIZURIETA ELVIRA E. (1), IBARRA FERNANDO RAÚL (1)

Inst de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA (1), Area Fisiología, FCV, UBA (3) Htal de Niños R. Gutiérrez, CEDIE, CONICET (2)

Durante la expansión de volumen, el aumento de dopamina urinaria (DAu) por inhibición de las enzimas que la degradan, no siempre estuvo acompañado de incremento en la diuresis y natriuresis. Esto solo ocurrió cuando el aumento inicial de DA pudo ser incrementado con la inhibición de MAO (SAIC 2005). Para determinar si el aumento de diuresis y natriuresis durante la expansión isotónica moderada de volumen es mediado por la oferta inicial de DA renal, se estudiaron ratas Wistar machos (250-350 g PC) expandidas al 5% del PC con NaCl 0.9% durante 2 hs. Fueron divididas en 2 grupos: control (C) y benserazida (BZD, inhibidor de la formación de DA, 25mg/Kg i.v. pre-expansión). El grupo C en la 1er hora mostró un incremento inicial de DAu de 5.41 ± 0.31 a 10.69 ± 1.8 ng/15 min/100 gPC, $p < 0.05$, seguido por el aumento de diuresis: 35 ± 0.7 a 407 ± 7 μ l/15 min/100 gPC y natriuresis: 5 ± 0.1 a 84 ± 1 μ Eq/15 min/100 gPC (ambos $p < 0.01$). En cambio, en BZD la DAu se mantuvo significativamente más baja al inicio de la expansión: 0.96 ± 0.44 ($p < 0.001$) y la diuresis y natriuresis fueron menores que en C 270 ± 35 y 65 ± 13 , respectivamente, ambos $p < 0.05$. En la 2da hora, la DAu aumentó en BZD por sobre C 18.9 ± 2.7 vs 9.8 ± 3.6 , $p < 0.05$. Sin embargo la diuresis y natriuresis permanecieron menores en BZD vs C: 550 ± 127 y 85 ± 12 vs 787 ± 100 y 121 ± 20 , ambos $p < 0.05$. En el grupo BZD la administración exógena de DA en bolo (30μ g i.v.) en los últimos 15 min no modificó la excreción de Na⁺ y agua. Un grupo adicional de ratas BZD recibieron simultáneamente con la expansión DA exógena en infusión continua (1μ g/min). Este tratamiento tampoco restauró la excreción hidroelectrolítica comparado con C. Conclusión: el incremento en la oferta de DA endógena durante la expansión de volumen es necesaria para lograr una correcta respuesta de diuresis y natriuresis. Además requiere un perfil de tiempo y magnitud que se observa durante el inicio de la expansión.

488. (702) VIAS INTRACELULARES INVOLUCRADAS EN EL MECANISMO DE ACCION DE LA DOPAMINA EN EL TUBULO PROXIMAL RENAL: ACTIVACION DE LA PKCA POR EL ÁCIDO 20-HIDROXIEICOSATETRAENOICO (20-HETE). ACQUIER ANDREA (1), KIRCHHEIMER CAROLINA (2), MENDEZ CARLOS F. (1), NOWICKI SUSANA (2)

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA (1) Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET) (2)

Reportamos previamente la activación de la isoforma ζ de la Proteína Kinasa C (PKC ζ) por el ácido 20- hidroxieicosatetraenoico (20HETE) en la vía de transducción de señales de la dopamina (DA) en el túbulo proximal renal. Dado que esta isoforma es independiente de calcio y que la activación de receptores dopaminérgicos está asociada, entre otros, al aumento del calcio intracelular, nos propusimos estudiar si en el túbulo proximal la DA activa a la PKC α (una isoforma dependiente de calcio) y si el 20HETE interviene en este proceso. La activación de la PKC α se evaluó mediante el estudio de los cambios en su distribución intracelular. 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 (10μ M) o 20HETE (1μ M), se separaron las fracciones soluble (citósol) y particulada (membranas) por ultracentrifugación, y se determinó el contenido de PKC α por Western blot. Tanto la DA como el 20HETE promovieron la redistribución de PKC α desde la fracción soluble a la fracción particulada (cociente membrana/citósol: basal $0,51 \pm 0,07$; DA $0,79 \pm 0,07^*$ y 20HETE $0,87 \pm 0,09^*$).

El tratamiento con ABT inhibió el efecto de la DA, pero no el del 20HETE sobre la redistribución de PKC α (cociente membrana/citósol: basal $0,50 \pm 0,07$; DA $0,49 \pm 0,15$ y 20HETE $0,79 \pm 0,08^*$). $*p < 0,05$ vs. basal. Concomitantemente, hemos observado que el tratamiento con ABT atenúa el aumento del estado de fosforilación de la Na⁺,K⁺-ATPasa en respuesta a la estimulación por dopamina en células de túbulo proximal. Nuestros resultados sugieren que en respuesta al estímulo dopaminérgico el 20HETE promueve la redistribución de la PKC α del citósol hacia la fracción de membrana. Este evento facilitaría la fosforilación de la Na⁺,K⁺-ATPasa por esta kinasa, un paso necesario para la inhibición de la actividad de la bomba.

NEUROCIENCIAS III

489. (102) CUERPO CALLOSO EN LA IMAGEN DE RESONANCIA MAGNETICA DEL PLANO SAGITAL MEDIO: INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE DIFERENCIAS REGIONALES DE LA DISTANCIA ENTRE EL BORDE DORSAL Y VENTRAL. MERLO ALICIA BEATRIZ, ALBANESE ALFONSO MIGUEL, GÓMEZ ELENA, MIÑO JORGE, INGRATTA ADRIANA, MASCITTI TOMÁS, ALBANESE EDUARDO

Facultad de Medicina. Universidad del Salvador. (USAL); Facultad de Farmacia y Bioquímica.UBA; Facultad De Medicina.UBA.

La superficie y el perímetro del CC en la imagen de resonancia magnética del plano sagital medio (iRM-PSM) se modifican con la edad en ambos sexos (Merlo y col 2002; Albanese y col. 2003). La superficie incrementa de los 15 a los 40 años, es estable de los 41 a los 60 años y declina desde los 61 años. El perímetro incrementa entre 15 y 82 años a expensas del borde ventral (Merlo y col. 2006). Objetivo: determinar en iRM-PSM de ambos sexos por rangos de edad 17 distancias entre los bordes dorsal y ventral del CC para evidenciar probables diferencias regionales con el avance de la edad. Los estudios se realizaron en iRM-PSM digitalizadas de 99 casos diestros de ambos sexos de entre 17 y 84 años sin diagnóstico de patologías crónicas. Se midieron por el programa Scion Image for Windows 17 longitudes entre el borde dorsal y ventral del CC de segmentos radiales extendidos desde el punto medio de la recta base tangente a los puntos más ventrales del genu y splenio hasta el borde dorsal del CC que limitaban ángulos de 10° grados. Se calculó la media \pm ES de los valores de cada una de las 17 longitudes agrupadas por sexo y edad (17-40, 41-60 y 61-84 años). En ambos sexos con el avance de la edad disminuyen ($p < 0.01$ ANOVA) la totalidad de las longitudes a excepción de la más caudal correspondiente al selenio. En el grupo femenino las medias \pm es (cm) que ejemplifican longitudes de la región del genu, cuerpo y splenio son respectivamente 1.59 ± 0.10 ; 0.54 ± 0.02 y 1.04 ± 0.03 para la edad de 41-60 años, 1.13 ± 0.05 , 0.40 ± 0.02 y 1.01 ± 0.04 para la edad de 61-84 años.

490. (189) EJE HIPÓFISO GONADAL EN PACIENTES PORTADORES DE CEFALEA EN RACIMOS. FIGUEROLA MARÍA DE LOURDES, TALONE GABRIELA, ROPELATO MARÍA GABRIELA, LESTON JORGE, BARONTINI MARTA
CEDIE Hospital Santojani FLENI

El punto de vista actual de la patogénesis de la cefalea en racimos (CR) indica una disfunción primaria del sistema nervioso central con particular compromiso hipotalámico. La CR prepondera en hombres en los que existe una exacerbada virilidad somática observándose un aspecto masculinizado en las pocas mujeres que la padecen. Existiría un terreno biológico para esta distribución epidemiológica. Los esteroides sexuales modulan el sistema opioide endógeno y probablemente la nocicepción. Alguno de los efectos de los esteroides sexuales podría tener relevancia en los hallazgos clínicos y epidemiológicos así como en la modulación

del dolor en estos pacientes. El dosaje de hormonas sexuales en pacientes con CR ha dado resultados contradictorios. Por estas razones estudiamos el eje hipofiso-gonadal en pacientes de ambos sexos portadores de esta cefalea según los criterios diagnósticos de la International Headache Society. Hasta el momento incluimos 10 hombres (26 a 52 años) y 10 mujeres (20 a 38 años) con ciclos regulares. En estas últimas el estudio se realizó entre los días 2 y 5 del ciclo. Se determinaron testosterona, estradiol basales, LH y FSH basales y a los 30 y 60 minutos de la inyección iv de LHRH en todos los pacientes y progesterona basal en las de sexo femenino. De los hombres estudiados sólo uno mostró una respuesta inadecuada (exagerada) a la prueba. Con respecto a las mujeres surgen 2 grupos: uno (n=5) con respuesta normal y otro (n=5) con respuesta anormal (exagerada) a la prueba. Los 20 pacientes presentaron niveles normales de las otras hormonas estudiadas (estradiol, testosterona y progesterona, según protocolo). Estos resultados ponen en evidencia una alteración del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal en una importante proporción de las pacientes de sexo femenino.

491. (252) INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE LA EXTENSION DEL BORDE VENTRAL DEL CUERPO CALOSO EN LA IMAGEN DE RESONANCIA MAGNETICA DEL PLANO SAGITAL MEDIO. MERLO ALICIA BEATRIZ, ALBANESE ALFONSO MIGUEL, GOMEZ ELENA, MIÑO JORGE, MASCITTI TOMAS, INGRATTA ADRIANA, ALBANESE EDUARDO

*Facultad de Medicina. Universidad del Salvador. (USAL)
Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Facultad de Medicina. UBA.*

La superficie del cuerpo caloso (CC) en la imagen de resonancia magnética del plano sagital medio (IRM-PSM) disminuye significativamente después de los 60 años por reducción de sus partes, a excepción del splenio, mientras que el perímetro incrementa con el avance de la edad (15 a 82 años) (Merlo y col 2002; Albanese y col. 2003). El objetivo fue determinar si el incremento del perímetro del CC con el avance de la edad se realiza a expensas de la extensión del borde dorsal, del borde ventral, adyacente al ventrículo, o de ambos y si se observan diferencias regionales en este proceso. En iRM-PSM digitalizadas de 99 casos controles diestros de ambos sexos de 17 a 84 años de edad se midieron los bordes dorsal y ventral del CC tomando como límites los puntos más ventrales del genu y del splenio y 17 distancias entre ambos bordes que pertenecían a segmentos radiales que se extendían desde el punto medio de la recta tangente a los puntos más ventrales del genu y del splenio, hasta el borde dorsal del CC y limitaban entre ellos ángulos de 10°. Se midió el segmento V entre los puntos más distantes del borde interno del CC como referente de la extensión de la cavidad ventricular. Se utilizó para las mediciones el programa Scion Image for Windows. Con el avance de la edad sólo el borde ventral incrementa (r de Pearson: 0.48 p < 0.001 y 0.56 p < 0.001 en el grupo masculino y femenino respectivamente). La diferencia porcentual entre ambos bordes disminuye mientras que V aumenta (r: 0.40 p < 0.03 y 0.56 p < 0.001 para el grupo masculino y femenino). Las 17 distancias entre los bordes disminuyen significativamente (ANOVA) con la edad a excepción de la correspondiente al splenio. Los resultados sugieren que el incremento del perímetro del CC con el avance de la edad se debe al aumento del borde ventral que, solidario con el agrandamiento de la cavidad ventricular adyacente, se acerca al dorsal en toda la extensión del CC a excepción del splenio.

492. (362) EL ESTRÉS PRENATAL MEJORA EL DESEMPEÑO DE RATONES EN PRUEBAS COMPORTAMENTALES. LA MELATONINA LO SUPRIME. PALLARÉS MARÍA EUGENIA, COMASTRI LUCÍA, SCACCHI PABLO, SCHMUKLER JUAN, PENA REQUEJO RAVE RAMIRO ANTONIO, BRUNO VERÓNICA ANDREA, CUTRERA RODOLFO ANGEL

Laboratorio de Neurobiología y Ritmos. Dpto de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA

La exposición a agentes estresantes durante las últimas semanas de gestación afecta el desarrollo del sistema nervioso de la descendencia, induciendo alteraciones comportamentales a largo plazo. Por otra parte, la melatonina ha demostrado poseer propiedades cito y neuroprotectoras. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos del estrés prenatal sobre las crías. Concomitantemente, se analizó el rol de la melatonina sobre dicho estrés, a través de dos pruebas comportamentales que evaluaban la coordinación neuromuscular (cuerda floja, tight rope) y la actividad exploratoria (laberinto en T), al primer y segundo mes de vida. Ratonos de la cepa Swiss, recibieron tres sesiones diarias de inmovilización de 45 minutos cada una, durante la fase de luz, a partir del día 15 de gestación. La melatonina era suministrada en el agua de bebida (25 mg/l) desde el día 7 de preñez hasta el parto. El grupo que recibió estrés prenatal (E) presentó un mejor desempeño en la cuerda floja al primer mes (Mann Whitney, P=0.074) respecto del grupo control (C). Esto perduró en el tiempo y fue más marcado en las hembras (Mann Whitney, P < 0.001). Del mismo modo, el grupo E obtuvo la mayor proporción de éxito en cumplir el laberinto en T (C: 78%, E: 92%. Chi Cuadrado P < 0.05 al primer mes; C: 40%, E: 100 %. Chi Cuadrado P < 0.001 al segundo mes). Contrariamente, los animales que recibieron estrés y melatonina (E+M) presentaron un peor desempeño en el test de cuerda floja respecto del grupo E (Mann Whitney, P < 0.05) y una menor actividad exploratoria tanto al primer (E + M: 50% Chi Cuadrado P < 0.01) como al segundo mes de vida (E+M: 61%. Chi Cuadrado P < 0.05). Estos resultados sugieren un efecto benéfico del estrés prenatal sobre el desarrollo neuromuscular y una respuesta más eficiente frente a situaciones novedosas. Por otra parte, dado el mal desempeño observado en los animales tratados con melatonina, se sugiere un efecto supresor de ésta sobre los efectos inducidos por el estrés.

493. (369) LATERALIZACION Y LOCALIZACION DEL LENGUAJE Y LA MEMORIA EN PACIENTES CON EPILEPSIA DEL LOBULO TEMPORAL EVALUADOS CON RESONANCIA MAGNETICA FUNCIONAL. ODDO SILVIA, SOLIS PATRICIA, MARINA ROMANO, CONSALVO DAMIAN, GOLIMSTOK ANGEL, ELETA MARTIN, KOCHEN SILVIA

Centro de Derivacion de Epilepsia. Division Neurologia. Hospital Ramos Mejia. Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. Eduardo De Robertis". Facultad de Medicina. CEFYBO. Universidad de Buenos Aires. CONICET. Servicio de Neurologia. Hospital Italiano. Buenos Aires. TCBA.

La Resonancia Magnética Funcional (RMf) ha tomado un significativo impulso en estos últimos años. Este método contribuye a establecer el hemisferio dominante para el lenguaje (L) y aproximar su localización anatómica. Además resulta una valiosa herramienta en la evaluación de la memoria (M). El objetivo del presente estudio es establecer la metodología adecuada para analizar las funciones de L y M en los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal y esclerosis hipocámpal, candidatos a cirugía. Metodología aplicada. Se analizaron 7 pacientes (p) que consultaron en el Centro de Epilepsia. Se realizó una RMf con los siguientes paradigmas de evaluación: Lenguaje: comprensión de oraciones leídas, respuesta de denominación a lectura, denominación de figuras, completamiento de oraciones, fluencia verbal. Memoria: Se evaluó especialmente la memoria episódica mediante codificación de tareas explícitas y el test de reconocimiento posterior. Las tareas incluidas fueron pares asociados, aprendizaje serial de una lista de palabras, memoria lógica en forma de preguntas, aprendizaje de diseños abstractos. El procedimiento se realizó en dos tiempos. Los pacientes fueron entrenados 24/48 hs. antes de la toma de las imágenes. Se pudo establecer la localización del lenguaje (concordancia con hemisferio dominante) en el 100% de los casos. Memoria: En 2 p. no se observó respuesta

al paradigma utilizado, en 2 p. se estableció una correlación con la memoria material-específica y la localización hemisférica, y en 3 p. no se pudo determinar una correlación, observándose activación de ambos hemisferios para el paradigma planteado. Conclusión: Con los paradigmas utilizados logramos localizar áreas del lenguaje, la función memoria resultó menos definida. Este método no cruento resulta promisorio para la investigación de las funciones cognitivas en el ser humano. Es imprescindible contar con mayor número de pacientes para obtener resultados más determinantes.

494. (396) IMPLICACIÓN DEL COMPLEJO MAMILAR EN UNA TAREA DE MEMORIA DE TRABAJO ESPACIAL EN RATAS. GALEANO PABLO (1), RUBIO SANDRA (2), BLANCO EDUARDO (3), BEGEGA AZUCENA, MÉNDEZ MAGDALENA (3), MÉNDEZ LÓPEZ MARTA (3), ARIAS JORGE LUIS (3)

Facultad de Psicología, Universidad de Buenos Aires, Argentina (1) Facultad de Psicología, Universidad Autónoma de Madrid, España (2) Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Psicología, Universidad de Oviedo, España (3)

El complejo mamilar (C.M.) constituye un conjunto de núcleos localizados en el hipotálamo posterior asociados con el síndrome de Korsakoff y la demencia de Alzheimer. Investigaciones recientes vinculan estos núcleos con la memoria de trabajo. Objetivo: establecer el grado de actividad funcional de cuatro núcleos del C.M. (el núcleo mamilar medial-medial, el núcleo mamilar medial-lateral, el núcleo mamilar lateral y el núcleo supramamilar) en una tarea de memoria de trabajo espacial (MTE). Materiales y métodos: 29 ratas macho adultas (cepa Wistar) se distribuyeron en 3 grupos: 1) un grupo entrenamiento (GE, n=12) realizó una tarea de MTE en una piscina de Morris (5 días, 3 ensayos x día); 2) un grupo control nadó (GCN, n=9) nadó un tiempo similar al GE sin realizar la tarea de memoria y 3) un grupo control caja (GCC, n=8) que no fue manipulado. Los animales fueron sacrificados y el cerebro congelado en isopentano a -40 °C. Se obtuvo un muestreo completo del C.M. en secciones coronales de 30 µm con un criostato (Leica, CM1900, Alemania). Las secciones fueron teñidas por histoquímica para la citocromo c-oxidasa y cuantificadas por densitometría (Leica Q550 IW). Resultados: el GE resolvió exitosamente la tarea de MTE mostrando una disminución significativa de la latencia de escape y la distancia nadada en los ensayos de retención respecto a los ensayos de muestra (p< 0,0005 en ambos casos). En el GE se observó un aumento significativo de la actividad de la citocromo c-oxidasa en los cuatro núcleos del C.M. respecto a los GCN y GCC (p< 0,001, en todos los casos). Los GCN y GCC no se diferenciaron significativamente. Conclusión: estos resultados permiten afirmar que los núcleos del C.M. estudiados tienen una participación activa en los circuitos cerebrales que subyacen a la memoria de trabajo espacial. La ausencia de diferencias entre los GCN y GCC permite descartar la influencia de factores inespecíficos, como la actividad motriz y/o el estrés.

495. (408) LA COTININA ATENÚA LOS EFECTOS DE LA ABSTINENCIA NICOTÍNICA EN EL CAMPO ABIERTO. SASSONE ADRIANA H. (1), PIÑEIRO ADRIANA E. (1), QUIROGA PATRICIA N. (1), SARCHI MARÍA I. (2), ROSES OTMARO E. (1), LÓPEZ CLARA M. (1)

Cátedra de Toxicología y Química Legal-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (1) Cátedra de Matemáticas-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (2)

El síndrome de retirada observado en ratas después de que cesa la administración continua de nicotina (NI) por vía subcutánea se caracteriza por una disminución de la motilidad y otros cambios comportamentales. Con la finalidad de determinar si la cotinina (COT), principal metabolito NI, afecta la abstinencia nicotínica puesta de manifiesto en la actividad motora espontánea de los roedores en el campo abierto, se administró NI a ratas Sprague Dawley durante 4 meses y se reemplazó por COT durante 24 h. Se utilizaron 24 ratas (machos adultos), divididas

en 3 grupos (16 tratadas y 8 controles) que recibieron una dieta convencional y condiciones de bioterio según normas OECD. La NI se administró en el agua de bebida a la dosis de 10 mg/kg/día. La actividad motora se midió en un equipo OPTO-VARIMEX al final del tratamiento, antes y después de reemplazar la NI por agua de red y por COT (12 mg/kg/día). Se utilizó el análisis de varianza de 1 factor y a posteriori el test estadístico de Student-Newman-Keuls. El reemplazo de NI por agua durante 24 h disminuyó significativamente los siguientes movimientos en el campo abierto: movimientos verticales, movimientos ambulatorios totales, conteo horizontal, distancia recorrida total, tiempo ambulatorio, movimientos estereotipados naturales y sucesión de movimientos estereotipados (p < 0,01). El rango de disminución estuvo entre el 35% y el 54%. El tiempo de descanso aumentó el 75% (p < 0,01). El reemplazo de NI por COT atenuó la disminución de los movimientos inducidos por la ausencia de NI (rango: 20-26%) (p< 0,05), así como el aumento en el tiempo de descanso (33%) (p< 0,05). La COT participa en el síndrome de retirada de la NI, atenuando los signos provocados por la ausencia de este alcaloide durante 24 h.

496. (419) EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL: ESCLEROSIS HIPOCAMPAL Y ESCLEROSIS HIPOCAMPAL PLUS, SUBGRUPOS DIFERENTES? GIAGANTE BRENDA, ODDO SILVIA, CONSALVO DAMIAN, SILVA WALTER, D'ALESSIO LUCIANA, IBARRA VIVIANA, PAPAYANNIS CRISTINA, KAUFFMAN MARCELO, SAIDON PATRICIA, KOCHEN SILVIA

Centro de Referencias de Epilepsia, Div Neurología, HIGA JM Ramos Mejía. Inst de Biología Celular y Neurociencias Prof Dr Eduardo de Robertis.UBA CONICET CEFYBO

Objetivo: Determinar si existen diferencias entre las manifestaciones clínicas ictales y postictales de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELT) y esclerosis hipocampal pura (EH), y pacientes con EH asociada a anomalías del polo temporal (EH Plus), evidenciadas por imágenes de resonancia magnética. Material y Método: Revisamos los registros de video-EEG ictales de pacientes con ELT y EH, y de pacientes con ELT y EH-Plus, en los que se realizó una lobectomía temporal. Analizamos las manifestaciones clínicas ictales y postictales, y la secuencia de aparición de los síntomas en los primeros 30 segundos de las crisis. Resultados: Analizamos 56 crisis en 21 pacientes. Los pacientes fueron clasificados en 2 grupos: grupo 1-EH (16 pacientes, 36 crisis), y grupo 2-EH-Plus (5 pacientes, 20 crisis). Las auras más frecuentes fueron: Pacientes grupo 1: cesación epigástrica (50%) y miedo (25%), y pacientes grupo 2: sensación epigástrica (40%), miedo (40%) y "deja vu" (40%). Las manifestaciones clínicas más frecuentes observadas en las crisis fueron: grupo 1: inmovilidad (86%), automatismos oro-alimentarios (72%), automatismos manuales repetitivos (67%), mirada fija (64%); grupo 2: automatismos oro-deglutorios (65%), automatismos manuales repetitivos (55%), mirada fija (45%). La secuencia de manifestaciones clínicas más frecuente en el grupo 1 fue: inmovilidad-mirada fija-automatismos manuales repetitivos. No encontramos ninguna secuencia clínica específica en el grupo 2. Conclusiones: Estas observaciones sugieren que los pacientes con EH y EH-Plus tendría redes neuronales diferentes involucradas en las crisis. Determinar el grado de compromiso que presentan las anomalías observadas en áreas cercanas al hipocampo en la generación de las crisis, podría ser relevante en la decisión del tipo de cirugía a realizar (lobectomía temporal anterior vs. amígdalo-hipocampectomía).

497. (422) RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS DEL NÚCLEO ACCUMBENS Y LA AMÍGDALA BASOLATERAL MODULAN LATERALIZADAMENTE LA CONDUCTA EXPLORATORIA EN RATAS. ALVAREZ EDGARDO O., BANZAN ARTURO M.

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

Evidencias previas de este laboratorio han mostrado que la exploración de un ambiente "conflictivo" depende de la activación

de neuronas histaminérgicas del núcleo accumbens (ACC) y la amígdala basolateral (ABL) en la rata. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los posibles receptores histaminérgicos que podrían participar en esta respuesta. Para ello se trabajó con ratas implantadas simultáneamente con cánulas de microinyección en los núcleos accumbens y amigdalinos del hemisferio derecho e izquierdo. Grupos de ratas ($n=9-17$), fueron microinyectadas con 9, 45 y 90 nmol de pirilamina (PYR, antagonista histaminérgico H1) o ranitidina (RAN, antagonista histaminérgico H2) junto con 45 nmol de histamina (HA) en el ACC y ABL izquierdos o en el ACC y ABL derechos. Cinco minutos después, a todos los animales se les evaluó la conducta exploratoria en el Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico por 5 minutos. Los resultados mostraron presencia de lateralidad exploratoria en los brazos "Una Pared" y "Alto y Bajo" (40.5 ± 7 seg Vs 3 ± 2 seg, Sal Vs HA, lado izquierdo, $p < 0.01$; 44.2 ± 4.1 seg Vs 33.3 ± 4.8 seg, Sal Vs HA, lado derecho, n.s.; brazo "Una Pared"; derecho Vs izquierdo, $p < 0.01$). En el hemisferio izquierdo, la estimulación selectiva con HA del receptor H2 cuando el receptor H1 estaba bloqueado con PYR, no modificó la inhibición histaminérgica. En el lado derecho, inhibió significativamente la exploración (33.3 ± 4.8 seg Vs 11 ± 4.9 seg, Sal+HA Vs PYR45+HA, $p < 0.01$). En el hemisferio izquierdo, la estimulación selectiva con HA del receptor H1 cuando el receptor H2 estaba bloqueado con RAN, no modificó la inhibición histaminérgica. En el lado derecho, no hubo cambios con respecto al control o al grupo con HA. Los resultados sugieren una compleja lateralidad de los receptores histaminérgicos en el ACC y ABL, con efectos opuestos en la exploración según el hemisferio estimulado.

498. (442) NIVELES DE PROLACTINA EN PACIENTES ESQUIZOFRENICOS TRATADOS CON ZIPRASIDONA. ZELASCHI NORBETO M., QUEIPO GLADYS, RODRIGUEZ JUANA L., GAITAN SERGIO, PALACIOS VALLEJOS MARIA E., ZIEHER LUI S M.

Hospital Dr. Alejandro Korn

Objetivos: presentar evidencia del posible efecto hiperprolactinémico del antipsicótico atípico (AA) ziprasidona en pacientes con trastornos esquizofrénicos de sexo femenino. Método: Se estudió un grupo de siete pacientes con diagnóstico de esquizofrenia (Criterio DSM IV), hospitalizadas, quienes recibieron como único tratamiento antipsicótico ziprasidona (rango de dosis = 60-180 mg/d); se realizaron seis dosajes de prolactina (PRL) en ayunas a las 8 hs. a.m. con el método ELISA de inmunoenzaimoensayo, a intervalos fijos de diez días. A los dos meses se cacularon los resultados. Resultados: los datos se expresan en promedio (± 1 DS) y se utilizó la prueba U de Mann-Whitney; primero se hallaron los promedios individuales parciales de PRL por paciente; un grupo de comparación compuesto de mujeres sin patología [GC, $n = 11$, edad promedio = 50 (9.74); PRL = $8.37(4.11)$ ng/ml], fue cotejado con el promedio total, resultante de la sumatoria de los promedios parciales de PRL del grupo experimental [GE, $n = 7$, edad promedio = 44 (11.34); PRL = $56.30(31.62)$ ng/ml]. No alcanzo a haber diferencia significativa entre las edades ($U = 57$, $p > 0.05$), pero sí entre los valores de PRL, $U = 77$, $p < 0.001$. Conclusiones: la información de este estudio sugiere, que aún luego de un seguimiento relativamente prolongado a dosis terapéuticas, la ziprasidona produce hiperprolactinemia en pacientes psicóticas de sexo femenino.

499. (463) DIFERENCIAS CLÍNICAS EN LA EFECTIVIDAD DE ANTIPSICOTICOS ATÍPICOS (BLOQUEANTES D2-5HTA2) EN LA ESQUIZOFRENIA. ZELASCHI NORBETO M., QUEIPO GLADYS, RODRIGUEZ JUANA L., GAITAN SERGIO, PALACIOS VALLEJOS MARIA E., ZIEHER LUIS M.

Hospital Dr. Alejandro Korn

Objetivos: Mostrar evidencia complementaria, sobre la efectividad comparativa de diferentes antipsicóticos atípicos (AA) durante un año de seguimiento sin interrupción. Método: Se estudió un grupo de cincuenta y un pacientes con trastornos esquizofrénicos

hospitalizados (Criterio del DSM IV) en un sector de seguimiento a largo término y con al menos tres hospitalizaciones previas. Escalas de evaluación utilizadas, criterio de inclusión y de falta de efectividad: se usó la escala CGI (Clinical Global Impresión); todos los pacientes habían sido previamente sometidos al menos una vez a dosis de entre 40-60 mg/d en equivalentes de haloperidol, y el valor crítico de falta de efectividad fue de 7 puntos en la CGI. Resultados: los datos se expresan en promedio (± 1 DS). La prueba de X2 fue utilizada para comparar los éxitos vs. los fracasos del tratamiento. De los 51 pacientes estudiados, 12 fueron elegibles para la Clozapina, 14 para la Risperidona, 14 para la Olanzapina y 13 para la Ziprasidona. El rango de edades fue de entre 30-70 años. El rango de dosis utilizado fue el siguiente = Cloz = 150-500mg/d, Ris = 2-8 mg/d; Olan = 20-40 mg/d; Zipras = 60-180 mg/d. Efectividad vs. falta de efectividad: el primer número junto al nombre de la droga indica la n para la respuesta terapéutica efectiva. Cloz = 12:0; Ris = 9:5; Olan = 3:10; Zipras = 2:10. Prueba de X2 = 45.325, $p < 0.0001$ Conclusiones: Estos resultados sugieren la falta de similitud en la efectividad de los diferentes AA y confirman previas observaciones propias de la mejor respuesta a la Cloz en los pacientes resistentes al tratamiento.

500. (493) EFECTO DE LA MELATONINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RESACA ALCOHÓLICA. DIFERENCIAS ENTRE SEXOS. BRUNO VERÓNICA ANDREA, SCHMUKLER JUAN, COMASTRI LUCÍA, SCACCHI BERNASCONI PABLO A., PENA REQUEJO RAVE RAMIRO, PALLARÉS MARÍA E., CUTRERA RODOLFO A.

Laboratorio de Neurobiología y Ritmos. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA

El alcohol (OH) ejerce gran parte de sus efectos deletéreos mediante la producción de radicales libres. Sus consecuencias se expresan tanto en el momento de intoxicación aguda como cuando los niveles del tóxico en sangre ya son indetectables (comienzo del "hangover" o resaca). Por otra parte, la melatonina (MT) ha demostrado ejercer múltiples acciones neuroprotectoras y antioxidantes. El objetivo del siguiente trabajo fue analizar la coordinación neuromuscular durante el período de resaca en el modelo de cuerda floja (tight rope) y evaluar el posible rol protector de la MT en ratones de ambos sexos. Los ratones, pertenecientes a la cepa Swiss, recibieron pre-tratamiento con MT (10 mg/kg i.p.) o solución salina y quince minutos después el tratamiento con etanol (3.8 g/kg de una solución al 15% m/v). A las seis horas (alcoholemia = 0 mg/dl), fueron evaluados en el test de la cuerda floja puntuándose su desempeño. Los datos fueron analizados utilizando el test estadístico de Mann Whitney. En hembras, el desempeño de los tratados con OH fue inferior respecto a los controles ($p=0,001$); y a su vez, los animales pre-tratados con MT mostraron deficiencias aún mayores en relación a los tratados sólo con etanol ($p=0,016$). Por otra parte, los machos inyectados con OH mostraron un desempeño similar al observado en las hembras ($p=0,009$). El pre-tratamiento con MT mejoró el rendimiento de los tratados con OH ($p=0,027$). La comparación entre ambos sexos mostró lo siguiente: mientras que la MT mejoró el desempeño en los machos, lo empeoró en las hembras ($p=0,001$). Nuestros resultados sugieren que la MT ejerce un efecto diferencial, produciendo una importante mejoría en los machos, pero exacerbando los efectos deletéreos de la resaca sobre la coordinación neuromuscular en las hembras.

501. (640) KETOCONAZOL ADMINISTRADO INTRACEREBROVENTRICULARMENTE INHIBE LA CONDUCTA SEXUAL EN LA RATA HEMBRA. CABRERA RICARDO, BALMACEDA VALERIA, LACONI MYRIAM

Laboratorio de Investigaciones Neuroquímicas Comportamentales y Endócrinas (LINCE)

Los neuroesteroides son esteroides sintetizados de novo en el cerebro. La síntesis de los neuroesteroides por parte de las células de la glía, involucra la participación de la enzima citocromo

P450 scc que cataliza la transformación de colesterol en pregnenolona (el paso limitante en la biosíntesis). Dicha enzima es inhibida por ketoconazol (Keto) Previamente, demostramos que de los niveles séricos de LH disminuyen significativamente posterior a la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de ketoconazol 0.45 µg/µl en ratas hembras ovariectomizadas e impregnadas con estrógeno (E) 25mg/rata y progesterona (P) 1mg/rata (OVXep). El objetivo fue estudiar los efectos de Keto (i.c.v.) a diferentes concentraciones sobre el comportamiento sexual de la rata hembra OVXep. Utilizamos ratas de la cepa Sprague Dawley adultas OVXep. E y P fueron administradas vía subcutánea 48hs y 4hs previas al experimento. El Keto 0.45 µg/µl (n=9); 0.8 µg/µl (n=8) y 1.6 µg/µl (n=8), se administró i.c.v. A los animales controles (n= 8) OVXep se les administró LCR artificial. A los 90 minutos posterior la administración de Keto se evaluó la conducta sexual mediante el test de cópula durante 10 minutos sobre un total de 10 montas. Los resultados se expresaron en % lordosis/monta y analizados mediante el test de ANOVA1 seguido de Student-Newman Keuls (P< 0.05 fue considerado significativo). Observamos una disminución significativa en el índice lordosis/monta en relación con el aumento de la concentración de Keto (0.45 µg/µl: 0,87 ±0,24, P < 0.05; 0.8 µg/µl: 0,55± 0,56, P <0.001; 1.6 µg/µl: 0,55± 0,34, P<0.001 vs el grupo control: 89.2± 2.4). Estos resultados nos sugieren que la inhibición de la neuroesteoidogénesis a nivel glial modificaría los mecanismos regulatorios a nivel central que median la conducta sexual en la rata hembra; sugiriendo fuertemente que la neuroesteoidogénesis endógena estaría cumpliendo un rol significativo en la regulación de la reproducción de la rata hembra.

502. (642) EL ELEFAVIRENZ MODIFICA LOS PARÁMETROS CIRCADIANOS DE ACTIVIDAD DE RUEDA EN EL HÁMSTER DORADO. SCACCHI BERNASCONI PABLO ANTONIO, SCHMUKLER JUAN, COMASTRI LUCIA, BRUNO VERÓNICA ANDREA, CARDINALI DANIEL PEDRO, CUTRERA RODOLFO ANGEL

Lab. de Neurobiología y Ritmos. Dto. Fisiología. Facultad de Medicina. Lab. Neurociencias. Dto. Fisiología. Facultad de Medicina

El efavirenz (EFZ) es un inhibidor de la transcriptasa reversa no-nucleósido usado en el tratamiento de la infección por HIV-1. Sin embargo, uno de los efectos no deseados son los trastornos del sueño. En mamíferos, los ciclos sueño-vigilia están controlados por los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), sensibles a estímulos fóticos y no fóticos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos del EFZ sobre el ritmo de actividad locomotora en el hámster dorado. Hámsteres machos de 3 meses de edad recibieron una sola dosis de EFZ (250mg/kg en 0.1ml de 0.5% de metilcelulosa, Grupo EFZ) o su vehículo (grupo CTRL) a diferentes tiempos circadianos (CT): 6, 12, 17 ó 22 (CT12 comienzo de la actividad) por medio de sonda esofágica, luego de 3 semanas en oscuridad constante. Se registró la actividad en rueda, analizándose los distintos parámetros en paquetes de 5 minutos durante los 7 días previos al tratamiento y los 7 días posteriores al mismo. El análisis de los comienzos de actividad mostró una diferencia en los animales tratados con EFZ a CT17 con respecto a los tratados a CT12, sufriendo un retraso marcado a CT17 (p=0,025) ANOVA-TUKEY. Con respecto al período del ritmo de actividad, también se observaron diferencias a CT17 siendo éste menor que a CT12 y a CT7 (p=0,002) ANOVA-TUKEY. La acrofase y la amplitud presentaron diferencias significativas globales respectivamente (p=0,011; p=0,044). En el caso de ésta última, el EFZ aplicado a CT17 reveló una mayor amplitud respecto de CT12 (p=0,031). Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con EFZ puede alterar ciertos parámetros claves, como la actividad. Esto podría deberse a algún efecto sobre los NSQ ya que las alteraciones descritas difieren según el momento en que la droga es administrada. Estas observaciones podrían tener implicancia en mejorar la calidad del sueño en pacientes infectados con HIV.

ONCOLOGÍA VI

503. (263) RECEPTORES DE PROGESTERONA DE MEMBRANA CLÁSICOS Y NO CLÁSICOS EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS. EFECTOS AGONISTAS NO GENÓMICOS DE RU486. BOTTINO MARÍA CECILIA, MONDILLO CAROLINA, PIGNATARO OMAR, LUTHY ISABEL, AMORNPHIMOLTHAM PANOMWAL, MOLINOLO ALFREDO A, GUTKIND SILVIO, LANARI CLAUDIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental, National Institutes of Health (NIH)

Hemos demostrado previamente la existencia de receptores de progesterona (RP) con 2 afinidades diferentes y la presencia de ambas isoformas de RP en fracciones altamente purificadas de membrana de carcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona, MPA. La presencia de sitios que unen a progesterona en la membrana celular fue expuesta también utilizando progesterona acoplada a BSA-FITC. El objetivo de este trabajo fue determinar si, además, las células de cáncer de mama expresaban los receptores no clásicos de la familia de 7 pasos transmembrana, mPR alfa, beta y gama. También quisimos evaluar el efecto de MPA y del antagonista RU 486 sobre la activación de MAPK p44/p42 y la producción de AMPc. Con este fin utilizamos las líneas celulares MC4-L5 y MC4-L2 y un tumor hormono-dependiente (HD). Por real time PCR se determinó la presencia de los 3 tipos de receptores noveles además de RP clásico. El tratamiento con RU 486 10⁻⁸M a tiempos cortos indujo un aumento de AMPc (RIA) y fosforilación de MAPK (Western Blot e Inmunoquímica) similar a los obtenidos en presencia de MPA. Como ejemplo, en incubaciones de 1 minuto: Control: 788 ± 136 vs MPA 10⁻⁸M: 1396± 216 (RIA, p< 0.05) y RU 486 10⁻⁸M: 1259±400 fmoles AMPc. El efecto observado es aún mayor en presencia de ambas sustancias. Teniendo en cuenta que ambos compuestos ejercen un efecto antagónico sobre la proliferación celular, sugerimos que estos fenómenos no genómicos actuarían sensibilizando a la célula para efectos posteriores, probablemente genómicos, relacionados con proliferación. Desconocemos aún cómo los RP noveles interfieren con la señalización del RP clásico.

504. (356) LA DESMOPRESINA (DDAVP) REDUCE LA COLO-NIZACIÓN METASTÁSICA DE CÉLULAS DE MELANOMA B16 EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN EL INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEASAS-1 (TIMP-1). RIPOLL GISELLE V., FARINA HERNÁN G., GOMEZ DANIEL E., ALONSO DANIEL F.

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes

DDAVP es un análogo sintético de vasopresina capaz de incrementar los niveles plasmáticos del factor de von Willebrand, el factor VIII de la coagulación y el activador tisular del plasminógeno. DDAVP ha sido empleada como hemostático durante la cirugía para prevenir el sangrado en pacientes con defectos de la coagulación. Previamente, demostramos que la administración perioperatoria de DDAVP inhibe la diseminación hacia ganglios axilares y metástasis a distancia en un modelo murino de cáncer mamario. En este trabajo, investigamos el efecto de DDAVP sobre la colonización pulmonar experimental de células de melanoma B16 utilizando un modelo animal transgénico caracterizado por la liberación hacia sangre de altos niveles de TIMP-1 (486 a 548 ng/ml). Se emplearon ratones transgénicos híbridos C57BL/6j-CBA que sobreexpresan la secuencia humana del TIMP-1 en hígado bajo el control del promotor/enhancer de albúmina murina. La administración de 2 dosis de DDAVP de 50 ng/ratón (2 µg/kg), la primera al momento de la inocular endovenosa de las células B16 (100.000 células/ratón) y la segunda 24 horas más tarde, redujo significativamente la formación de metástasis pulmonares en los animales transgénicos (Control: 69 ± 18 versus DDAVP: 29 ± 6 nódulos/ratón; p=0.021). Por el

contrario, no se observó un efecto antimetastásico significativo de la DDAVP en los ratones híbridos no transgénicos. La acción observada no se asoció con un efecto citotóxico directo in vitro de DDAVP sobre las células tumorales en concentraciones comparables a las usadas in vivo (50 a 250 ng/ml) y no se detectó la expresión de receptores de vasopresina en el melanoma B16. Los resultados sugieren que DDAVP sería capaz de interferir la colonización metastásica de las células de melanoma a través de un mecanismo indirecto en los animales transgénicos. Los altos niveles del inhibidor proteásico TIMP-1 en sangre desplegarían una acción antitumoral cooperativa con el efecto de la DDAVP.

505. (367) PAPEL DEL FGF2 Y DE LOS RECEPTORES FGF EN EL CRECIMIENTO HORMONO-INDEPENDIENTE EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE MAMA MURINO. CERLIANI JUAN PABLO, GIULANELLI SEBASTIÁN, LAMB CAROLINE, GÓNGORA ADRIÁN, BALDI ALBERTO, LANARI CLAUDIA

IBYME

Carcinomas mamarios murinos hormono-dependientes (HD) por presión selectiva dan origen a variantes hormono-independientes (HI). Hemos sugerido que fibroblastos estromales de tumores HI producen mayor cantidad de FGF-2 que el estroma del tumor HD, participando así en el crecimiento HI activando receptores de progesterona (RP) del parénquima tumoral. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los 4 receptores de FGF (FGFR) que podrían mediar la acción de FGF2 y su participación en el "bypass" hormonal por la activación de RP. Usando los tumores C4-HD y C4-HI, se demostró por western blot (WB) la expresión de FGFR-1, 2, 3, 4 en el tumor HI, siendo más notoria la expresión de FGFR-2 y FGFR-3. Se detectó activación en éste último al ser revelado con un anticuerpo específico para p-Tyr FGFR-3. La expresión de los 4 receptores fue casi nula en C4-HD sin MPA y aumentó con MPA ($p < 0.05$) evidenciando también activación del FGFR-3. Estudios de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia revelaron además marcación nuclear en el parénquima tumoral. En cultivos mixtos de células epiteliales y estromales del tumor C4-HI, la incubación con un anticuerpo bloqueante de FGF inhibió la proliferación celular (timidina tritiada) (control: 5992 ± 1096 cpm, Ac-FGF: 2364 ± 1188 cpm, $p < 0.05$) y la activación de RP (electrophoretic mobility shift assays, EMSA). Estos estudios demuestran que el FGF2 estromal está involucrado en el crecimiento HI y sugieren que FGFR-2 y FGFR-3 podrían ser blancos terapéuticos para inhibir el crecimiento HI.

506. (368) REVERSIBILIDAD DE LA HORMONO RESISTENCIA EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA COMBINADA A ESTRÓGENOS Y MIFEPRISTONA (MIF) EN TUMORES SENSIBLES Y RESISTENTES. WARGON VICTORIA, PAOLA ROJAS, JULIETA BOLADO, CLAUDIA LANARI

IBYME

Carcinomas mamarios murinos inducidos por progestágenos, de crecimiento hormono-independiente, regresionan con MIF (antiprogestágeno) o 17- β -Estradiol (E2). El tumor C4-HI regresiona lentamente induciendo diferenciación celular. Hemos desarrollado, por presión selectiva, una variante resistente a MIF (C4-HIR) que tiene muy baja expresión de la isoforma A del receptor de progesterona (RPA) ($p < 0.05$) y del receptor de estrógenos alfa (RE α) ($p < 0.05$). El objetivo de este trabajo fue evaluar la reversibilidad de la resistencia adquirida a MIF y evaluar el efecto de terapias combinadas sobre el crecimiento tumoral en ambas líneas. Hembras BALB/c fueron transplantadas sc. con C4-HI ($n=20$) o C4-HIR ($n=20$). Cuando los tumores median 1 cm^2 comenzaron a tratarse con MIF (12 mg/kg/día) y/o E2 (5mg, pellet sc.) Se observó que los C4-HI regresionaron más rápidamente con E2 y MIF que con E2 o MIF por separado ($p < 0.05$). Los C4-HIR tratados con E2 o MIF crecieron más lento que el control pero regresionaron con ambos compuestos. Para estudiar la

reversibilidad de la resistencia adquirida se hicieron sucesivos pasajes de C4-HIR en ausencia o presencia de MIF. Después de 7 pasajes (8 meses) se observó que C4-HIR revirtió el fenotipo resistente. Los tumores ahora sensibles a MIF expresaron altos niveles de RPA y RE α (western-blot) observándose niveles similares o mayores que los del tumor parental C4-HI. Estos resultados demuestran la ventaja de tratamientos combinados que involucren al RE y RP en conjunto. Por otra parte, la reversibilidad de la hormono resistencia con la concomitante re expresión de receptores hormonales sugieren, por un lado la importancia de RPA mediando la acción de MIF, y por otro, que se podría descartar que la hormono resistencia está asociada a selección de clones con genes mutados capaces de sobrellevar la presencia de la hormona antagonista, y se ajustaría más a la existencia de mecanismos regulatorios epigenéticos.

507. (440) EFECTO ESTROGÉNICO DE 3 COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LAS NARINGENINAS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MURINAS. SOLDATI ROCÍO, ANDRAZECK SUSANNE, SCHINNERLING KATINA, GOROSTIAGA MARÍA ALICIA, VOLLMER GÜNTER, LANARI CLAUDIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental; Universidad Técnica de Dresden, Alemania

Los fitoestrógenos son metabolitos secundarios de plantas que producen efectos estrogénicos en vertebrados. El ejemplo paradigmático es la genisteína, producto de la soja cuyo consumo se ha asociado a menor incidencia de cáncer de mama. En el laboratorio desarrollamos 2 líneas celulares mamarias murinas que expresan receptores de estrógeno. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de 3 compuestos recientemente aislados: la Naringenina (N), 6(1-1dimetilalil)naringenina (6-DMAN) y la 8prenilnaringenina (8-PN) en modelos de cáncer de mama. En esta etapa se evaluó el efecto estrogénico de los 3 compuestos en las líneas celulares MC4-L2 y MC4-L5. Se estudió la respuesta sobre la proliferación celular mediante técnicas de incorporación de timidina tritiada y sobre la expresión temprana de genes por Real Time PCR. Se evaluó la capacidad del antiestrógeno puro ICI 162780 de revertir la acción estrogénica. Células MC4-L2 o L5 fueron sembradas en placas de 96 hoyos y a las 24 hs las células fueron incubadas en presencia de 1% de suero fetal bovino adsorbido con carbón. El efecto de los 3 compuestos se evaluó en este medio en un rango de concentración de 10^{-5} a 5×10^{-8} M. Luego de 48 hs de incubación, se observó que en concentraciones de 10^{-6} a 5×10^{-8} las 3 sustancias estimularon la proliferación celular, al igual que el E2 y que el efecto proliferativo fue revertido por el antagonista ($p < 0.05$). En concentraciones mayores a 10^{-6} se observaron efectos inhibitorios para 8PN y 6DMAN no mediados por RE e inespecíficos de línea celular. Se evaluó la expresión de clusterina a las 3 hs de incubar con las sustancias observándose también una respuesta estrogénica en los 3 casos. Estos estudios indican que las 3 sustancias ejercen efectos estrogénicos en líneas celulares de cáncer de mama murinas y serían candidatas para ser ensayadas en estudios in vivo.

508. (450) INFLUENCIA DEL ESTROMA EN LA RESPUESTA DE LAS GLÁNDULAS MAMARIAS A HORMONAS EN DISTINTAS CEPAS DE RATONES. BOLADO JULIETA, CERLIANI JUAN PABLO, VANZULLI SILVIA I., MONTERO GIRARD GUADALUPE, BOTTINO MARÍA CECILIA, BENAVIDES FERNANDO, VELA JORGE, BECUVILLALOBOS DAMASIA, MOLINOLO ALFREDO, LANARI CLAUDIA

IBYME; Academia Nacional de Medicina; Md Anderson Cancer Center Smithville National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH

Hemos demostrado que los progestágenos inducen cambios morfológicos diferentes en la glándula mamaria de hembras BALB/c, cepa sensible a la carcinogénesis hormonal, com-parados con

los de la cepa resistente C57BL/6. El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible influencia del estroma de la mama en los cambios inducidos por hormonas en las distintas cepas. Se purificaron células epiteliales de la mama de ratones BALB/c y C57BL/6, que se inocularon en estromas mamarios libres de epitelio de hembras Swiss/NIH nu/nu de 21 días, así como también en BALB/c y C57BL/6 como controles. Simultáneamente se implantaron en forma sc pellets de E2 (20 ug) + progesterona (Pg; 20mg) o E2 + MPA (20 mg) (n=5). Al mes de tratamiento, se extirparon las mamas que incluyeron en parafina, seccionaron y colorearon con H&E. En los ratones BALB/c controles las células epiteliales congénicas tuvieron amplia capacidad de regenerar la glándula mamaria alcanzando en zonas diferenciación lobulillar (N de estructuras/corte: 196±96), mientras que C57BL/6 repoblados mostraron un desarrollo pobre (35±11) comparado con BALB/c. No se observaron diferencias entre las mamas de ratones Swiss nu/nu repobladas con células BALB/c (298±5) ó C57BL/6 (287±56) sugiriendo que independientemente del origen de cepa de las células epiteliales, estas responden según el huésped en el que se las implanta. Para confirmar que las células transplantadas fueron las que generaron las nuevas glándulas mamarias, por microdissección y captura con Láser se disecaron las células epiteliales de los ratones Swiss nu/nu y se confirmó la cepa de origen por estudio de microsátelites. Teniendo en cuenta que no encontramos diferencias séricas de niveles de prolactina, hormona de crecimiento, IGF I o Pg entre cepas, postu-lamos que características del microambiente estromal podrían afectar la respuesta hormonal de las células epiteliales.

509. (544) MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ESTROMA EN LA ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA AL TAMOXIFENO (TAM) EN UN MODELO MAMARIO MURINO ESTRÓGENO (E) DEPENDIENTE. PONTIGGIA OSVALDO, BAL DE KIER JOFFÉ ELISA, SIMIAN MARINA

Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"

A partir de un tumor de mama murino M05, E dependiente, se estableció la línea celular LM05-Mix, conformada por una población estromal y otra epitelial. Por clonación se generaron las líneas LM05-F y LM05-E. Demostramos que la proliferación de LM05-E es estimulada por E e inhibida por TAM, con inducción de apoptosis. Por otra parte LM05-F no responde a estos tratamientos. LM05-Mix es estimulada por E y resistente al TAM. A pesar de ello, la población epitelial mantiene su sensibilidad intrínseca al TAM ya que al purificarla de los fibroblastos es inhibida por el anti-estrógeno. Para investigar si factores solubles producidos por la población fibroblástica estaban involucrados en la resistencia al TAM en la línea Mix, tratamos a LM05-E con TAM en presencia de medio condicionado de las líneas LM05-F, E, Mix. Como control se utilizó medio no condicionado. Después de 48 h se calculó el porcentaje de células muertas. Los tres medios condicionados redujeron significativamente el % de muerte celular de LM05-E en comparación con las tratadas con TAM en medio no condicionado (p=0.01, n=3 exp.). Para establecer las vías de señalización involucradas en la resistencia al TAM de la línea LM05-Mix, y sensibilizarla al tratamiento anti-hormonal, la misma se trató con TAM en presencia de: PD98059, LY29402, H7 y bis-indolmaleimida. Sólo el PD98059 aumentó significativamente la muerte celular de la línea mixta haciéndola más susceptible al TAM (p=0.01, n=2 exp.). Nuestros resultados sugieren que factores solubles producidos por la población estromal presente en el cultivo mixto confieren resistencia a la población epitelial a través de la estimulación de la vía de las MAPK/ERK. El hecho de que el medio condicionado de la línea LM05-E haya protegido contra el TAM sugiere que la misma es capaz de producir factores protectores pero que la síntesis de los mismos estaría regulada en forma negativa por el tamoxifeno. Subsidio de la Fundación Susan Komen.

510. (680) EXPRESIÓN DE RECEPTORES A HISTAMINA H3 Y H4 EN LESIONES BENIGNAS Y CARCINOMAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA HUMANA. MEDINA VANINA (1),

CROCI MAXIMO (2), CRESCENTI ERNESTO (2), MOHAMAD NORA (1), MASSARI NOELIA (1), CRICCO GRACIELA (1), NUÑEZ MARIEL (1), MARTIN GABRIELA (1), BERGOC ROSA (1), RIVERA ELENA (1)

Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (1); Instituto de Inmunooncología (2)

Previamente demostramos que los receptores H1 y H2 están presentes en tumores y lesiones benignas de la glándula mamaria. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de receptores H3 (RH3) y H4 (RH4) en biopsias y líneas celulares mamarias humanas HBL-100 y tumorigénicas MCF-7 y MDA-MB-231, y su correlación con la proliferación celular. Para ello se determinó en las biopsias por inmunohistoquímica la expresión de RH3, RH4, histamina (HA), histidina decarboxilasa (HDC) y antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA). En células se evaluó la expresión de RH3 y RH4 por RT-PCR y la proliferación en respuesta a agonistas específicos por la técnica clonogénica. Las muestras se obtuvieron quirúrgicamente de pacientes entre 43-65 años, 10 correspondieron a lesiones benignas (LB) y 30 a carcinomas (Ca) con diferentes tipos histológicos. Los resultados indican que el 96% de Ca y 70% de LB expresaron RH3 siendo el nivel de expresión mayor en Ca (p=0.0055, Mann Whitney). El 46% de Ca y 10% de LB presentaron RH4. La PCNA fue positiva en el 100% de Ca y 85% de LB, el nivel de expresión fue mayor en Ca (p=0.0005). Se detectó HA endógena en el 86% de LB y 100% de Ca y HDC en el 30% de LB y 83% de Ca con mayor nivel de expresión en este último (p=0.0071). Por otra parte sólo en Ca se encontró una correlación significativa entre la expresión de RH3 y PCNA (p < 0.0001 correlación de Spearman); HDC (p < 0.0001) e HA (p=0.0246). No hubo correlación alguna en las LB. Las 3 líneas celulares expresaron RH3 y RH4 y los agonistas H3 regularon la proliferación únicamente en las tumorales. Estos resultados son los primeros en demostrar la presencia de RH3 y RH4 en tejidos y células mamarias humanas. La significativa correlación entre la expresión de RH3 y proliferación y además su asociación con la producción de HA reflejan la importancia de estos receptores en la carcinogenesis mamaria, así como también la potencial aplicación terapéutica de ligandos del RH3 en cáncer de mama.

PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR II

511. (261) EXPRESION Y ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA TIROSIN-FOSFATASA 1B EN CÉLULAS UT-7 ACTIVADAS POR ERITROPOYETINA. CALLERO MARIANA, PÉREZ GLADYS, VITTORI DANIELA, CHAMORRO MARIA EUGENIA, NESSE ALCIRA

Departamento de Química Biológica, FCEN

La importancia de la fosforilación de residuos de tirosina del receptor de Eritropoyetina (EpoR) durante la activación celular por Epo ha enfocado la atención en las proteínas tirosin-fosfatasa (PTP) como probables mediadores implicados en procesos fisiopatológicos como policitemia y resistencia a terapia con rhuEpo. El prototipo de la familia PTP es la PTP1B. Esta fosfatasa, localizada tanto en el citosol como en la membrana del retículo endoplasmático, se relaciona con la regulación de vías de señalización que involucran la fosforilación de tirosina inducida por factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, por lo que se ha sugerido que actúa como modulador negativo del EpoR y del receptor de insulina. El objetivo de este trabajo fue investigar la acción de la Epo sobre la expresión de PTP1B, utilizando como modelo experimental la línea celular UT-7 dependiente de Epo. Las células, privadas de suero y Epo durante 18 h, fueron estimuladas con Epo por diferentes periodos. La expresión de PTP1B a nivel de ARNm y proteína fue analizada por Real Time PCR y Western Blot, respectivamente. La actividad enzimática fue evaluada en el inmunoprecipitado obtenido con anti-PTP1B a través de la hidrólisis de pNPP, y el producto se cuantificó espectro-

fotométricamente a 415nm. Se incluyeron ensayos con pretratamientos de las células con LY294002 (inhibidor de PI3K) o AG490 (inhibidor de JAK2). El nivel de ARNm de PTP1B aumentó por la estimulación con Epo, correlacionándose con la inducción de la expresión observada por Western Blot. Además, la estimulación con Epo indujo fosforilación de tirosinas y aumento de la actividad enzimática de PTP1B. El pretratamiento de las células con LY294002 o AG490, inhibió la inducción de la expresión de PTP1B mediada por Epo. Se concluye que existe una inducción de la expresión de PTP1B por Epo asociada a un aumento en la fosforilación de los residuos de tirosina y de la actividad enzimática de la PTP1B, sugiriendo la existencia de una regulación recíproca entre la PTP1B y la Epo.

512. (354) APARATO DE GOLGI: PRIMERA DIANA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN CÉLULAS A-549 INCUBADAS CON FTALOCIANINA DE ZN. CRISTOBAL JAVIER, SANTIAGO RELLO-VARONA, JUAN CARLOS STOCKERT, ANGELES VILLANUEVA, MAGDALENA CAÑETE

Universidad Autónoma de Madrid

Introducción y objetivos: La Terapia Fotodinámica (TFD) se basa en la aplicación de un fotosensibilizador (FS) excitado con luz visible en presencia de oxígeno. La localización del fotosensibilizador y por tanto del oxígeno singlete que se genera puede determinar distintas vías de inactivación celular. Los objetivos fueron determinar la localización subcelular del FS (Zn Pc) en células procedentes de un adenocarcinoma de pulmón humano (A-549) y las condiciones experimentales que ocasionan en esas células una inactivación predominantemente apoptótica. **Metodología:** La viabilidad celular se midió por el test del MTT. La fluorescencia emitida por el FS se comparó con la autofluorescencia de las mitocondrias y con las de fluorocromos de localización subcelular conocida. El estudio morfológico de la muerte celular se realizó en células fijadas y teñidas con Hoechst, mientras que para la evaluación del aparato de Golgi y la caspasa-2 se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia. **Resultados:** La droga era visible en la totalidad de las células utilizando una concentración de 5x10⁻⁷M y 3 horas de incubación. La localización de la droga coincidía con la localización de la ceramida. Este tiempo de incubación se utilizó para los tratamientos fotodinámicos, encontrando morfologías nucleares de apariencia apoptótica a las 6h del tratamiento. Después del tratamiento fotodinámico el Golgi se desorganizaba mientras que la caspasa 2 se relocalizaba antes de la desorganización del Golgi y su señal fluorescente colocalizaba con este orgánulo, perdiéndose ambas señales 6h después del tratamiento. **Conclusiones:** La ZnPc se localiza en el aparato de Golgi tras 3h de incubación. Con este tratamiento y la irradiación con luz roja se producía una elevada inactivación celular, de morfología predominantemente apoptótica. Seguramente este proceso se inicie en el aparato de Golgi, que se desorganiza de forma temprana y mediando en el proceso la caspasa-2.

513. (722) ACTIVIDAD CITOSTÁTICA DEL BENZNIDAZOL (BZL) EN CÉLULAS RAW 264.7 Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVACIÓN BASAL DE NF-KB Y AP-1. PASCUTTI MARÍA FERNANDA (1) (2), MANARIN ROMINA (1) (2), REVELLI SILVIA (1), SERRA ESTEBAN (2)

Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR (1). IBR-CONICET, Fac. de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR (2)

En trabajos anteriores se describió que el BZL inhibe la producción de mediadores pro-inflamatorios por macrófagos de la línea RAW 264.7 estimulados con LPS, a través de la inhibición de la activación de NF-κB. Además, dados los efectos adversos de la droga, se estudió el efecto del tratamiento con BZL sobre la viabilidad de esta línea. Se encontró que el BZL 1 mM detiene su crecimiento en forma reversible. Este efecto se extendió a otras líneas celulares. En la bibliografía se describe la activación constitutiva tanto de NF-κB como de AP-1 en numerosas líneas celu-

lares y tumores primarios. El objetivo de este trabajo fue evaluar la relación existente entre la activación de NF-κB y AP-1 y la actividad citostática observada para el BZL. Para ello, células RAW 264.7 se incubaron en presencia de BZL 1 mM o diferentes concentraciones de inhibidores de NF-κB (Bay 11-7082, inhibidor de IKK y MG-132, inhibidor de proteosoma) durante 24 hs y se evaluó la viabilidad celular a través de la reducción de MTT. Al igual que el BZL, ambos inhibidores produjeron una inhibición de la reducción de MTT (IC50: Bay 11-7082=5 μM; MG-132=0.25 μM). Estos resultados se confirmaron mediante la evaluación del crecimiento a las 24 y 48 hs con Azul tripán. La transfección con un plásmido que contiene el gen de luciferasa bajo el control de elementos κB reveló una actividad luciferasa en los extractos de células no tratadas. Esta actividad basal disminuyó luego del tratamiento con BZL 1 mM o Bay 3-10 μM. Ensayos de retardo en gel revelaron una activación basal de NF-κB, que fue modificada por el tratamiento con BZL. Se evidenció también una actividad basal de AP-1, que fue afectada en menor medida por el tratamiento con la droga. Estos resultados indican que las células RAW 264.7 presentan una activación basal de NF-κB y AP-1 y que la inhibición de la activación de NF-κB, por BZL u otros inhibidores, lleva a un arresto en el crecimiento de la línea.

514. (688) INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN MACRÓFAGOS POR CLOSTRIDIUM CHAUVOEI A TRÁVES DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO. VILLA MARÍA CECILIA, CORTIÑAS TERESA INÉS, DAVICINO ROBERTO, STEFANINI DE GUZMÁN ANA MARÍA

Universidad Nacional de San Luis

Clostridium chauvoei es un bacilo anaerobio, agente etiológico de la mancha, enfermedad que afecta principalmente al ganado bovino y ovino y evoluciona con un alto índice de mortalidad. A diferencia de otros clostridios la infección por *C. chauvoei* se establece a través de un mecanismo invasivo, poco conocido, que es asistido por toxinas extracelulares. Una de las características más sobresalientes de la mionecrosis producida por este microorganismo es la ausencia de células fagocíticas en el sitio de infección. Por otro lado está bien documentado que la producción de óxido nítrico (NO) es un arma clave que los macrófagos activados ejercen contra los microorganismos y que a su vez el NO producido puede inducir necrosis o apoptosis en células fagocíticas dependiendo de su concentración. El objetivo de este estudio fue investigar si las células de *C. chauvoei* pueden inducir necrosis o apoptosis de los macrófagos peritoneales de ratón *in vitro*. Los macrófagos fueron co-incubados con células de *C. chauvoei* ATCC 10092. La presencia de apoptosis se determinó a través de microscopía óptica, unión de fosfatidilserina expuesta en la membrana externa a annexin V-CY3 y la técnica de ADN en escalera. La producción de NO se determinó por la reacción de Griess y la capacidad de fagocitar por la técnica de nitro-blue tetrazolium. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los macrófagos incrementan la producción de NO durante las primeras horas de la incubación con *C. chauvoei* en estrecha relación con la actividad fagocítica. Dependiendo de la relación célula *C. chauvoei*:macrófago, se observó la presencia de necrosis temprana (relación 20:1) con altos niveles de NO y de apoptosis a las 16 horas de incubación (relación 2:1) con bajos niveles de NO. Los resultados indicarían que *C. chauvoei* es capaz de inducir necrosis o apoptosis según los niveles de NO inducidos.

515. (432) RESPUESTA DE LOS MECANISMOS DE APOPTOSIS Y DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE LAS MITOCONDRIAS INTESTINALES A LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE MENADIONA. MARCHIONATTI ANA MARÍA, PÉREZ ADRIANA DEL VALLE, DÍAZ DE BARBOZA GABRIELA EDITH, PEREIRA BEATRIZ MARÍA INÉS, TOLOSA DE TALAMONI NORI GRACIELA

Laboratorio "Dr. Cañas" Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba

La administración aguda de menadiona (MEN) inhibe la absorción intestinal de calcio mediante depleción de glutatión (GSH), produciéndose estrés oxidativo, lo cual afecta la actividad de los transportadores del movimiento transcelular de calcio (Marchionatti y col., J. Nutr. Biochem, 2003). En el presente trabajo, se estudió el efecto de la quinona sobre el estado redox de las mitocondrias intestinales. Se usaron pollos Cobb Harding, los cuales se dividieron en dos grupos: controles y tratados con 2,5 mmol de MEN/kg de peso corporal a diferentes tiempos. En mitocondrias se determinó GSH, actividades de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, catalasa, malato deshidrogenasa (MDH) y α -cetoglutarato deshidrogenasa (CGDH) por espectrofotometría. Se midió el potencial de membrana mitocondrial (PMM) mediante citometría de flujo. En cortes de intestino se determinó la localización de citocromo C por inmunocitoquímica y la fragmentación del ADN por la técnica de Tunel. Los resultados muestran que el contenido de GSH disminuyó a los 30 min, normalizándose a los 60 min., tiempo en el cual se observó la máxima liberación de citocromo C desde las mitocondrias. MDH y CGDH disminuyeron a los 30 min, lo cual persistió hasta las 48 hs. El sistema enzimático antioxidante no se modificó, con excepción de SOD cuya actividad incrementó a los 60 min. PMM incrementó a partir de los 30 min. MEN estimuló la apoptosis de los enterocitos vía fragmentación del ADN siendo este efecto mayor a los 30 min. En conclusión, la administración aguda de MEN incrementa la apoptosis a través de la fragmentación del ADN y liberación del citocromo C mitocondrial, quizás por alteración del sistema redox nuclear y mitocondrial, respectivamente. Se genera daño en la permeabilidad mitocondrial, con consiguiente inhibición de la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs, lo cual probablemente ocasiona depleción de ATP que contribuiría a la disminución de la absorción intestinal de Ca.

516. (420) AISLAMIENTO DE CÉLULAS STEM MESEQUIMALES A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO EQUINO. CARDOZO ALEJANDRA JOHANA, BENEDETTI LUCIANA, ARGIBAY PABLO FRANCISCO

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

Introducción: La fisiología subyacente a las capacidades regenerativas de las stem cells es tema de permanente discusión. Un potencial modelo de fisiología regenerativa frente a trauma por grandes esfuerzos podría ser el caballo deportivo, el cual presenta lesiones traumáticas de articulaciones, tendones y estructuras de sostén, que finalmente provocan una degeneración de la región afectada que remedan las asociadas al alto rendimiento en humanos. Las células stem mesenquimales (MSCs), con potencial de diferenciarse a cartílago, hueso, tendón y ligamento, son una fuente celular atractiva para el tratamiento de diferentes lesiones. El objetivo de este trabajo fue aislar MSCs de tejido adiposo equino y determinar las condiciones específicas de cultivo, con un objetivo a largo plazo de inyectarlas en animales modelo de traumas de partes blandas. Materiales y Métodos: Se obtuvieron, bajo anestesia local y en forma aséptica, muestras de tejido adiposo subcutáneo, provenientes de 10 equinos de diferentes edades, raza y sexo. Las muestras fueron procesadas para la obtención de MSCs por digestión enzimática y adherencia al plástico. Se evaluó la viabilidad de las mismas y se probaron distintas condiciones de cultivo. Resultados: Las MSCs cultivadas con suero fetal bovino no se adhirieron a la placa de cultivo, presentando una alta mortalidad. Sin embargo, las cultivadas con suero autólogo, presentaron una buena adherencia a la placa y una viabilidad del 81.2 ± 4.8 %. La morfología de las células es de tipo fibroblastoide, con forma ahusada, característica de MSCs. Se observó una cinética elevada de crecimiento hasta el 4° pasaje, momento en el cual la velocidad de proliferación disminuye significativamente. Conclusión: El tejido adiposo equino es una fuente de MSCs, las cuales tienen la capacidad de adherirse y proliferar en cultivos en monocapa. Su capacidad de regenerar lesiones de partes blandas en un modelo de trauma en caballos deportivos será analizada en el futuro.

517. (242) ROL DUAL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL PROCESO DE REGENERACIÓN HEPÁTICA. RONCO MARIA TERESA, FRANCÉS DANIEL, ALVAREZ LUJÁN, QUIROGA ARIEL, MONTI JUAN, PARODY JUAN PABLO, CARRILLO CRISTINA, PISANI GERARDO, LUGANO CRISTINA, CARNOVALE CRISTINA

Instituto de Fisiología Experimental - CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas- UNR Cátedra de Morfología-Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR

Previamente demostramos que la inhibición de la enzima Óxido Nítrico Sintetasa Inducible y por consiguiente la disminución de Óxido Nítrico (NO) en ratas sometidas a una hepatectomía parcial (HP) producía una disminución del proceso de regeneración hepática. Con el objetivo de caracterizar el rol del NO en la regulación del balance entre proliferación y apoptosis celular en el proceso de regeneración hepática, se aumentó el nivel de NO utilizando un dador externo. Ratas Wistar machos adultas fueron sometidas a una HP del 65%. Se las dividió en tres grupos (n=5): Control (HP-C), tratadas con nitroprusiato de sodio 0,25 mg/kg PC (HP-SNP1) y 2,50 mg/kg PC (HP-SNP2) i.v. durante 30 minutos. Las ratas fueron sacrificadas a las 5 horas luego de la cirugía. Se determinó el contenido de NO por la técnica de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) observándose los siguientes aumentos: HP-C: $87,35 \pm 0,35$; HP-SNP1: $120,00 \pm 5,37$; HP-SNP2: $3758,00 \pm 599,00$ *. En la fracción mitocondrial, se determinaron por western-blot las siguientes proteínas: Bax (pro-apoptótica) que no mostró diferencias significativas en HP-SNP1 respecto HP-C mientras que en SNP2 mostró un aumento del 45% respecto de HP-C y Bcl-xL (anti-apoptótica) que mostró un aumento del 100% en HP-SNP1 respecto HP-C y no mostró diferencias significativas en HP-SNP2 respecto de HP-C. El Índice de Proliferación se determinó por la técnica inmunohistoquímica de detección del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular a las 24 hs post-HP: HP-C: $21,4 \pm 1,5$; HP-SNP1: $28,1 \pm 1,1$ *; HP-SNP2: $25,7 \pm 1,0$. El Índice apoptótico se determinó por la técnica inmunohistoquímica de TUNEL: HP-C: $0,15 \pm 0,01$; HP-SNP1: $0,15 \pm 0,01$; HP-SNP2: $0,24 \pm 0,01$. * $p < 0,05$ vs HP-C. Estos resultados sugieren un rol dual del NO, a bajas concentraciones actuaría favoreciendo el proceso de regeneración hepática, mientras que a alta concentraciones favorecería el proceso de apoptosis celular.

518. (705) MECANISMOS RESPONSABLES DEL EFECTO RADIOPROTECTOR DE LA HISTAMINA EN INTESTINO DELGADO DE RATON. MEDINA VANINA (1), CROCI MAXIMO (2), MOHAMAD NORA (1), MASSARI NOELIA (1), CRICCO GRACIELA (1), NUÑEZ MARIEL (1), MARTIN GABRIELA (1), GUTIERREZ ALICIA (1), SAMBUCCO LORENA (1), CRESCENTI ERNESTO (2), BERGOC ROSA (1), RIVERA ELENA (1)

Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (1); Instituto de Inmunooncología (2)

Hemos reportado previamente que la histamina (HA) aumenta la radiosensibilidad de células tumorales mientras que protege tejidos normales como intestino y médula ósea frente a altas dosis de radiación ionizante. El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares responsables de la acción radioprotectora de la HA. Para ello, 36 ratones se separaron en 4 grupos: control (C); tratados con HA (T); irradiados (IR); irradiados y tratados con HA (IR+T). T e IR+T recibieron 0,1 mg/kg.día de HA (s.c.) desde 24 h. antes de la irradiación. IR e IR+T recibieron una dosis de 10 Gy en cuerpo entero. Todos los animales se sacrificaron después de 5 días. Los cortes histológicos de la mucosa intestinal se evaluaron por tinción con hematoxilina-eosina y la presencia de células apoptóticas por el método de Tunel. Se determinó por inmunohistoquímica la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), HA, proteína pro-apoptótica Bax y enzimas antioxidantes (EAO): superóxido dismutasas (MnSOD

y Cu/ZnSOD), Catalasa (CAT), y Glutation Peroxidasa (GPx). Los principales resultados se resumen en la tabla. El tratamiento con HA fue capaz de preservar casi totalmente la estructura histológica normal de la mucosa intestinal frente a los efectos de la radiación ionizante. El marcado aumento de PCNA en IR+T se asoció con una disminución del número de células apoptóticas y de la expresión de Bax y un incremento de HA respecto a IR. El patrón de expresión de Mn-SOD fue similar al de CuZn-SOD mientras que la HA no modificó la GPx. Concluimos que el efecto radioprotector de la HA se asocia con una modulación de la expresión de EAO incrementando la capacidad antioxidante así como también con un aumento de la proliferación y/o reparación de la mucosa intestinal y una disminución de la apoptosis.

Grupo	C	T	IR	IR+T
CuZn-SOD	+++	+++	++	+++
CAT	+	+	+	+++
Apoptosis	++	++	+++	++
Bax	++	++	+++++	+++
PCNA	+++	+++	-	++++

519. (502) NIVEL DE LIPOPEROXIDACION (LPO) Y DE PROTEÍNAS PRO Y ANTI APOPTÓTICAS DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA EN RATAS DIABÉTICAS. FRANCÉS DANIEL, RONCO MARIA TERESA, FERRI ALEJANDRO, QUIROGA ARIEL, PARODY JUAN, MONTI JUAN, ÁLVAREZ LUJÁN, CARRILLO CRISTINA, CARNOVALE CRISTINA ÉSTER

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) – CONICET; Cátedra de Química Analítica - UNR

En el estado diabético se ha observado un retardo en el proceso de regeneración hepática. Previamente demostramos que durante las primeras etapas de la regeneración hepática la LPO juega un rol importante en la fina regulación del balance entre las proteínas pro-apoptótica (Bax) y anti-apoptótica (Bcl-xL). Objetivo: Analizar el rol de LPO en el balance de las proteínas Bax/Bcl-xL en las primeras horas post-hepatectomía en ratas diabéticas. Métodos: Ratas Wistar macho adultas fueron divididas en dos grupos: Control (C) (n=20), inyectadas i.p. con buffer citrato pH=4,5 y Diabético (D) (n=20) inyectadas i.p. con estreptozotocina (SZ) 60mg/kg pc. A los 15 días C y D fueron subdivididos en: Control (c, sin cirugía), Sham (Sh, cirugía simulada) y Hepatectomizado (HP, hepatectomía del 65%). Los animales se sacrificaron a la hora (1) y a las 5 horas (5) post-cirugía. Resultados: Glicemia (g/l): C=1,1±0,1; D=4,3±0,4*. Insulinemia (radioinmunoensayo, µU/ml): C=59,6±3,1; D=38,4±2,9*. LPO (Mét. de Ohkawa, nmol de MDA/mg de prot.): Cc=0,63±0,28; CHP1: 0,97±0,34*; CHP5: 0,94±0,30*; Dc=1,28±0,54*; DHP1=2,01±0,38; DHP5=0,98±0,39. Bax (Western Blot, % de Cc, expresando a Cc como 100%): CHP1=131,3±5,6*; CHP5=160,9±25,9*; Dc= 176,8±14,3*; DHP1=187,5±31,1; DHP5=178,9±15,5. Bcl-xL (Western Blot, % de Cc, expresando a Cc como 100%): CHP1=88,7±11,6; CHP5=176,3±10,9*; Dc=139,7±10,6*; DHP1=117,5±32,1; DHP5=207,3±25,5# (*p< 0,05 vs Cc; #p< 0,05 vs Dc). No existieron diferencias en los niveles de los parámetros estudiados entre c y Sh tanto en C como en D, por tanto los valores se compararon contra Cc y Dc. Conclusión: LPO, que es una medida indirecta de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, mostró un alto nivel en el grupo D. En dicho grupo se observa una respuesta diferente en el nivel de Bax y Bcl-xL post-HP respecto del grupo Cc. Esto explicaría que en el estado diabético existe una modificación en la fina regulación del proceso de regeneración hepática.

520. (718) EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON PLOMO SOBRE LA HOMEOSTASIS DEL COBRE, SELENIO Y ZINC EN RATAS WISTAR. PIÑEIRO ADRIANA E., NAVONI JULIO, SASSONE ADRIANA H., CONTARTESE

CECILIA M., QUIROGA PATRICIA N., ROSES OTMARO E., LÓPEZ CLARA M.

Cátedra de Toxicología y Química Legal-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA

La interacción del plomo (Pb) con metales que se unen naturalmente a varias biomoléculas sugieren que es potencialmente capaz de alterar la homeostasis de varios de ellos, lo que estaría vinculado con su toxicidad molecular. Previamente este grupo mostró que el Pb estimula la producción de especies reactivas del oxígeno, efecto que estaría relacionado con la acción genotóxica observada. Además, el estrés oxidativo y el envejecimiento se vinculan con la toxicidad del metal. El objetivo de este trabajo fue determinar si el tratamiento crónico con Pb afecta los niveles plasmáticos de cobre, selenio y zinc en ratas Wistar. Se emplearon 16 animales (machos adultos) que se dividieron en dos grupos: control (C) y tratados (T). El grupo T recibió acetato de plomo (1000 ppm de Pb) en el agua de bebida durante 6 meses. El grupo C recibió agua destilada en el mismo período. Las ratas fueron anestesiadas con xylacina-ketamina en la proporción 1/100. Se obtuvieron muestras de sangre con heparina y se separaron sangre entera y plasma, los que se centrifugaron a 3000 rpm y se conservaron a -18 °C hasta su procesamiento. Los metales fueron medidos por absorción atómica: atomización en la llama (Cu y Zn) y atomización electrotérmica (Pb y Se). Se aplicaron los siguientes tests estadísticos: ANOVA, LSD, Scheffe y Mann-Whitney. El tratamiento a largo plazo con Pb permitió alcanzar una plomemia (PbS) elevada (66,6 ± 6,8 µg/dl). Con esta PbS se observó una disminución en los niveles plasmáticos de zinc (T= 2,5 ± 0,13 µg/ml vs C= 3,0 ± 0,16 µg/ml) y un aumento en los de selenio (28% respecto al grupo C) (p< 0,05). No se observaron modificaciones en los niveles plasmáticos de cobre (1,6 µg/ml para ambos grupos). El Pb compete con el zinc en su unión a diversas proteínas disminuyendo su biodisponibilidad. El aumento en los niveles de selenio podría ser consecuencia de una respuesta protectora del organismo contra el aumento de especies reactivas del oxígeno provocadas por el Pb.

521. (269) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA DE UN PÉPTIDO CÍCLICO DEL INTERFERÓN-ALFA2B. BLANK VIVIANA CLAUDIA, PEÑA CLARA, ROGUIN LEONOR PATRICIA

IQUIFIB. Departamento de Química Biológica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.

Previamente diseñamos y caracterizamos la actividad antiproliferativa de un péptido químico cíclico (PQC) que simula la región del interferón-α2b (IFN-α2b) que se une a sus receptores. El propósito de este trabajo fue determinar si la inhibición del crecimiento se relaciona con un arresto del ciclo celular o con la inducción de apoptosis. Luego de incubar células WISH por 72 horas con IFN-α2b o PQC, comprobamos que la citoquina incrementó el porcentaje de células en fase S, mientras que el péptido no modificó el ciclo celular. En las mismas condiciones experimentales, observamos un aumento en la población de células hipodiploides (19% control, 36% IFN-α2b, 61% PQC). Cuando se midió la externalización de fosfatidilserina en la membrana plasmática se obtuvo un incremento del porcentaje de células en apoptosis temprana luego de 24 hs de incubación (14% control, 7% IFN-α2b, 23% PQC) y tardía luego de 48 hs (9% control, 22% IFN-α2b, 73% PQC). Para investigar los mecanismos moleculares involucrados en la apoptosis, se evaluó la actividad de caspasas (método fluorométrico) y la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 (Western blot). Cuando las células WISH se incubaron durante 72 hs con IFN-α2b o PQC se activaron tanto la caspasa 3 (190% ± 20%, IFN-α2b y 150% ± 10%, PQC) como la caspasa 8 (150% ± 10%, IFN-α2b y 160% ± 10%, PQC) y la caspasa 9 (160% ± 30%, IFN-α2b y 170% ± 30%, PQC). Además, se observó un aumento en la expresión de la proteína Bax y una disminución de Bcl-2, sin cambios significativos en los niveles de Bcl-XL. En su conjunto, los resultados indicaron que en la respuesta apoptótica inducida por el péptido cíclico participan los recepto-

res de muerte celular y la vía mitocondrial. Asimismo el IFN- α 2b activa las mismas vías de apoptosis, aunque su efecto sobre la fase S del ciclo celular sugiere que existen diferencias en algunas de las señales intracelulares inducidas por el péptido quimérico y la citoquina.

REPRODUCCIÓN VI

- 522. (617) EL INHIBIDOR DE APOPTOSIS ESFINGOSINA 1 FOSFATO, DISMINUYE LA ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS 2, 3, 8 Y 9 INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA F-2ALFA (PGF-2ALFA) EN EL CUERPO LÚTEO DE RATAS PREÑADAS.** PELUFFO MARINA C., IRUSTA GRISELDA, PARBORELL FERNANDA, STOUFFER RICHARD L., TESONE MARTA

IByME-CONICET, ONPRC-OHSU

En trabajos previos del laboratorio hemos demostrado un aumento significativo en la actividad de las caspasas 2, 3, 8 y 9 en el cuerpo lúteo (CL) de ratas preñadas a las 36 hs post-inyección del factor luteolítico fisiológico en roedores, PGF-2 α . Dado que la apoptosis ha sido relacionada con la regresión del CL en distintas especies se propuso estudiar la actividad de estas 4 caspasas luego de la administración in vivo con el inhibidor de la apoptosis S1P. Ratas adultas preñadas (Día 14) fueron inyectadas intrabursa con 10 μ g de S1P en un ovario (grupo S1P) y el contralateral con vehículo (grupo CI), además se utilizó un grupo control sin inyectar (C). Dos horas post-operación las ratas fueron inyectadas con 400 μ g PGF-2 α rata y a distintos tiempos (0, 8, 16, 24 y 36 hs) los ovarios fueron extraídos y los CL aislados bajo lupa para medir en extractos proteicos la actividad de las 4 caspasas. A las 36 horas se pudo apreciar un mayor tamaño e irrigación de los ovarios tratados con S1P con respecto a los controles. Los ensayos de actividad mostraron un patrón similar en la actividad de las 4 caspasas, no observándose diferencias significativas entre el grupo S1P y el CI a ninguno de los tiempos estudiados. Sin embargo, a las 36 hs post-inyección PGF-2 α se observó una disminución en la actividad de las 4 caspasas con respecto a su respectivo grupo C (Caspasa 2= C: 11518,4 \pm 827,9; S1P: 2226,6 \pm 1571,7; Caspasa 3= C: 52102,2 \pm 3225,2; S1P: 5942,7 \pm 3806,4; Caspasa 8= C: 6159,4 \pm 584,4; S1P: 702,7 \pm 405,7; Caspasa 9= C: 4337,1 \pm 241,9; S1P: 1532,9 \pm 247,2; Unidades relativas de fluorescencia, $p < 0.05$). Conclusión: Los resultados obtenidos sugieren que el S1P difunde de un ovario al contralateral. El aumento en la actividad de las caspasas 2, 3, 8, y 9 estimulado por PGF-2 α puede ser revertido administrando un inhibidor específico de la apoptosis (S1P), lo cual sugiere un papel importante de estas proteasas en la luteolisis inducida por PGF-2 α .

- 523. (546) PARTICIPACIÓN DEL PLEXO NERVIOSO OVÁRICO EN LA REGULACIÓN DE LA LIBERACION OVÁRICA DE GNRH.** VEGA OROZCO ADRIANA SOLEDAD, SOSA ZULEMA, RASTRILLA ANA MARIA

Universidad Nacional de San Luis

Evidencias recientes indican que GnRH, es uno de los principales reguladores de los fenómenos reproductivos. Los niveles, localización de su receptor y su ARNm cambia significativamente, durante el ciclo ovulatorio en la rata, por lo que GnRH podría actuar como un regulador autocrino, paracrino de la función ovárica. El objetivo fue evaluar si por estímulo colinérgico sobre el ganglio mesentérico superior (GMS) se libera GnRH en el compartimento ovárico y ganglionar en un sistema ex vivo GMS-plexo nerviosos ovárico- ovario en ratas en etapa de estro (E) y diestro II (DII) (predominio de atresia folicular y regresión luteal respectivamente). Para ello se uso una cubeta con dos compartimiento, se adicionó acetilcolina (ACh) 10 \cdot 6 M en el compartimento ganglionar y se determinó GnRH por RIA en el líquido de incubación ovárico y ganglionar a los 180 minutos. Se aplicó test de Student y ANOVA con una significancia de $p < 0.05$. Los resul-

tados indican que en E, ACh aumentó la liberación de GnRH en el compartimento ovárico y ganglionar con respecto a su control ($p < .05$ y $p < 0.001$ respectivamente) con diferencias al grupo DII ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente). En DII, ACh no provocó cambios significativos con respecto al control en ambos compartimientos. Los valores encontrados de GnRH en el compartimento ovárico y ganglionar en E son superiores a los de DII. Los resultados indican que por estímulo neural desde el GMS vía Plexo nervioso ovárico se observan diferencias significativas en la liberación de GnRH a nivel ovárico entre Estro y Diestro II. Así, esta vía nerviosa y por estímulo colinérgico ganglionar estaría implicada, de acuerdo a la etapa del ciclo estral, en inducir aumento de GnRH intraovárico participando de este modo en los procesos apoptóticos que ocurren en el ovario.

- 524. (455) MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN TESTICULAR EN ESTADOS DE OBESIDAD Y AYUNO.** GIOVAMBATTISTA ANDRÉS (1,2), MELILLO CLAUDIA (3,4), MARQUEZ LORENA (3), DE GIUSTI VERÓNICA (3), SUESCUN MARÍA OLGA (3,4)

(1) Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CONICET-CICPBA), La Plata; (2) Cátedra De Biología, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP. (3) Lab. Endocrinología de la Reproducción, IMBICE; (4) Cátedra de Endocrinología, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP

Es ampliamente reconocido que existe una clara asociación entre la reserva energética del organismo y la función reproductiva. Cuando por diferentes motivos se altera la homeostasis energética se observan anomalías en la función gonadal. Previamente demostramos que los reguladores periféricos del balance energético y la conducta alimentaria, Ghrelina (Ghr) y Leptina (Lep) modulan la función testicular. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de Ghr y Lep sobre la actividad esteroidogénica testicular en el modelo de hiperleptinemia por administración neonatal con monosodioglutamato pre y post 98 hs (MSG) de ayuno (MSGAy) sobre la función esteroidogénica testicular. Se estudió la liberación de testosterona (T) in vitro en células de Leydig (CL), provenientes de ratas Sprague Dawley macho adultas de cada grupo y se evaluaron los efectos de Lep (10 \cdot 6) y Ghr (10nM) sobre la capacidad esteroidogénica en condiciones basales y post estímulo con 10ng/ml de hCG en ambos grupos y en CT. La liberación de T en las CL del grupo MSG fue significativamente menor ($p < 0.05$) tanto en condiciones basales como postestímulo con respecto a MSGAy y CT. Por otra parte tanto Lep como Ghr evidenciaron un efecto inhibitorio ($p < 0.05$) en el grupo CT sobre la producción de testosterona postestímulo con hCG. Dichos efectos no se observan sobre la respuesta in vitro de T en el grupo MSG. Sin embargo, en el grupo de animales MSG sometidos a ayuno por 96 hs se pudo constatar nuevamente un efecto inhibitorio de Lep y Ghr semejante al del grupo control. Se concluye que la disminución de los niveles de leptina en el animal MSG ayunado podría ser uno de los factores relevantes en la restauración de la capacidad esteroidogénica in vitro y los efectos inhibitorios de Ghrelina y Leptina de manera similar al grupo control.

- 525. (430) ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE CALBINDINA D28K EN TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATONES HÍBRIDOS SUBFÉRTILES E INFÉRTILES QUE PRESENTAN REARREGLOS CROMOSÓMICOS ROBERTSONIANOS.** RODRÍGUEZ VALERIA ANDREA (1), DÍAZ DE BARBOZA GABRIELA EDITH (1), MERICO VALERIA (2), PONCE RUBEN HUGO (3), THEILER GERARDO RAUL (3), GARAGNA SILVIA (2), TOLOSA DE TALAMONI NORI GRACIELA (1)

Laboratorio "Dr. Cañas", Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Cs Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (1), Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università degli Studi di Pavia, Italia (2), Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba (3)

En un trabajo previo se demostró que los ratones híbridos subfértiles que presentan variaciones en el número diploide de cromosomas sobre-expresan calbindina (CB) en espermatoцитos del estadio XII. La CB es una proteína que amortigua variaciones de calcio intracelular y protege a las células de la muerte. En este trabajo nos propusimos realizar un estudio comparativo de la expresión de CB en células germinales de ratones híbridos infértiles y subfértiles con rearrreglos Robertsonianos. Para ello se usaron testículos de ratones híbridos subfértiles ($2n = 32$) obtenidos del cruzamiento de hembras CD1 ($2n = 40$) y machos Milan II ($2n = 24$) de la especie *Mus musculus domesticus*, y de híbridos infértiles ($2n = 39$ o 40) obtenidos del cruzamiento de hembras *Graomys griseoflavus* ($2n = 36, 37$ y 38) y machos *Graomys centralis* ($2n = 42$). Secciones transversales de los túbulos seminíferos se procesaron por la técnica de inmunoperoxidasa, empleando un anticuerpo policlonal anti-CB. Los resultados mostraron escasa expresión de CB en espermatoцитos de ratones CDI, Milan II, *Graomys griseoflavus* y *Graomys centralis*. En animales híbridos subfértiles se encontró expresión de CB en elevado número de células germinales (30 ± 3 células/túbulo seminífero), mientras que en los ratones híbridos infértiles se encontró aún mayor expresión de CB (39 ± 2 células/túbulo seminífero). Los ratones híbridos infértiles presentaron mayor mortalidad de células germinales, con arresto de la espermatogénesis en estadios pre-meióticos. En la mayoría de los ratones híbridos subfértiles también hubo arresto de la espermatogénesis, pero en algunos túbulos seminíferos las células germinales completaron su maduración. En conclusión, la mayor expresión de CB en células germinales de los ratones híbridos con rearrreglos Robertsonianos, tanto subfértiles como infértiles, podría ser un mecanismo de protección contra la apoptosis de la prole espermatogénica.

526. (377) MODULACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE RANTES Y SUS EFECTOS SOBRE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS. BLUMENFELD ROMINA (1), CORIGLIANO ADRIANA (1), CHAVEZ SHAWN (2), MOR GIL (2), ROSANNA RAMHORST (1)

(1) *Laboratorio de Inmunogenética Hospital de Clínicas "José de San Martín"; (2) Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Yale University Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Yale University*

La implantación embrionaria en humanos requiere la generación de una respuesta proinflamatoria seguida de un cambio hacia una respuesta de tipo Th2. Dado que RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) es una proteína quimioattractante de monocitos y de linfocitos T activados asociada a un patrón de tipo Th1 y expresada por el sincitiotrofoblasto investigamos la modulación de RANTES y sus efectos sobre células del trofoblasto. Para ello se realizaron cocultivos de células trofoblásticas inmortalizadas (línea celular SWAN-71) y de células mononucleares totales (MNT) de mujeres fértiles y con Abortos Recurrentes Espontáneos (ARE). Luego de 24hs de cocultivo, la cuantificación intracitoplasmática de RANTES por citometría de flujo, mostró que las células SWAN-71 en presencia de MNT de pacientes con ARE no expresan RANTES en comparación con los cocultivos realizados con MNT de mujeres fértiles (0% vs 20%). Luego de 48hs, esta diferencia se invierte observándose un 8% y un 29% de células productoras de RANTES en presencia de MNT de mujeres fértiles y con ARE respectivamente. Este aumento en la producción de RANTES fue acompañado por un incremento en la secreción de INF gama, cuantificado por la técnica de ELISA. Mas aún, los niveles detectados en las pacientes con ARE fueron significativamente superiores a los observados de mujeres fértiles ($p < 0,001$ Student t-test). Asimismo, el pico de producción de RANTES en mujeres fértiles se correlacionó con mayores niveles de células apoptóticas a diferencia de lo que ocurre en las pacientes con ARE (25% vs 3%). Además, RANTES disminuye la respuesta proliferativa en los cocultivos mencionados en forma específica ya que el efecto supresor fue revertido en presencia del Ac anti-RANTES. Estos resultados sugieren que

RANTES participaría en la inducción de una respuesta proinflamatoria la cual sería posteriormente controlada en mujeres fértiles a diferencia de lo que ocurriría en pacientes con ARE.

527. (307) ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE PARTO PREMATURO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO EN RATÓN. REVERSIÓN POR UN INHIBIDOR DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2). CELLA MAXIMILIANO, AISEMBERG JULIETA, BILLI SILVIA, FRANCHI ANA MARÍA

CEFyBO

El nacimiento prematuro es la causa más importante de morbi-mortalidad perinatal y su incidencia no ha variado mucho en los últimos 40 años. El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un modelo de parto pretérmino y determinar la posible participación de los sistemas óxido nítrico (NO)-NO sintasa (NOS) y prostaglandinas (PGs)-COX en el desencadenamiento del parto normal y pretérmino. Se desarrolló un modelo de parto prematuro inducido por LPS en ratonas Balb/c, ensayándose distintas dosis únicas de LPS, así como dos dosis separadas por 3h en el día 15 de preñez. La administración en el día 15 de preñez (d15) de dos dosis de LPS (0,5 y 1 mg/kg a las 10 y 13h) indujo el parto en el 95% de los casos (12 ± 2 h post-LPS), sin afectar la sobre vida de las madres. Se analizó si inhibidores selectivos de la COX-2 (meloxicam, melo) y de la NOS inducible (aminoguanidina, AG) podían prevenir el parto pretérmino inducido por LPS. El melo (3 dosis i.p., 2 mg/kg) redujo en un 90% el adelantamiento del parto inducido por LPS, y la AG (3 dosis i.p., 300 mg/kg) lo hizo en un 46%. Puesto que el melo previno el adelantamiento del parto, se estudió, en parto a término y pretérmino, la síntesis uterina de PGE2 y PGF2 α (RIA) así como los niveles proteicos de COX-1 y COX-2 (western blot). Tanto la producción de PGs como los niveles proteicos de COX-2 aumentan, con respecto al d15, el día del parto a término (d19, $p < 0,01$ vs d15) o prematuro (d15+LPS, $p < 0,01$ vs d15). Ambos efectos fueron revertidos por el tratamiento con meloxicam ($p < 0,01$ vs d15+LPS). En el este trabajo se estableció un modelo de parto pretérmino inducido por LPS. El parto prematuro pudo ser prevenido por un inhibidor selectivo de la COX-2, que actuó reduciendo la liberación de PGE2 y PGF2 α y los niveles proteicos de COX-2, incrementada en el momento del parto a término y pretérmino.

	d15	d15+LPS	d19	d15+LPS+melo
PGE2 (pg/mg tej)	28,3 \pm 1,8	50,6 \pm 8,2	52,8 \pm 3,1	19,2 \pm 4,2
PGF2 α (pg/mg tej.)	101,1 \pm 17,8	455,5 \pm 20,8	491,3 \pm 20,26	148,6 \pm 25,3

528. (197) LA SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ANANDAMIDA ESTÁN INVOLUCRADAS EN EL EFECTO DEL LIPOPOLISACÁRIDO SOBRE LA PRODUCCIÓN UTERINA DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN LA PREÑEZ TEMPRANA. VERCELLI CLAUDIA, AISEMBERG JULIETA, BILLI SILVIA, CERVINI MARCOS, RIBEIRO MARIA LAURA, FRANCHI ANA

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET)

El NO cumple importantes funciones durante la preñez y participa en procesos fisiológicos como la implantación, deciduización, vasodilatación y relajación miométrica. Sin embargo, en altas concentraciones como las producidas durante la sepsis, el NO se vuelve tóxico dado que genera radicales libres. Hemos observado que el LPS es capaz de producir reabsorción embrionaria debido a un aumento en la producción uterina de NO en ratonas preñadas. La AEA (principal endocannabinoide) participa en eventos reproductivos pero también está relacionada con pérdidas tempranas de la preñez. Investigaciones recientes revelan que el LPS no solo es capaz de inducir la síntesis de AEA en macrófagos murinos sino también de inhibir la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH-enzima que metaboliza la AEA) en linfocitos humanos. El objetivo de este trabajo es determinar si la AEA está involucrada en la inducción de la síntesis uterina de NO por LPS

en ratonas preñadas. Ratonas en día 7 de preñez fueron sacrificadas, se extrajeron los úteros individualizando los sitios de implantación y separando útero y decidua. Los úteros fueron incubados por 24h a 37°C en presencia de a) LPS+AM251 (antagonista del receptor de cannabinoides de tipo 1) y b) LPS+SR144528 (antagonista del receptor de cannabinoides de tipo 2) para determinar luego la producción de NO en los sobrenadantes de cultivo. Observamos que la producción de NO inducida por LPS se revierte en presencia de AM251 (LPS 8,4±0,3 uM vs L+AM251 6,6±0,5; $p < 0.001$) pero no en presencia de SR144528 (LPS 5,6±0,4 vs L+SR144528 5,4±0,6). También se determinó la síntesis de AEA y la expresión de la FAAH por PCR y western blot en presencia/ausencia de LPS. El tratamiento con la endotoxina aumentó la síntesis de AEA (ctrl 0,6±0,2 nmol AEA/mg prot/h vs LPS 1,9±0,2; $p < 0,01$) y disminuyó la expresión de la FAAH (ctrl 1,6±0,3 vs LPS 0,7±0,1; $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la AEA participa como intermediario en la producción de NO inducida por LPS.

529. (174) FALLA OVÁRICA PREMATURA: ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS 919A>G Y 2039A>G DEL GEN DEL RECEPTOR DE FSH COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO. SUNDBLAD VICTORIA (1), CHIAUZZI VIOLETA (1), ANDREONE LUZ (2), CAMPO STELLA (2), CHARREAU EDUARDO (1), DAIN LILIANA (1), (3)

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET (1); Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños R. Gutiérrez (2); Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS), Buenos Aires, Argentina (3)

Se han descrito dos polimorfismos, 919A> G y 2039A> G, en desequilibrio de ligamiento, en el exón 10 del gen del receptor de FSH (RFSH). Si bien se ha sugerido que estos polimorfismos afectarían los niveles de FSH y la respuesta ovárica a la acción de esta hormona, los estudios en pacientes con Falla Ovárica Prematura (FOP) son escasos y no concluyentes. Con el fin de determinar si los polimorfismos del gen del RFSH estarían asociados a la etiología de FOP, estudiamos muestras de ADN de 65 FOP y 72 controles. Las regiones de interés se analizaron mediante PCR y polimorfismos de restricción. No observamos un aumento en el riesgo de desarrollo de FOP para el genotipo 919GG (ORAA+AG vs. GG =1.01 (0.39-2.63) o para el 2039GG (ORAA+AG vs. GG =1.03 (0.40-2.67)). Observamos asimismo, que en 6/65 FOP y en 1/72 controles el genotipo 919A> G no cosegrega con el genotipo 2039A> G. Además, analizamos si los diferentes haplotipos del RFSH estarían asociados a variaciones en los niveles de hormonas ováricas circulantes. Estudiamos 44 mujeres menores de 40 años con ciclos regulares, de las cuales obtuvimos dos muestras de sangre, una en fase folicular media y otra en fase lútea media. Se realizó la genotipificación y se determinaron los valores de E2 y FSH por RIA, y de inhibina A e inhibina B por ELISA. Las muestras se separaron en grupos: 1) genotipo A-A/A-A (n=8), 2) genotipo A-A/G-G (n=27) y 3) genotipo G-G/G-G (n=9). No hallamos diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos al comparar los valores de FSH, E2 e Inhibina B de la fase folicular media, y los de Inhibina A de la fase lútea media, lo cual indicaría que la producción de estas hormonas no se vería afectada por las variantes alélicas estudiadas. Considerando los resultados en conjunto, sugerimos que los polimorfismos 919A> G y 2039A> G del gen del FSHR no estarían involucrados en el desarrollo de FOP. Sin embargo, sería necesario estudiar la implicancia biológica de la presencia de genotipos no cosegregantes en FOP.

INMUNOLOGÍA IX

530. (188) EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE VIP SOBRE MACRÓFAGOS DE RATONES NOD. LAROCCA LUCIANA, CALAFAT MARIO, ROCA VALERIA, FRANCHI ANA, PEREZ LEIROS CLAUDIA

Depto. Química Biológica - FCEN CONICET, CEFYBO Facultad de Medicina UBA CONICET.

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por una severa disfunción secretoria salival y lagrimal conocida como sintomatología sicca. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) constituyen un modelo adecuado ya que a partir de las 12 semanas, en el estado prediabético, desarrollan una sialadenitis espontánea a predominio Th1 con pérdida de la función secretoria, semejante en algunos aspectos al SS. El péptido intestinal vasoactivo (VIP), neuropéptido más abundante en el sistema inmune, juega un papel clave en este modelo, dado su doble función de neurotransmisor prosecretorio y regulador de la respuesta inmune, con efecto anti-inflamatorio y pro-Th2. Nuestro objetivo consistió en estudiar la respuesta de los macrófagos peritoneales frente a un estímulo inflamatorio (LPS) y el potencial efecto anti-inflamatorio de VIP en ratones NOD prediabéticos comparados con controles BALB/c. La producción de nitritos se determinó mediante el método de Griess, la concentración de citoquinas por ELISA, y PGE2 por RIA, los resultados son X±ES. Los macrófagos peritoneales NOD, estimulados con LPS+IFN gamma, presentaron mayor producción de nitritos comparado con los BALB/c (uM: NOD 18,2 ± 1,7; BALB/c 10,3 ± 0,8 ; $P < 0,05$). El VIP reduce la acumulación de nitritos e IL-12 inducida por LPS (nitritos uM LPS 18,2 ± 1,7; LPS+VIP 6,0 ± 0,5 $P < 0,05$), (ng IL-12/10⁶ cel 1,7 ± 0,2; LPS+VIP 0,7 ± 0,1 $P < 0,05$). VIP estimula la producción de IL-10 (ng/10⁶ cel basal 1,8 ± 0,2; VIP 3,9 ± 0,2 $P < 0,05$) y PGE2 (122 ± 13 vs. 319 ± 28 $P < 0,05$). Los resultados indican que los macrófagos de ratones NOD producen mayores niveles de nitritos e IL-12 y que el VIP aumenta per se IL-10 y PGE2 y revierte esta anormalidad.

531. (336) LOS MACRÓFAGOS RESIDENTES EN GLÁNDULAS DE RATONES NOD PRESENTAN UN ESTADO BASAL ACTIVADO CON PÉRDIDA DEL EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DEL VIP. CALAFAT MARIO, LAROCCA LUCIANA, MESTRE ANA, PREGI NICOLÁS, NESSE ALCIRA, DUSETTI NELSON, PÉREZ LEIROS CLAUDIA

Depto. Química Biológica - FCEN-CONICET, INSERM U.624, Marsella, Francia

Los ratones NOD constituyen un modelo adecuado de la sintomatología sicca característica del Síndrome de Sjögren. El péptido intestinal vasoactivo (VIP), juega un papel clave en el modelo por su doble función prosecretoria y anti-inflamatoria. En trabajos anteriores demostramos una apoptosis aumentada en las glándulas de hembras NOD de 16 semanas asociada a una mayor expresión de bax y TP53INP1. TNF-alfa es una citoquina que induce apoptosis en algunos tejidos. Nuestro objetivo fue estudiar el rol de los macrófagos residentes en glándulas de ratones NOD sobre la apoptosis de acinos y su posible regulación por VIP. Los macrófagos se aislaron de glándulas submaxilares (SM) por adherencia previa disgregación acinar. Se determinó la concentración de nitritos por Griess, TNF por bioensayo, apoptosis en acinos de estas glándulas y expresión de TP53INP1 por Hoescht y RT-PCR usando hembras BALB/c (B) como control. Observamos que el TNF induce un aumento significativo en la apoptosis de acinos tanto en ratones NOD como en B asociado a una mayor expresión de TP53INP1. Los macrófagos residentes de NOD presentan un estado basal activado caracterizado por una mayor producción de nitritos (uM X ± ES: NOD = 7,1 ± 0,5; B = 1,4 ± 0,4; $P < 0,05$) y de TNF (pg/10⁶ cél. X ± ES: NOD = 173 ± 20; B = 38 ± 12; $P < 0,05$). VIP disminuye la producción de TNF inducida por LPS en B (pg /10⁶ cél X ± ES: B LPS=578±45; LPS+VIP= 68 ± 23 $P < 0,01$).pero en NOD no se observa este efecto. Los macrófagos residentes en glándulas submaxilares de ratones NOD presentan un estado basal activado con mayor producción de nitritos y TNF y no se observa una regulación negativa de la producción de TNF por VIP.

532. (180) INDUCCIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS POR EL

ANTIVIRAL MELIACINA SOLO O EN COMBINACIÓN CON EL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 (HSV-2). PETRERA ERINA, COTO CELIA E

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

Meliacina (MAS) retarda la mortalidad de animales infectados por vía intra-vaginal con el virus HSV-2 sin disminuir el título viral en los lavados vaginales. Por este motivo quisimos estudiar si los efectos benéficos de MAS in vivo se debían a una potencial acción inmunomoduladora, midiendo la producción de citoquinas en macrófagos (ϕ), ya que MAS aumenta la producción de TNF- α en ϕ inducidos con LPS. Para ello, cultivos de ϕ peritoneales murinos fueron inducidos in vitro con MAS (50 μ g/ml), HSV-2 cepa MS (104 UFP) y la combinación de ambos. Además, se usaron otros inductores como LPS (10 μ g/ml), IFN- γ (100 UI) y TNF- γ (10 μ g/ml) combinados o no con MAS. Al cabo de 8 y 24 h de inducción se midió la concentración de TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos usando un bioensayo y a las 24 h se midieron IFN- γ , IL-6 e IL-10 por ELISA y nitritos (NO) por Griess. Resultados: 1) TNF- α : MAS induce un aumento de 2,3 \pm 0,4 pg/ml con respecto al control a las 8 h (igual que el IFN- γ) llegando a 4,9 \pm 0,5 pg/ml a las 24 h; HSV-2 induce 0,3 \pm 0,03 pg/ml solo a las 8 h. MAS+HSV-2 inducen como MAS sola, pero MAS sinergiza con IFN- γ (41,2 \pm 2 pg/ml a las 8 h y 651,7 \pm 32,6 pg/ml a las 24 h). 2) IFN- γ : MAS induce (300 \pm 15 pg/ml), HSV-2 (450 \pm 22,5 pg/ml) y MAS+HSV-2 (800 \pm 40 pg/ml). 3) IL-6: MAS induce 384 \pm 19,2 pg/ml, sola o con HSV-2, HSV-2 solo no induce. 4) IL-10: MAS (11,7 \pm 0,6 pg/ml), HSV-2 (24,2 \pm 1,2 pg/ml), MAS+HSV-2 (34,7 \pm 1,7 pg/ml). 5) Nitritos: MAS (2,6 \pm 0,1 pg/ml), HSV-2 (10,2 \pm 0,5 pg/ml), MAS+HSV-2 (17 \pm 0,85 pg/ml). Estos datos indican que MAS induce per se la producción de las citoquinas estudiadas, produce un efecto aditivo en combinación con HSV-2 y sinergiza la producción de TNF- α con IFN- γ . Postulamos que este comportamiento como inmunomodulador puede contribuir a aumentar la respuesta innata responsable de defender al ratón infectado con HSV-2 por la vía genital.

533. (199) LA CICLOOXIGENASA PARTICIPA EN LA RESPUESTA ANGIOGÉNICA INDUCIDA POR MACRÓFAGOS PROVENIENTES DE ANIMALES PORTADORES DE TUMOR. DE LA TORRE EULALIA (1), RIBEIRO MARIA LAURA (1), SACERDOTE DE LUSTIG EUGENIA (2), SALES MARIA ELENA (1)

CEFyBO-CONICET-Facultad de Medicina-UBA (1) Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Facultad de Medicina, UBA (2)

La angiogénesis es fundamental en la etiopatogénesis de varias enfermedades crónicas como el cáncer, donde se desencadena por la liberación de factores proangiogénicos derivados de las células malignas y/o de células accesorias: mastocitos, fibroblastos y macrófagos (Mfs). Evidencias recientes indican que los productos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) promueven la neovascularización tumoral. Previamente demostramos que células de la línea LMM3, derivada de una metástasis de un adenocarcinoma mamario murino, inducen una potente respuesta angiogénica en animales singéneos que se reduce en presencia de indometacina (INDO) y NS-398, inhibidores no selectivo y selectivo de COX-2, respectivamente (Angiogénesis 7: 45-51, 2004). Asimismo los Mfs peritoneales provenientes de portadores de 7 días del tumor LMM3 (MfsT7) potencian la respuesta angiogénica inducida por dichas células (FEBS Let 532: 216-220, 2002). En este trabajo estudiamos la participación de COX en la angiogénesis inducida por MfsT7 en comparación con Mfs provenientes de hembras BALB/c normales (MfsN). La angiogénesis in vivo se evaluó cuantificando la densidad de vasos en la piel de animales singéneos (d=número de vasos/mm² de piel). Observamos que el tratamiento de los MfsT7 con INDO (10-6M) o NS-398 (10-5M) redujo (2,39 \pm 0,36 o 2,30 \pm 0,29) el efecto angiogénico producido por el cocultivo de células LMM3+MfsT7 (5,01 \pm 0,5) (p< 0,001). Los MfsT7 fueron angiogénicos per se (3,29 \pm 0,18) com-

parados con los MfsN (1,86 \pm 0,55) (p< 0,001) y mostraron por Western blot (Wb) (D.O./mm²) un aumento en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo A (VEGF-A) (MfsT7: 0,33 y MfsN: 0,15; p< 0,05) y de COX-2 (MfsT7:0,95; MfsN:0,09; p< 0,05). El pretratamiento de los MfsT7 con INDO o NS-398 (1,82 \pm 0,28 o 2,53 \pm 0,15) redujo significativamente la neovascularización in vivo. Concluimos que los productos de la COX-2 están involucrados en el efecto angiogénico inducido por los Mfs provenientes de portadores de tumor.

534. (457) ACTIVIDAD DE LOS PMN DURANTE LA PORTACIÓN DEL TUMOR MURINO LP07. TRATAMIENTOS CON MODULADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA. KARAS ROMINA, STILLITANI ISABEL, PELUFFO GUILLERMO, MOTTER ANDREA, KLEIN SLOBODANKA, DIAMENT MIRIAM

Depto Bioterio y Cáncer Experimental. Area Investigación. Instituto de Oncología AH Roffo

Hemos demostrado que en el tumor de pulmón LP07, los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) favorecen la progresión tumoral por modificación en su funcionalidad. Estudiamos si los tratamientos con un antiinflamatorio, Indometacina (Indo 10 μ g/mL) y un agonista de PPAR γ , Rosiglitazona (Rosi 18.2 μ g/mL), modifican la funcionalidad de los PMN durante la evolución de LP07, influenciando el desarrollo tumoral. Se inocularon ratones BALB/c con 3x10⁵ células LP07, se trataron desde el día 0 con: A:Indo, B:Rosi, C: sin tratar, D:Normal. Al día 20 se obtuvieron PMN de cavidad peritoneal. Resultados: 1. El peso del tumor primario disminuyó (A:0.18g \pm 0.06; B:0.43g \pm 0.12, C:0.69g \pm 0.09, A vs C:p=0.02; B vs C:p=0.04). 2. Menor Incidencia metastásica (%) A:0, B:33, C:67). 3. Menor % aumento de peso corporal en B:6.1 \pm 1.9 y C:2.3 \pm 4.0 (C vs D:p=0.002; B vs D: p=0.01). 4. Ensayo de metástasis experimentales mostró mayor n° de metástasis/pulmón en animales coinoculados con LP07 y PMN (1:10) de (A: 88 \pm 55, B:219 \pm 43, C: 125 \pm 20, D:157 \pm 17) que vs LP07 solas: 20 \pm 8 (B, C, D: p=0.0004; A: p=0.008). 5. Citotoxicidad de PMN sobre LP07 (50:1) fue efectiva (%): A:42 \pm 3; B:25 \pm 1, C:37 \pm 2 (A,B vs C p=0.008, D:7 \pm 2%). 6. Sólo medios condicionados (MC) de PMN de C y D fueron citotóxicos sobre LP07 a las 48 hs (C:50 \pm 9 y D:49 \pm 15; p=0.01 y p=0.03 vs células LP07 solas). 7. Disminuyó la expresión de MMP-9 (por zimografía, UA) en MC de A:17 \pm 3 (C:28 \pm 1;p=0.03). 8. La producción de ON no se modificó por ninguno de los tratamientos. Los tratamientos con Rosi o Indo disminuyen la progresión tumoral y modulan la actividad de los PMN por distintas vías durante la evolución del tumor. Los PMN de los ratones tratados necesitan contacto con la célula LP07 para ejercer su efecto citotóxico, ya que los MC de PMN de los mismos no actúan de igual manera sobre estas células. Es probable que los tratamientos utilizados induzcan la secreción de mediadores diferentes.

535. (610) EL TRATAMIENTO INTRATUMORAL CON UNA CEPA DE SALMONELLA TYPHI ATENUADA (CVD915) PROMUEVE LA ELIMINACION DE UN TUMOR Y LA GENERACION DE UNA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL DE MEMORIA. BALBOA LUCIANA, GRAVISACO MARÍA JOSÉ, VENDRELL ALEJANDRINA, MONGINI CLAUDIA, WALDNER CLAUDIA INÉS

CEFyBO

Previamente, demostramos el efecto antitumoral de una cepa vacunal de Salmonella typhi, inoculada por vía intranasal o intratumoral (i.t.), en animales portadores de un linfoma T (LBC). El objetivo de este trabajo fue estudiar el tipo de respuesta inmune desencadenada y los mecanismos inmunes efectores involucrados. Para ello, lotes de ratones portadores de tumores LBC subcutáneos (s.c.) (diámetro mayor entre 0,3-1,2 cm) fueron inoculados (i.t.) con 5x10⁸ UFC o PBS. Pudo observarse no sólo, una reducción significativa del volumen tumoral y un aumento significativo en la sobrevida de los animales tratados (p< 0.005), sino

que el 56% de los animales tratados con las bacterias rechazaron el tumor. Una parte de los animales que respondieron al tratamiento (60 días libres de tumor) se desafiaron con las células tumorales LBC. Los resultados obtenidos demostraron que el 67% de los animales permanecieron libres de tumor hasta por lo menos 180 días de haber sido desafiados. Los esplenocitos de los ratones respondedores, previamente expandidos *in vitro* en presencia de las células LBC irradiadas, mostraron mediante ensayos de citotoxicidad mediada por células actividad citotóxica contra las células LBC. Además, determinamos la presencia intracitoplasmática de IFN γ en las poblaciones de células T efectoras CD4+ y CD8+ presentes en los bazos de los ratones respondedores, mediante inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo. Demostramos que como consecuencia de la inoculación *i.t.* con una cepa bacteriana se logró la erradicación de tumores *s.c.* y una respuesta antitumoral de memoria que permitió el posterior rechazo ante un nuevo desafío con las células tumorales. En los mecanismos celulares antitumorales estarían involucrados LTC específicos contra las células LBC y LT CD4+ y CD8+ secretores de IFN γ . Esta estrategia novedosa podría emplearse en el desarrollo de una eficiente inmunoterapia contra el cáncer.

536. (379) MECANISMOS DE REGULACIÓN NEGATIVA DE LA RESPUESTA INMUNE EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA. ARGUELLO RAFAEL (1), FICHERA LAURA (1), OLIVERA CARINA (1), ALBAREDA MARÍA, ALVAREZ MARÍA (2), ARMENTI ALEJANDRO (2), POSTAN MIRIAM (1), LAUCELLA SUSANA (1)

Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén (1); Hospital Interzonal General de Agudos "Eva Perón" (2)

El desarrollo de miocardiopatía es la consecuencia más importante de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Recientemente, demostramos que los pacientes con mayor compromiso cardíaco presentaban niveles significativamente más bajos de linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria productores de IFN- γ , específicos para *T. cruzi*, comparado con pacientes con menor sintomatología. Para investigar las causas responsables de esta baja respuesta celular T, examinamos la expresión de distintos marcadores asociados a mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmune. Se aislaron células mononucleares periféricas de 10 pacientes asintomáticos, 10 pacientes con cardiopatía severa y 10 controles no infectados. Se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan el receptor 1 de la molécula semejante a la inmunoglobulina de leucocitos (LIR-1) y los marcadores de linfocitos T regulatorios, CD25, factor de transcripción FoxP3, antígeno asociado al linfocito T citotóxico 4 (CTLA-4) y CD45RO. También determinamos los niveles de óxido nítrico (NO) en el suero de estos pacientes. La frecuencia de linfocitos T CD8+ de memoria y efectores totales que expresan LIR-1 se encuentra aumentada en pacientes con cardiopatía severa comparado con pacientes asintomáticos ($P < 0.01$) y controles ($P < 0.01$). Contrariamente la población T CD4+ que expresa LIR-1 no se altera durante la infección por *T. cruzi*. También se observó un aumento significativo de la población con fenotipo para T reg CD4+ (alta expresión de CD25, FoxP3, CTLA-4 y RO) en los pacientes con sintomatología severa ($P < 0.05$ vs asintomáticos y controles) quienes también presentaron niveles aumentados de NO en el suero ($p < 0.05$ vs controles; $p < 0.001$ vs asintomáticos). La presencia de linfocitos T con capacidad para inhibir la respuesta inmune en los pacientes con mayor compromiso cardíaco podrían explicar la baja frecuencia de linfocitos T de memoria específicos para *T. cruzi* en estos pacientes.

537. (667) EFECTOS FISIOLÓGICOS DE ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES P DE TRYPANOSOMA CRUZI. LEVY GABRIELA VANESA, LABOVSKY VIVIAN, POZO LARISA, GOMEZ KARINA A, LEVIN MARIANO J

INGEBI

La Cardiopatía Chagásica Crónica (CChC) es una manifestación crónica de la infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) caracterizada por altos niveles de anticuerpos (Ac) contra la región C-terminal ácida de proteínas ribosomales P del parásito (epítipo R13 de la proteína TcP2beta). Este epítipo tiene homología con el segundo rulo extracelular de receptores cardíacos acoplados a proteína G. Las fracciones de Inmunoglobulinas G (IgG) de pacientes fueron estudiadas por ELISA contra epítipes de *T. cruzi* y contra el péptido H26R correspondiente al segundo rulo extracelular del receptor beta-1 adrenérgico (beta-1 AR). Además, las IgGs fueron reactivas en técnicas de inmunocitoquímica en células establemente transfectadas con el beta-1 AR, sugiriendo una interacción física entre Acs anti-R13 con reactividad cruzada con el beta-1 AR. Dichas IgGs tienen un efecto funcional con el receptor beta-1 AR, induciendo un aumento en los niveles de AMPc y produciendo una baja tasa de internalización en comparación con la acción del agonista. Cuando se incuban las células cardíacas HL-1 con Ac anti-R13 se observa por medio de ensayos de Tunel un 35% de células apoptóticas. Estos resultados están siendo corroborados por medio de PCR en tiempo real de los niveles de expresión de BAX y BCL-XL y mediante inmunodetección con Ac recombinantes contra el fragmento de 40kDa de la proteína hU1-70K. Estos resultados podrían contribuir a la comprensión de la fisiopatología cardíaca en la Enfermedad de Chagas.

538. (668) PROPIEDADES AUTOREACTIVAS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI. SIMONETTI LEANDRO, NIBORSKI LETICIA, SMULSKI CRISTIAN R, GRIPPO VANINA, LEVIN MARIANO J

INGEBI

Una agresión autoinmune podría explicar la génesis de la Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CChC). Para demostrar el posible rol de los anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi* sobre tejido cardíaco, se clonaron IgG de sitios de lesión cardíaca de pacientes y un anticuerpo monoclonal murino contra la región C-terminal de la proteína ribosomal P de *T. cruzi*, y se expresaron como recombinantes de cadena simple (scFv). Las regiones variables de IgG humanas clonadas, se expresaron en cultivos bacterianos y demostraron tener una actividad estimuladora de cardiocitos neonatales de rata en cultivo primario, actuando como agonistas del receptor β 1-adrenérgico (β 1-AR). Western blots mostraron que estos scFv reconocen una proteína de ~20 kDa en lisados de *T. cruzi*. A partir de una línea monoclonal de IgG anti-P que presentan propiedad estimuladora sobre receptores cardíacos, se construyeron scFv de dos tipos, C5 (dimérico) con un Kd = 8nM por la proteína TcP2 β , y un Kd = 10 μ M contra el segundo rulo extracelular del receptor β 1-AR; y B7 (monomérico) con un Kd = 46nM por la proteína de *T. cruzi*. C5 produjo un aumento de AMPc en células CHO transfectadas con el β 1-AR e indujo alteraciones de ECG mediante transferencia pasiva a ratones; mientras que B7 presentó efecto bloqueante del estímulo por isoproterenol. Este estudio se completó con el clonado de scFv humanos anti-P logrados a partir del rastreo de bibliotecas combinatoriales de anticuerpos de pacientes con CChC. Se obtuvieron varios de estos anticuerpos que están siendo caracterizados en cuanto a su funcionalidad. Los resultados obtenidos en estos trabajos confirman el rol del *T. cruzi* en la CChC al demostrar que induce una respuesta humoral con propiedades autoreactivas sobre receptores cardíacos.

539. (215) RESULTADOS DISCORDANTES PARA EL DIAGNÓSTICO DE CHAGAS EN PACIENTES LÚPICOS CON ANTICUERPOS ANTI RIBOSOMAL-P. ARCAVI MIRIAM, DAPRATO BETINA

Inmunología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica

Introducción: Los sueros de pacientes lúpicos con anticuerpos anti ribosomal-P, reconocen a las proteínas ribosomal-P recombinantes humanas y del *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Los

sueros de los pacientes chagásicos sólo reconocen proteínas ribosomal-P recombinantes del T.cruzi. El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se realiza cuando 2 técnicas diferentes dan resultados reactivos, debiéndose recurrir a una tercera técnica cuando ambas dan discordantes. Objetivos: Observar si la presencia de anticuerpos anti ribosomal-P en pacientes lúpicos, podría ser un factor de falsos reactivos o resultados discordantes para el diagnóstico serológico de Enfermedad de Chagas. Materiales y Métodos: Se seleccionaron 22 sueros de pacientes lúpicos, 11 presentaban anticuerpos anti ribosomal-P y 11 controles sin anticuerpos anti ribosomal-P. A todos los sueros se les realizó la siguiente serología para Chagas: Hemaglutinación indirecta (HAI: extracto citoplasmático), Inmunofluorescencia indirecta (IFI: parásito entero) y Enzimoimmunoanálisis recombinante (EIAR). RESULTADOS: Los sueros de los pacientes con anticuerpos anti ribosomal-P, presentaron la siguiente serología para Chagas: 7 reactivos por HAI, 11 no reactivos o dudosos por IFI (fluorescencia citoplasmática inespecífica) y 11 no reactivos por EIAR. Los sueros controles fueron no reactivos por las tres técnicas. CONCLUSIONES: El 63,6% de los pacientes lúpicos con anticuerpos anti ribosomal-P, reconocieron al ribosomal-P del T.cruzi presente en el extracto citoplasmático que utiliza la HAI. Sin embargo, no reaccionaron contra las proteínas recombinantes (EIAR no reactivo), ni reconocieron proteínas de la membrana y flagelo del parásito (IFI no reactivo). La presencia de anticuerpos anti ribosomal-P es un factor de resultados discordantes para el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas.

540. (407) LA TASA DE INTERNALIZACIÓN DEL TCR EN LINFOCITOS MART-1 ESPECÍFICOS AUMENTA CON LA CONCENTRACIÓN DE TETRÁMEROS DE MHC. FURMAN DAVID (1), VON EUW ERIKA (1,2), LEVY ESTRELLA (1), BARRIO MARCELA M (1), BIANCHINI MICHELE (1), MORDOH JOSE (1,2)

CIO Centro de Investigaciones Oncológicas, FUCA (1); Fundación Instituto Leloir (2)

La función efectora de linfocitos T citotóxicos (CTL) depende de la interacción del TCR con complejos péptido-MHC en la célula blanco y puede ser modulada por la internalización del TCR. Se ha sugerido que células tumorales o infectadas con virus pueden escapar al ataque inmune por selección de variantes con baja o nula expresión de moléculas MHC. El objetivo del presente trabajo es estudiar la velocidad de internalización del TCR (viTCR) en respuesta a distintas concentraciones de tetrámeros MHC (tMHC) (ligando) y determinar si la unión del ligando induce una respuesta efectora en forma dosis-dependiente. Se utilizó un clon de linfocitos CD8+ específicos para MART-1 (AAGIGLTV) restringidos para HLA A-0201 que fueron incubados con distintas concentraciones de tMHC, y se midió la fluorescencia (MFI) en el tiempo (0 a 120 minutos) por citometría de flujo. Con el objeto de estimar el número de receptores ocupados para cada MFI, se utilizaron microesferas marcadas con cantidades conocidas del fluoróforo ficoeritrina (QuantIBRITES). Para determinar el efecto de la unión de tMHC al viTCR por ELISA. Las viTCR sobre la función efectora, se midió la producción de IFN- γ células fueron observadas por microscopía confocal para determinar la ubicación subcelular del TCR luego de su internalización. Hemos observado que a una concentración saturante de tMHC (12 μ g/ml) correspondiente a una ocupación inicial estimada de 105.100 TCR/célula, la viTCR es de 380 TCRmin-1, mientras que a concentraciones sub-saturantes de tMHC, la viTCR disminuye en forma logarítmica. Se detectó producción de IFN- γ dosis-dependiente a partir de una ocupación de 360 TCR/célula. Nuestros resultados indican que la tasa de internalización del TCR aumenta con la concentración de tMHC y que la ocupación mínima para inducir producción de IFN- γ detectable es de 360 TCR. Estudios posteriores permitirán dilucidar el destino del TCR en distintas condiciones de ligando y su implicancia en la respuesta T.

541. (465) RESISTENCIA A LA APOPTOSIS EN CÉLULAS CRONICAMENTE INFECTADAS CON HIV-1. PABLO NI-

COLAS FERNÁNDEZ LARROSA(1), DIEGO RIVA(2), MARIEL BIBINI(1), RENATA LUZZI(1), MÓNICA SARACCO(1), SUSANA MERSICH(2), LILIANA MARTÍNEZ PERALTA(1).

(1) Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Facultad de Medicina, UBA; (2) Departamento de Química Biológica, Facultad de Cs Exactas y Naturales, UBA

La supervivencia de reservorios virales es uno de los más importantes inconvenientes que existen para lograr la erradicación de la infección de HIV-1. Para analizar el efecto citopático del virus en dichos reservorios, células persistentemente infectadas fueron tratadas con diversos inductores de apoptosis. Las líneas persistentemente infectadas (H9/HTLVIII B, J1.1 y U1), y no infectadas (H9, Jurkat y U937) fueron tratadas con STS o H₂O₂. Controles sin tratamientos (C) fueron realizado en paralelo. A las 24 horas post-tratamiento, se evaluó: a) niveles de apoptosis temprana (anexina-V/IP); b) niveles de apoptosis tardía (Hoechst y APO-BRDU); c) viabilidad celular (reactivo de MTT); y d) producción de antígeno p24 (ELISA). La inducción de la producción viral fue ensayada en J1.1 y U1 con TNF- α y PMA respectivamente. Para el análisis estadístico, se realizó un ANOVA. El tratamiento con 0,1 μ M STS resultó en 13% (H9/HTLVIII B), 7,5% (J1.1) y 13,2% (U1) de apoptosis temprana, mientras que en las H9, Jurkat y U937 los valores fueron mucho mas altos: 50%, 45% y 55% respectivamente (p<0,01). Con respecto al tratamiento con H₂O₂ (10 μ M), los resultados fueron similares: 45% (H9/HTLVIII B) y 60% (H9); 16% (J1.1) y 40% (Jurkat) (p<0,01). El ensayo con 50 μ M H₂O₂ presentó un 35% de apoptosis en U937 y 16,5% de apoptosis en U1 (p<0,01). Estos resultados fueron confirmados por los análisis de MTT y de APO-BRDU. Las células infectadas presentaron una disminución significativa de los niveles p24 en ambos tratamientos. El aumento de p24 en J1.1 y U1 no afectó la viabilidad de las células. Se concluye que las líneas persistentemente infectadas pueden resultar resistentes a agentes proapoptóticos en comparación con las líneas no infectadas, independientemente de la replicación viral. Esta resistencia in vitro podía ayudar a comprender mejor la alta supervivencia in vivo de los reservorios virales y por ende, la persistencia de la infección de HIV.

542. (707) INFLAMACIÓN ALÉRGICA Y EXPRESIÓN DE TLR4 EN LAS CÉLULAS BRONQUIOLARES DE CLARA: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON BUDESONIDA Y MONTELUKAST. ROTH FÉLIX, QUINTAR AMADO, AOKI AGUSTÍN, MALDONADO CRISTINA

Centro de Microscopía Electrónica

Las células bronquiolares de Clara (CC) secretan CC16 que modula respuesta inmune en pulmón. El estado alérgico afecta la función de las CC, disminuyendo la expresión de CC16. Los receptores tipo Toll (TLR) son moléculas clave en la defensa de las mucosas, estableciendo un nexo entre inmunidad innata y adaptativa; sin embargo no se conoce su vinculación con la actividad de las CC. Nuestro objetivo fue evaluar las consecuencias de la inflamación alérgica sobre la expresión de TLR4 en CC en un modelo de asma, y determinar el potencial de budesonida y montelukast para revertirla. Se emplearon 4 grupos de ratones de la cepa BALB/c: Alérgico: animales sensibilizados con OVA por vía i.p. y post-expuestos a aerosol de OVA por 30 días (30 min/día). BUD: ratones del grupo Agudo tratados luego con aerosol de budesonida (40 μ g/ml) por 7 días (30 min/día). MK: grupo Agudo post-tratado con montelukast por vía oral (5mg/kg) por 7 días. Control: ratones inyectados y expuestos a sol. fisiológica. Se analizaron los niveles de CC16, TLR4, TGF β 1 y TNF α por ICQ y western blot (wb). Los animales control expresaron TLR4 a nivel de mitocondrial en las células de Clara. El grupo alérgico presentó CC con fenotipo caliciforme, y la expresión de CC16 y TLR4 disminuyeron por ICQ y wb, mientras que las citoquinas aumentaron respecto al control. Los grupos BUD y MK demostraron reversión del fenotipo alérgico y la disminución en los niveles de TGF β 1 y TNF α . Por ICQ se observó recuperación de la expre-

sión de CC16 y TLR4; el incremento de TLR4 fue mayor en el tratamiento con BUD. Estos resultados evidencian que la inflamación alérgica disminuye el potencial de las CC para reconocer bacterias y poner en marcha mecanismos inmunológicos de defensa, y el potencial antiinflamatorio de la CC16. La localización mitocondrial podría indicar una forma latente de disponibilidad del receptor. Los glucocorticoides demostraron mayor potencial para estimular la inmunidad innata en CC.

543. (365) UTILIDAD DE DETERMINAR ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDOS CÍCLICOS CITRULINADOS. GARGIULO ANGELES, SUAREZ LORENA, SARANO JUDITH

Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari. UBA

Aunque nuevas metodologías diagnósticas han mejorado la sensibilidad de la detección del FR, este autoanticuerpo sigue siendo poco específico. La presencia de anti-CCP en pacientes con AR parecería ser un marcador más específico de la enfermedad y útil para establecer el tratamiento temprano de la AR. Objetivo: determinar la utilidad de dosar anti-CCP en pacientes con AR, y otras patologías que pueden cursar con FR. Materiales y métodos: se estudiaron 36 pacientes (19 AR, 17 con otras enfermedades autoinmunes o infecciosas) y 10 normales sanos. El anti-CCP se detectó por ELISA de 2ª generación (valor de corte > 20 U) y el FR por aglutinación de partículas de látex (corte 1/80). Análisis estadístico con Test de Fisher, se consideró significativa $p < 0.05$. Resultados: el FR fue positivo (+) en 10/19 AR vs 8/17 ($p=0.5$) pacientes con otras enfermedades, el anti-CCP fue (+) en 10/19 AR vs 3/17 del otro grupo ($p=0.02$). Los dos marcadores fueron positivos en 6/19 AR vs. 2/17 ($p=0.15$) y en ausencia de FR los anti-CCP fueron positivos en 4/19 AR y en un paciente con endocarditis (1/17) ($p=0.2$). Ningún paciente control tuvo FR ni anti-CCP. Conclusiones: la presencia de factor reumatoide no mostró diferencia significativa entre pacientes con o sin AR. Los anti-CCP fueron significativamente más frecuentes en el grupo de pacientes con AR, encontrándose una especificidad de los mismos del 88.0% vs el 67.9% del FR. La detección de ambos anticuerpos (FR + anti-CCP) identificó un 44 % de pacientes AR seronegativos permitiendo una conducta terapéutica precoz.

544. (456) EFECTO DE LOS LIPOARABINOMANANOS (LAMS) SOBRE LA RESPUESTA CELULAR DEL BOVINO FRENTE A ANTÍGENOS SOLUBLES Y PARTICULADOS. COLAVECCHIA SILVIA, FERNANDEZ ELOY, MUNDO SILVIA

Inmunología Facultad de Ciencias Veterinarias UBA; Clínica de Rumiantes Facultad de Ciencias Veterinarias UBA

Los LAMs son lipoglicanos anfipáticos de las paredes celulares de micobacterias patógenas y oportunistas. Briken y col. 2004, sostienen que los LAMs de patógenos modulan la respuesta inmune favoreciendo el establecimiento de la infección. El objetivo fue determinar el efecto de los LAMs de micobacterias patógenas sobre la respuesta celular del bovino frente a antígenos solubles y particulados. Los LAMs de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* inactivadas por calor (Maai) fueron purificados y caracterizados por el método de Hamasur, 1999. 3 dosis de 1 mg de LAMs fueron utilizados para inmunizar por vía subcutánea cada 15 días a grupos (G) de terneros de 1 año de edad. G1 (n=2): PBS en adyuvante de Freund incompleto (AFI); G2 (n=3): 1 mg de ovoalbúmina (OVA) en AFI y glóbulos rojos caninos (GR) al 2% en PBS; G3 (n=3): 1 mg de OVA y 1 mg de LAMs en AFI y GR al 2% en PBS; G4 (n=2): 2 mg de Maai en AFI; G5 (n=3): 2 mg de Maai y 1 mg de LAM en AFI. Los terneros fueron evaluados antes y 21 días después de la última inmunización. La actividad de los fagocitos se evaluó por estallido respiratorio (ER) por NBT (Adap.L. Ramayo). La inmunidad celular se determinó in vitro por linfoproliferación (LP) frente a OVA; GR; derivado proteico purificado de micobacterias (PPD) y Concanavalina A (ConA) e in vivo por intradermorreacción (IDR). Los ER de G con LAMs (0.16 ± 0.08) disminuyeron significativamente respecto de los G sin LAMs (0.27 ± 0.09), sólo los G inoculados con Maai fueron positivos para

la IDR (> 3mm). A partir de estos resultados se puede concluir que la incorporación de LAMs al preparado inmunogénico o inoculado en forma simultánea modula la respuesta inmune celular del bovino evaluada in vitro.

Grupos Ag	LP (IS: X±DS)			
	G2,G3 OVA	G2,G3 GR	G4,G5 PPD	G2,G3,G4,G5 ConA
sin LAM	1,91±0,51	1,85±0,76	4,11±0,36	11,52±4,22
con LAM	2,74±0,85*	2,80±0,68*	4,33±0,54	19,11±8,26*
Control G1	1.38±0.08	1.52±0.02	1.17±0.016	13.35±2.85

* $p < 0.05$ por t de student, IS: Índice de estimulación

545. (444) CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNO-ADYUVANTE DE LIPOSOMAS POLIMERIZADOS. GAS-PARRI JULIETA, SPERONI LUCÍA, ALONSO SILVIA

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes

Los liposomas han sido utilizados como adyuvantes inmunológicos y como sistemas de transporte de una gran variedad de sustancias biológicas a tejidos específicos para aumentar la respuesta inmune a diversos antígenos. La utilidad potencial de los liposomas ha atraído el interés para su utilización en el desarrollo de nuevas vacunas y sistemas de transporte debido a que el material encapsulado es liberado de manera progresiva y particulado por las vesículas. El uso de liposomas polimerizados adquiere importancia ya que al ser más estables que los liposomas convencionales permiten un transporte de antígeno más efectivo a las células presentadoras de antígeno. Estudios previos mostraron que ratones inmunizados vía intraperitoneal utilizando estos liposomas como inmunoadyuvante, presentan un título de anticuerpos significativamente mayor que los tratados con vesículas no polimerizadas. Con el fin de continuar el estudio del efecto de la polimerización en la acción inmunoadyuvante de estos liposomas, las vesículas se administraron junto con la proteína β -lactamasa. Esta proteína no posee capacidad inmunogénica si no es coadministrada con un inmunoadyuvante. Se realizaron dos inoculaciones en ratones Balb/c vía intradérmica al día 0 y 14, con liposomas polimerizados y no polimerizados. Para determinar la respuesta inmune humoral y celular desarrollada por cada uno de estos sistemas, se realizaron medidas de hipersensibilidad retardada (DTH) y determinaciones de anticuerpos por ELISA. Los resultados obtenidos de las medidas de IgG totales a las 5 semanas (tabla 1) reflejan un aumento en la inmunogenicidad del antígeno hasta tres veces mayor en los liposomas polimerizados respecto a los no polimerizados.

Tabla 1

Inmunización	DO 490	SD
Liposomas polimerizados + b-lactamasa	0,926	0,145
Liposomas no polimerizados + b-lactamasa	0,293	0,096
b-lactamasa	0,061	0,023

546. (662) ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD CLÍNICA Y NIVELES DE AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS A NEFRITIS EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES). GALARZA PABLO ERNESTO, DIEZ ROSAURA SOLANGE, COSENTINO VALERIA, GRIMAUO SEBASTIAN, CASELLAS ANGELA

Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari"

La coexistencia de autoanticuerpos anti-nucleosomas (a-ncu) y anti-ADN nativo (a-ADNn) se asocia al desarrollo de la nefritis lúpica. En estudios previos sugerimos la ventaja de usar ambos como predictores del compromiso renal. El objetivo de este trabajo es analizar la relación entre los niveles de estos anticuerpos y la actividad de la enfermedad desde el comienzo de la nefropatía. Se estudiaron 10 pacientes de sexo femenino con diag-

nóstico de LES. Cada uno fue evaluado, al menos, en tres oportunidades desde el diagnóstico de la nefropatía con intervalos mayores a 6 meses. A todos los pacientes se les efectuó, al menos, una biopsia renal y fueron tratados con pulsos de ciclofosfamida. Anticuerpos a-ADNn (UI/ml) y a-nuc (IB) fueron cuantificados por ELISA. Se utilizó el SLEDAI (SLE Disease Activity Index) como medida de la actividad de la enfermedad. El estudio anatomopatológico de las biopsias renales mostró: 3 glomerulonefritis proliferativas focales, 6 glomerulonefritis proliferativas difusas y 3 glomerulonefritis membranosas difusas. De ellas, 10 presentaron signos de actividad. Cuando el valor de a-nuc es elevado (IB > 3), se observa una mediana del SLEDAI de 10; cuando es menor (IB < 3) la mediana es de 4 (p=0.01). Cuando el valor de a-ADNn es elevado (> 300 UI/ml), la mediana del SLEDAI es 12; cuando es menor (< 300 UI/ml) la mediana es de 6 (p=0.04). En 7/10 pacientes se observó una descenso del SLEDAI desde el momento del diagnóstico de la nefropatía. En 5/7 pacientes (p > 0.05) los niveles de a-nuc acompañaron esta reducción, en 3/7 (p > 0.05) aADNn y en 6/7 (p=0.03) al incluir alguno de los dos anticuerpos. Se muestra una asociación positiva entre los niveles elevados de a-ADNn y a-nuc con la actividad del LES en pacientes con nefropatía. Al analizar cada paciente durante la evolución de la enfermedad a partir del diagnóstico de la nefropatía, sólo se evidencia esta asociación al considerar los niveles de ambos autoanticuerpos.

547. (715) ALGUNOS MARCADORES SEROLÓGICOS DE AUTOINMUNIDAD Y ESTADO INFLAMATORIO EN PERSONAS MAYORES DE 65 AÑOS MANGINELLI YANELA, GRIMAUDDO SEBASTIÁN, CASELLAS ANGELA

Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari"

El sistema inmune exhibe profundos cambios relacionados con la edad, llamados en su conjunto inmunosenescencia, que incluyen la declinación de la respuesta inmune y el aumento paradójico de niveles de autoanticuerpos. El propósito de este trabajo es evaluar algunos marcadores serológicos de autoinmunidad y estado inflamatorio en personas mayores de 65 años. Se incluyeron 89 individuos sin enfermedad inmune conocida en dos grupos de edades: > 65 años (n=62) y < 65 años (n=27). Se estudiaron los niveles de anticuerpos anti-nucleares (FAN) por inmunofluorescencia (células HEP-2), anticuerpos anti-ADN nativo (n) y anti-nucleosomas por ELISAs. Para los niveles de factores reumatoideos y proteína C reactiva se realizaron tests de aglutinación pasiva y la capacidad funcional del complemento se cuantificó por la técnica de Kent y Fife (UCH50/ml). Al comparar > 65 años vs < 65 años para cada determinación se observó FAN positivo (+) en 14/62 vs 4/12, respectivamente (p=0.27). Anti-ADNn (+) en 17/62 vs 3/27 (p=0.07). Anticuerpos anti-nucleosomas (+) en 3/62 vs 1/27 (p=0.65). Factores reumatoideos (+) en 5/62 vs 1/12 (p=0.62). Niveles elevados de proteína C reactiva en 5/62 vs 0/12 (p=0.40). Niveles bajos de UCH50/ml por ml 14/62 vs 3/27 (p=0.17). Presentan, al menos, un autoanticuerpo 27/62 vs 7/12 (p=0.26). No se observó diferencia significativa en estos autoanticuerpos evaluados, comúnmente utilizados en el estudio de autoinmunidad, entre ambos grupos etarios. Tampoco se observó una diferencia significativa para los niveles de PCR y de complemento. Estos marcadores estudiados no reflejan un proceso de inmunosenescencia en personas mayores de 65 años.

548. (390) EL PERFIL CLÍNICO DEL PACIENTE TUBERCULOSO. II. RELACION ENTRE PERDIDA DE MASA CORPORAL Y PARAMETROS INMUNOENDOCRINOS. BOZZA VERONICA, MAHUAD CAROLINA, DIDOLI GRISELDA, PEZZOTTO STELLA MARIS, GIRI ADRIANA, BAY MARIA LUISA, BOTTASSO OSCAR

Instituto de Inmunología, Fac. de Cs. Médicas UNR. Área de Virología, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas UNR

En razón de la interrelación entre la pérdida de masa corporal con la respuesta inmune celular in vitro hacia la micobacteria,

procedimos a analizar si dicho trastorno (evaluado por medio del índice de masa corporal -IMC) se asociaba con modificaciones en los niveles circulantes de citocinas (IFN-gamma e IL-6) y hormonas [cortisol, dehidroepiandrosterona -DHEA-, somatotrofina, y hormonas tiroideas (T3-T4)], en los 31 pacientes activos sin tratar. Si se tienen en cuenta los valores normales, los pacientes presentaron niveles aumentados de IL-6 (189 ± 26 pg/ml, media ± es), IFN-gamma (50 ± 5.2 pg/ml), cortisol (233±13.5 ng/ml), como así también somatotrofina, T3 y T4. A la vez que DHEA (4.06 ± 0.59 ng/ml) y el IMC (21.1 ± 0.6) aparecieron por debajo de lo que habitualmente se observa en la población sana. Los estudios de correlaciones lineales no mostraron asociaciones significativas entre IMC y los niveles de IFN-gamma, somatotrofina, T3 y T4, pero sí se detectó una correlación negativa y significativa cuando dicho índice se enfrentó a IL-6 (r: -0.42, p < 0.025). Citocina que a su vez se correlacionó positivamente con los niveles de cortisol (r: 0.71, p < 0.001). Dado este juego de relaciones entre IMC, IL-6 y esteroides adrenales se aplicó el ajuste por medio de la regresión múltiple (IL-6, IMC, Cortisol y DHEA) para obtener el porcentaje de variancia explicada (R2). Con ello se pudo constatar que la relación IMC-IL-6 y Cortisol-IL-6 conservaban su significado más allá del ajuste efectuado para las restantes variables intervinientes (IMC-IL-6 r: -0.46, p < 0.03; IL-6-Cortisol r: 0.73, p < 0.001; R2: 66%). La interrelación entre pérdida de masa corporal y cambios en respuesta inmune, al momento del diagnóstico de la enfermedad, estaría en parte vinculada al desbalance inmunoendócrino coexistente.

549. (579) POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE TGF-β1 E IL-10 ASOCIADOS AL DESARROLLO DE FIBROSIS EN PACIENTES CON HCV. PALADINO NATALIA (1), FLORES ANA CLAUDIA (1), FAINBOIM HUGO (2), THEILER GRACIELA (1), SCHRODER TERESA (2), MUÑOZ ALBERTO EDUARDO (3), GALDAME OMAR (4), ARRUVITO LOURDES (1), FAINBOIM LEONARDO (1)

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas (1); Unidad de Hepatología, Hospital de Enfermedades Infecciosas F. J. Muñiz (2); Unidad de Hepatología, Hospital de Gastroenterología Dr. C. Bonorino Udaondo (3); Sección Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires (4)

Gran parte de los individuos infectados con el virus de la Hepatitis C (HCV) desarrollan la enfermedad crónica (60-80%), la cual frecuentemente evoluciona hacia la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. El hallazgo de factores predictivos es importante a fin de evitar dichos procesos patológicos. Recientemente hemos demostrado la implicancia de la interleucina-10 (IL-10) como factor anti-fibrogénico. En cambio, el Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) es una citocina con actividad inmunoregulatoria y pro-fibrótica. En los pacientes con HCV, los niveles de TGF-β1 en el suero y en el hígado correlacionan positivamente con el grado de fibrosis. Nosotros investigamos mediante la técnica SSOP (sequence-specific oligonucleotide probing) dos polimorfismos ubicados en la secuencia señal en el exon 1 del gen de TGF-β1 que afectan los niveles de expresión de la misma (Leu10Pro y Arg25Pro). Estos polimorfismos se analizaron solos y en combinación con polimorfismos en el promotor de IL-10 en 245 Argentinos infectados con HCV agrupados en función de la evolución de la enfermedad. Resultados: Hallamos en los pacientes con HCV una disminución en la frecuencia del alelo 25Pro (bajo productor) en comparación con los controles (p=0.043, OR=0.55). Esta disminución resultó más evidente en individuos que presentan algún grado de fibrosis (F1-4; p=0.018, OR=0.25). El análisis conjunto del polimorfismo de TGF-β1 e IL-10 reveló un incremento en la frecuencia de individuos 25Pro+ IL-10GG (posición -1082: genotipo alto productor) en los pacientes que no desarrollan fibrosis (F0; p=0.045, OR=0.09). En conclusión, la capacidad genética de producir elevados niveles de TGF-β1 sería un factor de riesgo para la evolución a cirrosis. Por el contrario, elevados niveles de IL-10 contribuyen a prevenir el desarrollo de fibrosis en pacientes infectados con HCV.

ENDOCRINOLOGÍA VI

- 550. (385) INHIBICIÓN ADRENOCORTICAL DE LA ENZIMA BETAÍNA-HOMOCISTEÍNA METILTRANSFERASA EN RIÑÓN DE RATA.** BORTONI LAURA EGGLE (1), MORALES ANALÍA VERÓNICA (1), PAZ DANTE (2), D'ERAMO JOSÉ LUIS (2), FRIDMAN OSVALDO (1)

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Área Investigación (1); Dto de Biodiversidad y Biología Experimental. FCEyN. UBA. (2)

La enzima remetilante de la homocisteína (Hcy), Betaina-homocisteína metiltransferasa (BHMT), está altamente expresada en los hígados de todos los vertebrados estudiados. Es abundante en riñón de primates y cerdo, pero no en el de rata, donde ha sido descrita solamente por inmunohistoquímica en cortez y no en médula. En estudios anteriores vimos que los glucocorticoides regulan positivamente los niveles y la actividad de esta enzima en hígado de rata. En el presente trabajo investigamos la participación de la corteza adrenal sobre la BHMT de riñón. Animales. Ratas hembras adultas Sprague-Dawley adrenalectomizadas (ADX) o falsamente operadas (Sham) y sacrificadas 15 días después. Otro grupo de ratas fue tratado con metil-prednisolona (MP) s.c (2mg/rata/día por 14 días). Los controles (Cont) recibieron vehículo. Métodos. Homocisteinemia [H(e)] se midió por quimioluminiscencia y la actividad de BHMT por un método radioenzimático. También se realizaron Western blot y Real Time RT-PCR. Resultados. La H(e) en $\mu\text{moles/L}$ de plasma fue en las ratas Sham: $3,8 \pm 1,1$ (n=4); ADX: $3,2 \pm 0,2$ (n=3); Cont: $2,8 \pm 0,1$ (n=4) y MP: $3,2 \pm 0,1$ (n=4) ($p < 0,05$ Cont vs MP. Tukey). La actividad de la enzima resultó indetectable por el método. La forma monomérica de 45 kDa de la proteína BHMT aumentó en los riñones de ADX y disminuyó en los de tratadas con MP. Los valores de mRNA de la BHMT resultaron 5,85 veces superiores en los riñones de ratas ADX versus SHAM y 3 veces mayores en Cont versus MP. Conclusiones. La adrenalectomía no modificó significativamente la H(e), sin embargo MP la aumentó. Otros autores vieron que los glucocorticoides reducen H(e) en ratas, aunque el síndrome de Cushing (hipercortisolemia) está asociado a hiperhomocisteinemia. Nuestros resultados muestran que los glucocorticoides que intervienen sobre la vía de remetilación de la Hcy, ejercen efectos opuestos sobre la presencia de BHMT en hígado y en riñón de rata. PIP 2402 CONICET.

- 551. (386) ESTIMULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA ENZIMA BETAÍNA-HOMOCISTEÍNA METIL TRANSFERASA EN HÍGADO DE RATA.** MORALES ANALÍA VERÓNICA, BORTONI LAURA EGGLE, D'ERAMO JOSÉ LUIS, FRIDMAN OSVALDO.

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Área Investigación

Introducción: La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular, una de las condiciones en la postmenopausia, caracterizada por la deficiencia estrogénica. La terapia de reemplazo hormonal puede reducir la homocisteinemia [H(e)], aunque los mecanismos aún no fueron dilucidados. Investigamos en hígado de rata el posible papel que juegan los estrógenos sobre la Betaina Homocisteína Metiltransferasa (BHMT), una de las dos enzimas remetilantes de la homocisteína a metionina. Animales. Ratas hembras adultas Sprague-Dawley ovariectomizadas (OVX) o falsamente operadas (Sham) y sacrificadas 5 semanas después. Otros dos grupos igualmente operados fueron tratados con valerato de estradiol s.c (OVX-E2 y Sham-E2) (1mg/rata/semana durante 4 semanas). OVX y Sham recibieron vehículo. Métodos. H(e) se midió por quimioluminiscencia y en hígado la actividad de BHMT por un método radioenzimático y su proteína por Western blot. Resultados. H(e) en $\mu\text{moles/L}$ de plasma fue: Sham: $5,1 \pm 0,2$ (n = 5) (a); Sham E2: $4,9 \pm 0,2$ (n=3) (a); OVX: $6,6 \pm 0,2$ (n=3) (b) y OVX-E2: $6,9 \pm 0,2$ (n=3) (b) ($p < 0,05$ a vs b. Tukey). La actividad de BHMT: Sham: $17,7 \pm 1,7$ (n=5) (ab); Sham-E2: $22,1 \pm 0,5$ (n=3)

(a); OVX: $14,3 \pm 0,9$ (n=3) (b) y OVX E2: $15,1 \pm 1,1$ (n=3) (b) ($p < 0,01$ a vs b. Tukey). La forma monomérica 45 kDa de la proteína BHMT aumentó en los hígados de Sham-E2 y OVX-E2 respecto de los de Sham y OVX. Conclusiones. Aunque E2 en las Sham no modificó la H(e) ni la actividad de la enzima y en las OVX no revertió el aumento de H(e) ni la reducción de la actividad de la BHMT, si se observaron efectos en las Sham-E2 vs OVX, las dos condiciones extremas respecto del estado estrogénico. Fue notoria la respuesta positiva frente a los estrógenos cuando se midió la proteína BHMT. Los resultados muestran que los estrógenos están involucrados en la regulación de la concentración de H(e) afectando la vía de remetilación hepática. PIP 2402 CONICET.

- 552. (218) ESTUDIO DEL PLEXO DE AUERBACH DEL YEYUNO DE RATAS DIABÉTICAS POR ALOXÁNO INYECTADAS EN EL POSESTETE.** PODESTA MARIA FLORENCIA, HISANO NORIYUKI

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

El plexo de Auerbach configura, en cada segmento del tracto digestivo, una imagen reticular característica. Aproximadamente el 27% de sus neuronas son nitrérgicas y pueden ser estudiadas a través de la técnica histoquímica del NADPH. En la diabetes, la cual puede ser inducida con aloxano, se han descrito alteraciones en los mecanismos de relajación dependientes del óxido nítrico, neurotransmisor relacionado con la relajación no-adrenérgica no-colinérgica. Se analiza la estructura del plexo de Auerbach del yeyuno de ratas macho diabéticas por aloxano. Ratas macho posestete (25 días de edad) Sprague Dawley fueron inyectadas con aloxano 24 mg/100 g peso i.p. [5 ratas control (c), 6 aloxano (a)] fueron sacrificadas con una sobredosis de éter a los 115 días de edad. Sus intestinos fueron disecados, lavados, medidos, pesados, fijados en paraformaldehído 4% en PBS, y procesados para la técnica del NADPH. Se procedió al contaje neuronal con un microscopio Zeiss montado con una cuadrícula, y a la medición de su tamaño con un microscopio Zeiss montado con un dispositivo lineal en el ocular. Se midieron los ejes neuronales asemejándolos a una superficie geométrica conocida. Los resultados se expresan en media \pm SEM. Se realizó el test 't' de Student para: peso corporal (a) $245,83 \pm 20,28$, (c) $550,08 \pm 13,6$ ($p < 0,001$); peso intestino delgado n.s.; longitud intestino delgado (a) $155,17 \pm 3,78$ mm, (c) $134 \pm 3,78$ mm ($p < 0,005$); contaje neuronal (a) $16,73 \pm 1,35/\text{mm}^2$, (c) $34,92 \pm 2,19/\text{mm}^2$ ($p < 0,003$); superficie neuronal (a) $264,54 \pm 11,57 \mu\text{m}^2$, (c) $175,86 \pm 7,08 \mu\text{m}^2$. ($P < 0,001$). Coeficiente de correlación cantidad de neuronas/ superficie neuronal = -0,87. En las ratas aloxánicas se observó disminución del peso corporal, aumento de la longitud del intestino con un aumento no significativo en su peso, una disminución del número de neuronas en el plexo de Auerbach con un aumento del tamaño de las mismas. Habría cierta asociación inversa entre el número y el tamaño neuronal

- 553. (264) ESTUDIO DEL PERFIL LIPÍDICO Y LOS NIVELES DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD OXIDADAS (LDL) EN EMBARAZADAS NORMO Y DISLIPIDÉMICAS.** VALDÉS MARÍA DE LOS ANGELES (1), PELUSA FABIÁN (1), DANIELE STELLA MARIS (1), CAILLE ADRIANA (1), ALMARÁ ADRIANA (1,2), DIMÓNACO RENÉ (3), RENZI JORGE (3), GHERSEVICH SERGIO (1), ARRIAGA SANDRA (1).

Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR (1); CIUNR (2); Facultad de Cs. Médicas UNR (3)

El embarazo es una condición que favorece el estrés oxidativo. Una variedad de mecanismos dirigidos contra su acción estaría involucrada en la protección de la unidad fetoplacentaria. Este estado de estrés podría favorecer el aumento de las LDLox. Previamente determinamos el intervalo de referencia para los niveles plasmáticos de LDLox en una población normal (PN). Los objetivos de este trabajo fueron establecer un rango de referen-

cia para los niveles plasmáticos de LDLox en embarazadas sanas normolipémicas (ES) y determinar los niveles plasmáticos de este parámetro en embarazadas dislipémicas (ED) según el Adult Treatment Panel III. Además se compararon los perfiles lipídicos de los distintos grupos. Se estudiaron 40 embarazadas entre el primer y segundo trimestre de gestación, provenientes del Servicio de Obstetricia del Hospital Provincial del Centenario: 27 ES y 13 ED. Se determinaron los niveles de colesterol (C) total, C-HDL, C-LDL y triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos. Los niveles de LDLox se determinaron mediante ELISA competitivo previamente desarrollado por nuestro grupo. El intervalo de referencia obtenido para LDLox en las ES fue de 1,0-2,6 unidades (U) LDLox. Los resultados del perfil lipídico (media \pm DE) se indican en la Tabla. Se encontraron aumentos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) de: C, C-LDL y TG para ED vs PN y ED vs ES, y de C-HDL para ES vs PN y ED vs PN. Los niveles de LDLox (ULDLox) fueron (mediana/rango): PN= 1,7/1,3-2,4; ES= 1,8/1,1-2,5; ED= 1,7/1,4-2,5. No se encontraron diferencias significativas para este parámetro entre los grupos estudiados. En conclusión, el aumento de C, C-LDL y TG en las ED, no se reflejó en una elevación de los niveles de LDLox. Esto podría atribuirse, al menos en parte, al efecto antioxidante de las HDL que se encuentran aumentadas en las ED.

Grupo	C (mg/dl)	C-HDL (mg/dl)	C-LDL (mg/dl)	TG (mg/dl)
PN	171 \pm 30	54 \pm 12	99 \pm 23	91 \pm 43
ES	177 \pm 28	61 \pm 15	94 \pm 21	109 \pm 41
ED	272 \pm 61	71 \pm 18	161 \pm 56	187 \pm 80

- 554. (281) VALORES DE REFERENCIA DE INSULINA EN AYUNAS E INDICES DE SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES DE AMBOS SEXOS.** GUERCIO GABRIELA, COSTANZO MARIANA, RODRIGUEZ JORGE, CHALER EDUARDO, MACEIRAS MERCEDES, DEL RIO LUIS, CHIRICO DIEGO, RIVAROLA MARCO A, BELGOROSKY ALICIA.

Hospital de Pediatría Garrahan

Diversos índices, derivados de la utilización de los niveles de glucosa e insulina (Ins) en ayunas, han sido validados y propuestos como métodos simples para la valoración de la Sensibilidad (SI) y la secreción de insulina en población pediátrica. Previamente hemos descrito que la SI, determinada por el Índice Glucemia/Insulina en ayunas (G/I) muestra cambios relacionados con la edad y el sexo durante la prepubertad (Pp) y el desarrollo puberal normal (Pu). El objetivo de este estudio es presentar los valores de referencia en ayunas de Ins, y diversos índices de IS e Insulinorresistencia (IR) en niños y adolescentes normales de ambos sexos. Fueron evaluados 174 niños Pp normales (67 mujeres, 107 varones) y 81 niños Pu normales (42 mujeres, 39 varones). El grupo Pp fue subdividido en dos grupos en función de la mediana de la edad cronológica en ambos sexos, y el grupo Pu fue subdividido en dos subgrupos en función del estadio mamario de Tanner en niñas y en función del volumen testicular en varones. El Índice G/I, HOMA-IR and HOMA-IS (homeostatic model assessment of insulin resistance and sensitivity) y el QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index) fueron calculados sobre las mediciones en ayunas de glucemia e Ins. La Ins sérica fue determinada por el método AXSYM ABBOTT Lab, USA. En el grupo total de niños ($n=255$) la Ins y los Índices calculados mostraron fuertes correlaciones (Coeficiente de Spearman > 0.97). Los diferentes parámetros mostraron diferencias estadísticamente significativas en función de la edad, el índice de masa corporal, el estadio puberal (ANOVA) y el sexo (Análisis de Covarianza). Se calcularon los Percentilos para la Ins y cada Índice estudiado en función de la edad, el sexo y el estadio de desarrollo puberal. Dado que la sensibilidad y la secreción de Ins cambian en función de dichas variables, los percentilos presentados en este estudio serían una herramienta útil para la evaluación de la población pediátrica Argentina

- 555. (466) EFECTO DEL BISFENOL A SOBRE EL EJE REPRODUCTOR EN RATAS PREPÚBERES.** REYNOSO ROXANA MARÍA, NANCY CARDOSO, BERTA SZWARCFARB, SILVIA CARBONE, OSVALDO PONZO, JAIME MOGUILLEVSKY, PABLO SCACCHI.

Facultad de Medicina UBA

El BPA es un componente químico utilizado en la fabricación de envases plásticos alimentarios, pegamentos, resinas de barnices, cañerías de agua y otros. Estudios experimentales han demostrado que éste actúa como un disruptor endocrino (DE), con acción estrogénica y antiandrogénica. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de este disruptor sobre el eje reproductor en ratas macho y hembra prepúberes, (15 días de edad), ($n=8-10$ /grupo), expuestas al mismo desde la concepción. El BPA se administró a la rata madre en el agua de bebida (dosis = 2,5 mg / kg/día), desde el inicio de la preñez y durante la lactancia, suministrándose el mismo a las crías luego del destete y hasta el momento del sacrificio. Se midieron los niveles plasmáticos de LH y FSH (RIA, ng/ml), contenido de Gn-RH en hipotálamo medio basal y área preóptica, (HMB-APO), actividad de óxido nítrico sintasa hipotalámica (Bredt Snyder mod., pmol NO/10 min/ HMB) y se evaluó el peso de útero y gonadas. Tanto LH como FSH descendieron significativamente en las hembras (96 ± 8.5 vs 32 ± 4.0 , $p < 0.001$); (348 ± 25 vs 280 ± 6.3 , $p < 0.01$). El contenido de Gn-RH y NOS, no mostraron diferencias significativas, al igual que el peso de ovarios y útero. En machos los niveles de LH aumentaron significativamente (44.6 ± 4.6 vs 76 ± 3.6 , $p < 0.001$), los niveles de FSH, contenido hipotalámico de Gn-RH, actividad de NOS y los pesos testiculares no mostraron cambios. Conclusión: El tratamiento pre y postnatal con BPA produce alteraciones del eje hipofiso-gonadal en ratas macho y hembra prepúberes. Nuestros resultados sugieren que BPA ejercería su efecto estrogénico y antiandrogénico actuando sobre el mecanismo de feed back a nivel hipofisario.

- 556. (467) LA ENZIMA DEGRADANTE DE INSULINA POSEE UNA FUNCIÓN ATPASA.** CAMBEROS MARÍA DEL CARMEN, PASSICOT GISEL A., CRESTO JUAN C.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Htal. de Niños R. Gutierrez

En un trabajo previo hemos publicado que la enzima degradante de insulina (EDI) es inhibida por ATP (Exp Biol Med 226: 334-341, 2001). Es por ello que estudiamos si la hidrólisis de ATP por EDI podía ser la forma de reversión de este mecanismo inhibitorio. EDI fue extraída de músculo de rata, la hidrólisis de ATP fue determinada por la liberación de ^{32}P a partir de γ - ^{32}P -ATP y la degradación de insulina con 125I-insulina. La función ATPasa fue investigada con varios métodos: cromatografía en Sephadex G200, inmunoprecipitación de EDI y electroforesis en gel de acrilamida en condiciones no disociantes (PAGE). Además se estudió EDI recombinante (rEDI) para comparar con EDI extractiva. Todos los resultados mostraron concordancia entre la degradación de insulina y la hidrólisis de ATP. rEDI y EDI extractiva mostraron similar hidrólisis de ATP sugiriendo que la enzima posee ambas funciones. Para definir esta función se estudiaron algunos inhibidores de EDI, fosfohidrolasas y ATPasas. Ninguna de las sustancias estudiadas tuvieron efecto sobre la hidrólisis de ATP excepto 1 mM ortovanadato (un inhibidor de ATPasas, fosfatasa y de la degradación de insulina). La hidrólisis de ATP sigue una cinética Michaelis-Menten con V_{max} : $570,45 \pm 113,08$ pmol/Pi/h y un aparente K_m : $63,13 \pm 3,48$ μM . Los estudios demostraron "binding" de ATP y la cinética enzimática estableció un solo sitio de "binding" por molécula de EDI. Estudios PAGE de EDI y "cross linking" de EDI-125I-insulina en presencia de ATP indicaron que el ATP produce cambios conformacionales y agregación enzimática. Los resultados permiten concluir que EDI posee actividad proteasa (degradación de insulina) y ATPasa y que el "binding" y la degradación de insulina son dependientes de la concentración de ATP.

557. (484) ACETIL-L-CARNITINA Y NICOTINAMIDA PREVIENEN LA EVOLUCIÓN DE LA DIABETES TIPO I. CRESTO JUAN C, BRUNO LIDIA E. FABIANO DE, CAO GABRIEL F., PASTORALE CLAUDIA, CONFALONIERI NICOLAS, CAMBEROS MARÍA DEL CARMEN, BASABE JUAN C

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Htal. de Niños R. Gutiérrez; Instituto de Patología, Facultad de Medicina, UBA

Se describe un tratamiento exitoso en un modelo de diabetes autoinmune del ratón empleando medicación no agresiva. Ratonos C57BL/6N fueron inyectados IP durante 5 días con subdosis de estreptozotocina para generar una diabetes autoinmune. Se estudiaron 4 grupos: controles (C), controles tratados (CT), diabéticos (D) y diabéticos tratados (DT). El día 6 los ratones tratados comenzaron a inyectarse IP con 50 mg/Kg de acetil-L-carnitina y 25 mg/Kg de nicotinamida durante 110 días. Los no tratados fueron inyectados con solución fisiológica y en todos se controló la evolución del peso y glucemia. Grupos de 4-6 ratones fueron sacrificados los días 0, 12, 30, 93 y 110. En ellos se determinó: insulina plasmática, agresión inmune, secreción de insulina (páncreas aislado y perifundido), área integrada bajo la curva y morfometría celular. Se usó el test "t" para la significación estadística. El tratamiento no modificó el peso, glucemia, insulina plasmática o secreción de insulina del páncreas en los controles (CT). La glucemia aumentó en D y DT hasta el día "53" en el cual comenzó a diferenciarse: mientras que en D continuó subiendo en DT comenzó a bajar (D [mg%]: días "0" 202; "53" 395; "86" 695. DT [mg%]: días "0" 190; "53" 407; "86" 355; "110" 291). La insulina plasmática fue: CT [μU/ml] basal: 36. D [μU/ml] días "12" 8; "86" 8. DT [μU/ml] días "12" 18; "86" 23; "110" 44 (P < 0.0005). La agresión inmune disminuyó en DT desde el comienzo del tratamiento y la morfometría celular fue coincidente con la evolución. Los controles no tuvieron modificaciones (C y CT). El grupo D tuvo una mortalidad de 4 sobre 11 a partir del día "67" mientras que DT no tuvo mortalidad. Se concluye que el tratamiento con acetil-L-carnitina y nicotinamida remite la diabetes autoinmune por subdosis de estreptozotocina. Este tratamiento puede ser aplicado como prevención en individuos con evolución hacia la diabetes tipo I.

558. (560) TRASCRIPCIÓN, EXPRESIÓN Y UNIÓN IN VIVO DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A LA NEOGÉNESIS INSULAR (INGAP). DEL ZOTTO HECTOR, BORELLI MARÍA INÉS, FLORES LUIS EMILIO, GARCÍA MARÍA ELISA, BOSCHERO ANTONIO CARLOS, GAGLIARDINO JUAN JOSÉ.

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA); Departamento de Fisiología y Biofísica, Instituto de Biología, Universidad de Campinas (UNICAMP), Brasil

Objetivo: Estudiar en hamsters normales la transcripción y la presencia inmunocitoquímica (IC) de INGAP (islet neogenesis-associated protein) en diferentes tejidos y medir en ellos la unión in vivo de un análogo tirosilado de INGAP biológicamente activo (T-INGAP-PP). Material y Métodos: Se estudió la transcripción de INGAP (RT-PCR) y su expresión inmunocitoquímica (células INGAP-positivas) en diferentes tejidos de hamsters normales. También se inyectó a estos animales I125-T-INGAP-PP sin o con el agregado de T-INGAP-PP (0-1 mg/100 g de peso corporal) obteniéndose muestras de sangre entre 5 y 60 minutos después de la inyección. Posteriormente determinamos la radioactividad en suero, cerebro, hígado, riñón, intestino delgado y páncreas expresando los resultados como la relación órgano/suero. Resultados: identificamos células INGAP-positivas y ARNm de INGAP sólo en islotes pancreáticos y en el páncreas exocrino. La radioactividad en las muestras de suero aumentó de 0 (1,952 cpm/g suero) a 60 min. (36,566 cpm/g suero). El 71% de esta actividad fue desplazada por la administración simultánea de T-INGAP-PP a los 5, 10 y 20 min., pero el desplazamiento disminuyó al 9% los 60 min. El hígado, páncreas e intestino delgado mostraron una unión

específica (desplazable > 50%) para 125I-T-INGAP-PP; el desplazamiento del 50% obtenido con una dosis de 39.10² ng de T-INGAP-PP/100 g de peso, sugiere la presencia de un receptor pancreático de baja afinidad para este péptido. Conclusiones: La transcripción/expresión de INGAP estaría restringida al páncreas donde ejercería su efecto en forma paracrina. El INGAP podría liberarse y circular unido a una proteína sérica y posteriormente se uniría al hígado para su ulterior inactivación. En cambio su unión al intestino delgado explicaría la presencia inmunocitoquímica de INGAP en este órgano, donde jugaría un papel importante en la regulación del recambio de células epiteliales.

559. (597) ALTERACIONES METABÓLICAS EN RATAS INMADURAS POR EXPOSICIÓN PRE Y POST NATAL AL DISRUPTOR ENDOCRINO DEHP (DI-2-ETILHEXILFTALATO). COSTA LILIANA, SZWARCFARB BERTA, CARBONE SILVIA, MIRANDA ADRIANA INES, DEGUIZ MARIA LAURA, MOGUILLEVSKY JAIME, SCACCHI PABLO

Hospital Evita Pueblo de Berazategui; Laboratorio de Endocrinología-Departamento de Fisiología-Facultad de Medicina-UBA.

Existen datos respecto a efectos del DEHP sobre el metabolismo hidrocarbonado y lipídico, relacionados con una acción tóxica a nivel hepático en ratas adultas. El objetivo del estudio fue evaluar parámetros metabólicos: glucosa (mg/l), colesterol (mg/dl) y triglicéridos (mg/dl) plasmáticos (método enzimático colorimétrico automatizado) en rata hembras y machos (n=10 por grupo) prepúberes (15 días de edad) y peripúberes (30 días) expuestas al DEHP intra útero y post nacimiento. El DEHP fue administrado en el agua de bebida (300 ml/l) a la rata madre desde el primer día de gestación y durante la lactancia; post destete se suministró a las crías hasta 12 hs. antes del sacrificio. Los animales fueron ayunados 12 hs antes del ensayo y pesados, no encontrándose diferencias entre el grupo tratado y control. En el período prepuberal el DEHP produjo un descenso significativo (p < 0.01) en la glucemia en animales de ambos sexos, respecto a los controles (Hembra: 112±2.5 vs 128.58±4.5; Macho: 112.2±2.6 vs 124.2±2.5), sin modificaciones en los niveles de colesterol (HEM-BRA: 157.3±8.8 VS 146.9±2.8; MACHO: 156.3±3.1 vs 149.3±5.5) y triglicéridos (Hembra: 173.4±4.7 vs 193± 3.6; Macho: 212.6±5.9 vs 208.4±12.1). En el estadio peripuberal el DEHP disminuyó (p < 0.01) los triglicéridos (HEM-BRA: 48.9±4.5 vs 84.36±3.5; Macho: 63.6±4.5 vs 82.71±4.2) y aumentó el colesterol en machos (79.65±1.4 vs 61.13± 2.1). No se detectó variación en la glucemia en animales peripúberes de ambos sexos (Hembra: 130±5.7 vs 121.7±2.5; Macho: 121.3± 2.7 vs 111.7±6.8). Los resultados indicarían que la exposición pre y post natal al disruptor endocrino DEHP produce alteraciones metabólicas en ratas inmaduras de ambos sexos. Dichas modificaciones podrían afectar los depósitos grasos y contribuir a alterar los mecanismos neuroendocrinos del desarrollo puberal por efecto del DEHP.

560. (611) RELACION ENTRE ACTIVIDAD DE PMCA INSULAR Y SECRECIÓN DE INSULINA EN RATAS CON INSULINORRESISTENCIA. ALZUGARAY MARIA EUGENIA, GARCÍA MARÍA ELISA, ROSSI JUAN PABLO, GAGLIARDINO JUAN JOSÉ

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA), IQUIFIB. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), F. de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires

Objetivo: determinar el efecto de la insulinorresistencia (IR) inducida por dieta rica en fructosa (DRF) sobre la actividad, transcripción y expresión de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática (PMCA) de islotes pancreáticos. Metodología: alimentamos ratas wistar macho normales de 180 a 200 g durante 21 días con una dieta estándar y agua sola (Control, C) o con el agregado de fructosa al 10% (DRF). Posteriormente las sacrificamos y les extraímos sangre para medir glucemia (G), triglicéridemia (TG) e insulinemia (I). Luego removimos los páncreas para aislar islotes

y medir secreción de insulina en respuesta a la glucosa y la transcripción, expresión y actividad de PMCA. Resultados: el peso corporal y las G fueron similares en ambos grupos, pero las ratas DRF tuvieron niveles más altos de TG (158.9 ± 5.5 vs. 98.5 ± 3.5 mg/dl; $p < 0.0001$), de insulina (1.16 ± 0.07 vs. 0.77 ± 0.05 ng/ml; $p < 0.02$) e índice HOMA (22.1 ± 3.2 vs. 9.7 ± 1.42 ; $p < 0.001$). Los islotes aislados de ratas DRF secretaron más insulina en respuesta a la glucosa en el rango de 8 a 20 mM ($p < 0.02$), pero no a concentraciones menores. La transcripción de PMCA2 insular aumentó en las ratas DRF ($p < 0.05$) mientras que su expresión disminuyó ($p < 0.001$); la PMCA3 aumentó ($p < 0.05$) y no hubo cambios en las isoformas 1 y 4. La actividad de PMCA fue menor en las ratas DRF (1.22 ± 0.09 vs. 1.57 ± 0.11 pmoles Pi/h/ μ g prot; $p < 0.02$). Esta diferencia desapareció en presencia de Calmidazolium (inhibidor de calmodulina-CM). Conclusión: En la IR inducida por DRF disminuye la actividad de la PMCA insular, probablemente por disminución de la expresión de PMCA2 (CM dependiente) y consecuentemente, aumenta la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Esto sugiere que la PMCA participaría en el mecanismo de adaptación insular a la insulinorresistencia.

561. (661) ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DE PKC ALFA, EPSILON Y DELTA EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS INDUCIDAS POR PMA. PETITI JUAN PABLO, DE PAUL ANA LUCIA, GUTIERREZ SILVINA, PALMERI CLAUDIA, TORRES ALICIA INES.

Centro de Microscopía Electrónica. Fac. de Medicina. UNC

La activación de proteína quinasa C (PKC) ha sido implicada en la proliferación de células adenohipofisarias, sin embargo, el rol específico de cada isoforma aun no ha sido dilucidado. Objetivo: establecer la relación entre epsilon y delta y la proliferación, la activación de las isoformas de PKC alfa, de células lactotropas inducida por éster de forbol (PMA), a través de la vía de MAPquinasa (ERK1/2). Cultivos adenohipofisarios de rata se incubaron con PMA (400 nM, 15min y 3h) y con un inhibidor específico de las ERK1/2 (PD 98059 50 y 100 uM, 30min). Se cuantificó la proliferación de lactotropas por doble inmunomarcación para BrdU y PRL. La activación de las isoformas de PKC por PMA se determinó en fracción de membrana y citosólica por western blot. Los niveles de mRNA de las isoformas, fueron estimados por PCR. Análisis estadístico utilizado: ANOVA-Fisher. El PMA por 15min aumentó un 37,3% la proliferación de lactotropas ($p < 0.001$), mientras que el tratamiento prolongado (3h) la disminuyó con respecto a los 15min ($p < 0.001$). El PD98059 revirtió el efecto proliferativo de PMA a los 15min un 41% con 50 uM y 54 % con 100 uM ($p < 0.05$). Luego de la incubación con PMA, las tres isoformas translocaron significativamente ($p < 0.05$) a la fracción de membrana, siendo la PKC epsilon la que mostró el mayor porcentaje de activación (77%). En forma paralela, en las fracciones citosólicas se observó una disminución de la expresión de las PKC alfa, epsilon y delta. La expresión del mRNA de las tres isoformas luego de la estimulación con PMA aumentó significativamente a tiempos cortos, lo cual sería indicativo de una autorregulación en el proceso transcripcional de las PKC. Estos resultados demuestran que la translocación de las PKC alfa, epsilon y delta a la fracción de membrana luego de la estimulación con PMA regula la proliferación de células lactotropas a través de la vía MAP quinasa ERK1/2, destacando la participación de la PKC epsilon en este proceso.

562. (679) EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO PROMUEVE UNA PROLIFERACIÓN DIFERENCIAL DE CÉLULAS LACTOTROPAS PROVENIENTES DE HIPÓFISIS DE RATA HEMBRA Y MACHO. DE PAUL ANA LUCÍA, GUTIÉRREZ SILVINA, PETITI JUAN PABLO, ALVIN GABRIELA, PALMERI CLAUDIA, TORRES ALICIA

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

En cultivos adenohipofisarios de rata hembra demostramos que, en la proliferación de células lactotropas inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), participan PKC ϵ , ERK1/2 y el factor pituitario específico (Pit-1). Debido a la existencia de poblaciones de lactotropas morfológica y funcionalmente diferentes dependientes de estrógeno, nos propusimos investigar la respuesta proliferativa inducida por EGF en cultivos de hipófisis de rata macho estableciendo su comparación con el modelo de hembra anteriormente descripto. Los cultivos se trataron con EGF (25, 50 y 100ng/ml) por 24h sólo o combinado con bisindolymaleimide I (BIM) (5 y 10 μ M), un inhibidor de las PKC. Se evaluó la proliferación celular por doble detección inmunocitoquímica de BrdU y PRL. La expresión de PKC ϵ , ERK1/2-fosforilada (ERK1/2-P), ERKtotal (ERK-T), PRL y Pit-1 fue cuantificada por western blot. Para el análisis estadístico de los datos se aplicó test ANOVA-Tukey. En cultivos primarios de rata macho, EGF duplicó el número de células lactotropas (134% vs control; $p < 0.001$), efecto revertido completamente luego de la aplicación de BIM. A diferencia de estos resultados, EGF incrementó 7 veces la proliferación de células lactotropas provenientes de cultivos de rata hembra. En este modelo experimental, BIM revirtió parcialmente el efecto proliferativo ejercido por EGF (30% con la dosis menor y 50% con la dosis mayor; $p < 0.05$). En ambos modelos de estudio, la expresión de PKC ϵ , ERK1/2-P, Pit-1 y PRL aumentó de manera similar frente a todas las dosis de EGF aplicadas ($p < 0.001$) disminuyendo significativamente por acción de BIM. Los niveles de la ERK-T se mantuvieron invariables frente a EGF sólo o en combinación con BIM. Los diferentes niveles estrogénicos presentes en rata hembra y macho actuarían sensibilizando a las células lactotropas las que manifiestan una respuesta proliferativa diferencial por ERK1/2 y Pit-1 en cultivos primarios, efecto de EGF a través de PKC ϵ .

563. (709) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE LOS RECEPTORES: ESTRÓGENO ALFA, PROLACTINA LARGO Y DOPAMINA CORTO INDUCIDOS POR MIFEPRISTONE, AL FINAL DE LA PREÑEZ. VILLEGAS GABUTTI CARLOS MAURICIO, GONZALEZ DIEGO, DEIS RICARDO, SOAJE MARTA.

IMBECU-CONICET

Al final de la preñez, progesterona inhibe la secreción de PRL. La administración del antiopiode naloxona (NAL) a ratas pretratadas con el antiprogesterona mifepristone (Mp) en el día 19 de preñez, induce un aumento en los niveles séricos de PRL. Se ha demostrado que la administración de Mp disminuye el tono dopaminérgico hipotalámico, activa el lactotropeo y facilita la acción estimuladora de NAL. Objetivo: Determinar si la activación del lactotropeo inducida por Mp y NAL induce cambios en la expresión de los receptores de estrógeno alfa (RE α) y beta (RE β), de PRL largo (RPRL L) y de dopamina corto (R D2 S) y largo (R D2 L) en la adenohipofisis. Materiales y Métodos: En el día 19 de preñez, se administró Mp (5 mg/kg, sc) o aceite a las 8.00 h y NAL (2 mg/kg, ip) o salina (SAL) a las 17.30 h. Por decapitación (18.00 h), se obtuvo sangre troncal para determinar PRL sérica por RIA y la adenohipofisis para extraer el ARN total con TRIzol y establecer la expresión relativa a β -actina del RE α , RE β , RPRL L, R D2 L y R D2 S por RT-PCR semicuantitativa. RESULTADOS: Mp aumentó la expresión del RE α (V+SAL: 0.40 ± 0.02 ; Mp+SAL: 0.60 ± 0.05 ; $p < 0.05$) sin modificar los niveles de RE β , aumentó la expresión del RPRL L (V+SAL: 0.41 ± 0.02 ; Mp+SAL: 0.70 ± 0.05 ; $p < 0.01$) e indujo la expresión del R D2 S. El aumento de PRL inducido por Mp y NAL no modificó la expresión de los diferentes receptores. Conclusiones: La activación del lactotropeo por Mp induce: 1) un aumento en la expresión del RE α que facilita la acción estimuladora de estrógeno, 2) una mayor expresión del RPRL L para que el aumento de PRL sérica inducido por Mp y NAL controle su propia secreción, 3) la expresión del R D2 S posiblemente como consecuencia de la disminución del tono dopaminérgico hipotalámico.

FARMACOLOGÍA II

- 564. (574) FARMACODINAMIA DE 7,8-DIHI-DROXI-4-METILCUMARINA EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS.** RIVEIRO MARÍA EUGENIA (1,2), MOGLIONI ALBERTINA (1), FACORRO GRACIELA (1), PIEHL LIDIA (1), RUBIN DE CELIS EMILIO (1), BALDI ALBERTO (2), SHAYO CARINA (2), DAVIO CARLOS (1).

Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (1); Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET (2)

En búsqueda de compuestos con actividad inductora de apoptosis en células leucémicas humanas, hemos descrito que el compuesto 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina (B2) inhibe la proliferación de la línea leucémica U-937 (IC₅₀=74,33±1,23 μM) debido a la inducción de apoptosis. Con el objetivo de profundizar en el estudio del mecanismo de acción apoptótico, abordamos el estudio de distintas vías de señalización asociadas a este proceso. La activación de la vía de MAPKs fue visualizada en experimentos de western blot utilizando anticuerpos específicos para las proteínas fosforiladas. Los resultados señalan que la vía de ERK no se ve afectada por el tratamiento con B2 250 μM, mientras que la vía de p38 y JNK se regulan a tiempos cortos de tratamiento con la misma concentración. Por otra parte, se observó modulación en los niveles intracelulares de pAkt. Asimismo, se estudió la modulación de los protooncogenes c-myc y c-fos, relacionados con los procesos de proliferación celular de la línea U-937. Luego de 6 h de tratamiento con B2 se observó una disminución en los niveles de c-myc, mientras que los niveles de c-fos no son afectados. Finalmente, empleando la técnica de resonancia paramagnética electrónica, hemos detectado la formación de un radical fenoxilo luego del tratamiento de las células U-937 con B2 250 μM. Por otro lado, B2 también indujo apoptosis en la línea mieloide leucémica HL-60, que se caracteriza por presentar la proteína p53 truncada. Esto indicaría que la inducción de apoptosis es independiente de este vía, característica muy ventajosa, para el desarrollo de fármacos anti-neoplásicos. Estos resultados indican que B2 es capaz de generar un radical libre fenoxilo y de modular las vías de p38, JNK y AKT. Por otra parte la inducción de apoptosis es independiente de p53 señalando que el núcleo cumarínico representaría un prototipo farmacológico para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos en el tratamiento de leucemias.

- 565. (724) PARTICIPACIÓN DE UNA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA EN LA ACTIVACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS ÓSEA POR BISFOSFONATOS.** MORELLI SUSANA (1), SANTILLAN GRACIELA (1, 2), SCODELARO PAOLA (1, 2), LEZCANO VIRGINIA (1), BOLDAN RICARDO (1, 2), ROLDAN EMILIO (3).

Departamento Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur (1); CONICET (2); GADOR S.A. (3)

Los bisfosfonatos (BPs) son analogos sintéticos del pirofosfato inorganico; tienen la capacidad de disminuir la resorcion osea inhibiendo la actividad osteoclastica por lo que son usados en el tratamiento de trastornos oseos tales como osteoporosis y enfermedad de Paget, entre otras. El mecanismo de accion molecular por el cual los BPs inhiben la resorcion osea aun no se ha elucidado completamente. Evidencias recientes sugieren que los osteoblastos tambien serian blanco de accion de BPs. Investigaciones preliminares de nuestro laboratorio en celulas osteoblasticas de osteosarcoma de rata ROS 17/2.8 muestran la presencia de un sitio de ligado especifico para el BP Olpadronato tritiado ([H₃]OPD). Los sustratos de fosfatasa desplazan el ligado de [H₃]OPD, sugiriendo que estas proteinas podrian actuar como receptores de Bps. En este trabajo demostramos que el OPD (1,10 y 100uM) incrementa significativamente la sintesis de DNA en celulas Ros 17/2.8 luego de 48 hs (32%, 44% y 143%) y 72 hr (39%, 128% y 232%) de tratamiento. Un perfil temporal similar se observa con los inhibidores de proteinas tirosinas fosfatasa

NA3VO4 (100 uM) y vpb(bipy) (10 uM), en tanto que el NaF (1mM), un inhibidor general de proteinas fosfatasa exhibe un perfil diferente. El estimulo de la proliferacion de osteoblastos inducida por OPD fue inhibida un 43% por genisteina (2.6 uM) y completamente bloqueada por geldamicina (0.68 uM), dos inhibidores de proteinas tirosinas quinasa. Ademas estos inhibidores bloquearon completamente el efecto de los inhibidores de proteinas tirosinas fosfatasa sobre la proliferacion de osteoblastos. Estos resultados aportan nuevas evidencias que sugieren la existencia de una entidad receptora en osteoblastos, presumiblemente una proteina tirosina fosfatasa que participa en la estimulacion de la proliferacion de osteoblastos por BPs.

- 566. (653) ACCIÓN DE CUMARINAS NATURALES DI Y TRI-OXIGENADAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS.** VAZQUEZ RAMIRO (1), RIVEIRO MARIA EUGENIA (1,2), CROUCH NEIL R (3), ISMAIL FATHIMA (4), COOMBES PHILIP H (4), MULHOLLAND DULCIE A (4,5), SHAYO CARINA C (2), DAVIO CARLOS A (1)

Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA (1), Intituto de Biología y Medicina Experimental - Conicet (2), Ethnobotany Unit, South African National Biodiversity Intitute, Durban, South Africa (3), School of Chemistry, University of Kwazulu-Natal, Durban, South Africa (4), School of Biomedical and Molecular Sciences, University of Surrey, Guildford, Surrey, UK (5)

La utilización concomitante de agentes inductores de diferenciación y drogas inductoras de apoptosis resulta una opción promisoría para el tratamiento de leucemias humanas. Previamente hemos descrito una serie de cumarinas tri-oxigenadas con actividad antiproliferativa y diferenciante sobre la línea promonocítica humana U-937 (1). En el presente trabajo evaluamos dichas actividades en otra serie de cumarinas, di y tri-oxigenadas, obtenidas de *Toddalia asiatica*: 6-[(3,3-dimetiloxiran-2-il)metil]-5,7-dimetoxicumarina (S1); 5,7-dimetoxi-6-(2-metil-2-propileno) oxicumarina (S2); 6,7-dimetoxi-8-(3-metil-2-butenil) cumarina (S3); 6-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-5,7-dimetoxicumarina (S4); 6-(2,3-dihidroxi-3-metilbutil)-5,7-dimetoxicumarina (S5) y 5,7-dimetoxi-6-(3-metil-2-butenil)cumarina (S6). En células U937, determinamos la inhibición de la proliferación por incorporación de [3H]timidina (CI50), la inducción de apoptosis por fragmentación del ADN y tinción nuclear con Hoescht 33342 e Ioduro de Propidio, y la diferenciación monocítica por expresión de CD11B, CD88 y capacidad de reducción de NBT. La cumarina S6 inhibió la proliferación celular (CI50=5,39±4,00 uM). El tratamiento con S6 50 uM indujo la diferenciación parcial de las células U-937, dado que se detectó expresión de CD11b y no de CD88, ni capacidad de reducción de NBT. Concentraciones mayores a 250 uM de S6 indujeron fragmentación del ADN y condensación de la cromatina, colapso nuclear y cuerpos apoptóticos, indicando la inducción de apoptosis. Las restantes cumarinas naturales estructuralmente relacionadas a S6 no fueron capaces de inducir diferenciación o apoptosis en la línea celular U-937. Estos resultados indican que S6, presenta actividad diferenciante e inductora de apoptosis en células U937 dependiendo de la concentración utilizada. Resulta de interés profundizar los estudios de la relación estructura-actividad. (1)Riveiro E y col. Cancer Lett. 210(2):179-88, 2004.

- 567. (564) RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA DE DISTINTAS 4-METIL-CUMARINAS Y LA INDUCCION DE APOPTOSIS EN CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS.** RIVEIRO MARÍA EUGENIA (1,3), MAES DOMINICK (2), MOGLIONI ALBERTINA (1), GOMEZ NATALIA (1), VAZQUEZ RAMIRO (1), DE KIMPE NORBERT (2), SHAYO CARINA (3), DAVIO CARLOS (1).

Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA (1); Department of Organic Chemistry, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Gent University, Gent, Bélgica (2); Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET (3)

La utilización de agentes inductores de apoptosis es una opción promisorio para el tratamiento de leucemias humanas. Previamente hemos descrito que ciertas 6,7- o 7,8- dihidroxicumarinas o compuestos derivados del ácido cinámico eran inductores de apoptosis en células leucémicas humanas. Con el objetivo de describir nuevos fármacos con posible aplicación terapéutica, hemos profundizado los estudios de relación estructura/actividad. Para ello, se ensayaron distintos compuestos sintéticos donde se introdujeron distintos grupos funcionales en ciertas posiciones del sistema cumarínico y se determinó la capacidad de inducir apoptosis en la línea leucémica humana U-937. Se determinó la inhibición de la proliferación por incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina (CI50) y la citotoxicidad por tinción con Azul Tripán (CC50) a las 48 h de tratamiento. La inducción de apoptosis se determinó por fragmentación del ADN y tinción nuclear con Hoescht 33342 e Ioduro de Propidio. Los compuestos ensayados fueron: 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina (B2); 7-hidroxi-4-metilcumarina; 4,7-dimetil-cumarina; 4,8-dimetil-cumarina; 4,6-dimetil-cumarina; 7-metoxi-4-metilcumarina; 7-hidroxi-4-(trifluorometil)-cumarina; 7-amino-4-metilcumarina y Cumarina. Los resultados obtenidos indican que la cumarina B2 es capaz de inducir disminución de la proliferación celular debido a la inducción de apoptosis. En cambio, las restantes cumarinas sintéticas estructuralmente relacionadas a B2 no son capaces de inducir apoptosis en la línea celular U-937. Estos resultados indican que la presencia de grupos oxidrilos libres en posición orto en el núcleo cumarínico es esencial para la inducción de apoptosis (1) Se observa condensación de la cromatina, colapso nuclear y cuerpos apoptóticos.

	CI50	CC50	Fragmentación del ADN (250 microM)	Tinción nuclear (250 microM)
B2	74.33 ± 1.23 microM	125.20 ± 1.47 microM	Positivo	Positivo (1)
Otras cumarinas ensayadas	> 2.00 mM	> 2.50 mM	Negativo	Negativo

568. (477) EL FLAVONOIDE PRENILADO 6PP INHIBE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL E INDUCE CITOTOXICIDAD. ISOLABELLA M. PAULA, ELINGOLD IGAL, CELENTANO ANA MARÍA, PÉREZ CRISTINA, CASANOVA MARTA, CABRERA JOSÉ LUIS, DIEZ ROBERTO A., DUBIN MARTA.

Dpto de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA; CEFYBO UBA-CONICET; Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Los flavonoides tienen efectos inhibitorios sobre las actividades de enzimas como los citocromos P-450 involucrados en la activación de procarcinógenos, y enzimas de la fase 2 comprometidas en la detoxificación de éstos. A partir de la *Dalea elegans*, planta leguminosa argentina, se aisló la flavanona, 2'-4'-dihidroxi-5'-(1''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina (6PP), con dos grupos prenilos que lo distinguen de otros flavonoides. Estudios previos mostraron la eficacia del 6PP contra cepas bacterianas multirresistentes intrahospitalarias. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la toxicidad de este flavonoide. La velocidad de respiración se midió polarográficamente en una suspensión de mitocondrias, aisladas de hígado de rata. La adición del 6PP estimuló el consumo de oxígeno en estado 4 e inhibió en estado 3 a 50 y 100 μM , $p < 0,01$, en presencia de malato-glutamato como sustrato respiratorio. Como consecuencia disminuyó el índice de control respiratorio (ICR) a partir de 12,5 μM , $p < 0,01$. Con succinato como sustrato, el flavonoide inhibió el consumo de oxígeno en estado 4 a 100 μM , $p < 0,01$. En estado 3 inhibió a partir de 12,5 μM , $p < 0,01$. El ICR disminuyó a partir de 12,5 μM , $p < 0,01$. En mitocondrias acopladas la actividad ATPasa disminuyó 37,2% a 50 μM , $p < 0,01$ y 51% a 100 μM , $p < 0,01$; en partículas submitocondriales disminuyó un 46% a 100 μM , $p < 0,01$. Se midió

acción citotóxica del 6PP por reducción de MTT en células HEP-2. El ensayo se realizó en presencia y ausencia de albúmina 0,5%. Luego de la incubación con 6PP durante 24 hs sin albúmina, se observó una disminución del 60% de la viabilidad celular a concentraciones superiores a 10 μM , $p < 0,01$. En el ensayo con albúmina hubo disminución significativa entre 200 y 400 μM , $p < 0,01$. Los resultados obtenidos sugieren un efecto inhibitorio de la cadena de transporte de electrones y/o un efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa. Se postula la mitocondria como blanco de la citotoxicidad del 6PP.

GASTROENTEROLOGÍA II

569. (82) DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL HELICOBACTER PYLORI EN PACIENTES CON ARDOR, HALITOSIS E HIPERPLASIA PAPILAR LINGUAL. DENNINGHOFF VALERIA (1), ADLER ISABEL (2), MUIÑO ANDREA (2), AVAGNINA ALEJANDRA (1), ELSNER BORIS (1).

Servicio de Patología. CEMIC (1), Servicio de Estomatología. UBA (2)

El *Helicobacter pylori* (HP) es una bacteria curva microaerofila Gram-negativa. Fue descrita en 1983 por Marshall y Warren, su importancia en gastroenterología es significativa. La Organización Mundial de la Salud la definió carcinógeno tipo I dada su asociación con el adenocarcinoma gástrico. El objetivo de este estudio es detectar infección por HP en la cavidad oral de pacientes con ardor, halitosis e hiperplasia papilar lingual (AHH) mediante serología, histopatología y biología molecular. Se estudiaron 66 individuos con AHH que concurren al Servicio de Estomatología. Las edades estaban comprendidas entre 21 y 84 años, con una media de 53,24. El 79% correspondía al sexo femenino. La presencia del HP fue evaluada mediante serología, histopatología (hematoxilina-eosina, Giemsa) y biología molecular. Se consideraron como infectado por HP, a los pacientes con 2 test positivos. Fueron considerados pacientes no infectados, aquellos que presentaban 2 test negativos. De los 47 pacientes con serología positiva para HP, 43 fueron verdaderos positivos. De los 35 pacientes positivos con histología, 34 fueron verdaderos positivos. Con biología molecular resultaron ser verdaderos positivos 53 de 54 pacientes. Verdaderos negativos fueron 5 pacientes. Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron respectivamente: 75,44%, 55,56%, 91,49% y 26,32% para serología, 56,67%, 83,33%, 97,14% y 16,13% para histopatología y 88,33%, 83,33%, 98,15% y 41,67% para biología molecular. En conclusión, el algoritmo diagnóstico para la detección del HP en la cavidad oral es: 1) identificación de la patología oral, 2) screening serológico, 3) estudio histopatológico de la biopsia del área afectada y 4) estudio molecular.

570. (240) AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS OVALES EN HÍGADO FETAL DE RATA. TORRES FUENZALIDA JOSE HUGO (1), PARADA LUIS ANTONIO (2), BARBICH MARIANA (1), LORENTI ALICIA (1)

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires (1); Cell Biology & Stem Cells Unit, Cic Biogune, Derio, España (2)

Introducción: El hígado posee una notable capacidad regenerativa. La regeneración hepática luego de daños leves/moderados es producida por hepatocitos maduros y no depende de células troncales. Cuando el daño es masivo la regeneración depende de la activación de células troncales hepáticas, que originan las células ovas (clonogénicas y bipotenciales). Las células ovas presentarían ventajas sobre los hepatocitos maduros para uso terapéutico en enfermedades degenerativas hepáticas. Objetivo: Optimizar estrategias de aislamiento y cultivo de células para seleccionar, expandir y purificar células ovas para su posterior caracterización citológica y molecular. Materiales y mé-

todos: Hígados extraídos de fetos de ratas (19 dpc) son digeridos con Colagenasa. Se separan las poblaciones celulares por centrifugación (Percoll 50% y 60%). Se cultiva en medio con/sin factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y con/sin 20% de suero fetal bovino. Resultados: gradiente de Percoll: en el cultivo de la fracción hepática se observaron células positivas para los marcadores de células ovas (OC2/OC3). En la misma fracción, en presencia de HGF, se observó, además de dichas células, un incremento en la cantidad de células con morfología semejante, pero negativas para esos marcadores. En el cultivo sin suero, de las células recién aisladas se observó: a.- 24hs: células OC2+/Thy-1-; b.-24hs con HGF: células OC2+/Thy-1+ y OC2+/Thy-1-; c.-5 días: células OC2+/Thy-1+; d.-5 días con HGF: células OC2+/Thy-1- y OC2+/Thy-1+. Conclusión: El procedimiento desarrollado permitió aislar células tipo ovas en condiciones fisiológicas. La centrifugación en gradiente de Percoll y posterior cultivo con HGF de la fracción hepática produjo un incremento de células que morfológicamente pertenecen al compartimiento de células ovas. El cultivo en medio libre de suero permitió obtener una población más purificada de células ovas, aunque con menos células totales

571. (526) EXCRECIÓN RENAL E INTESTINAL DEL GLUCURÓNICO DE PARACETAMOL (GLU-P) EN RATAS CON LIGADURA DE COLÉDOCO (LC). VILLANUEVA SILVINA STELLA MARIS, RUIZ MARIA LAURA, LUQUITA MARCELO GABRIEL, GHANEM CAROLINA INES, CATANIA VIVIANA ALICIA, MOTTINO ALDO DOMINGO

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET); Cátedra de Fisiopatología. Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA

El hígado tiene un papel esencial en la eliminación de compuestos conjugados con ácido glucurónico mediada por la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (Mrp2). En la colestasis extrahepática la función secretora biliar está anulada y se desconoce si tejidos extrahepáticos pueden actuar compensatoriamente. Se evaluó el efecto de LC sobre la síntesis y excreción urinaria e intestinal del principal metabolito de paracetamol (P), el glu-P, en ratas Wistar machos, 7 días pos-LC, y en las correspondientes Sham (S). La excreción de glu-P fue evaluada in vivo administrando 150 mg de P/kg i.v. y posterior detección de glu-P por HPLC en orina obtenida de sonda vesical y en secreción intestinal obtenida por perfusión del yeyuno. La excreción acumulativa de glu-P (nmoles/150 min/g tejido) en perfusato intestinal no varió entre LC y S, mientras que la excreción renal aumentó en LC (1142 ± 60) respecto de S (454 ± 87), ($p < 0.05$, $n=3$). La concentración plasmática de glu-P (μM), determinada a los 5 min pos-administración de P, aumentó en el grupo LC respecto de S (543 ± 195 vs. 210 ± 73, respectivamente). Sin embargo, la síntesis global de glu-P in vivo no se modificó por LC, lo que fue confirmado por la ausencia de cambio en actividad y expresión de UDP-glucuronosiltransferasa en hígado, corteza renal y yeyuno. La administración de una dosis tóxica de P de 1g/kg a ambos grupos mostró menor daño hepático en LC, evaluado a las 24 hs por medición de ASAT, ALAT, bilirrubinemia y sobrevida. Considerando que la expresión del transportador apical Mrp2 aumenta en corteza renal y disminuye en hígado y yeyuno en LC, nuestros hallazgos sugieren un importante papel de la secreción tubular renal en la eliminación de glu-P ante la falla secretora hepática. La anulación de la recirculación enterohepática del glu-P en LC y la mayor eficiencia de excreción renal podrían llevar a menor permanencia de P en el organismo, explicando su menor toxicidad.

572. (537) LAS VIAS PLC/IP3/CA2+ Y PLC/DAG/PKC MEDIAN LOS EFECTOS DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C SOBRE LA LIBERACIÓN DE AMILASA EN ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS. SABBATINI MARIA EUGENIA, DI CARLO MARIA BEATRIZ, YAPUR VIVIANA, VATTA MARCELO S., BIANCIOTTI LILIANA G.

Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA; Departamento de Bioquímica Clínica, FFyB, UBA -IQUIMEFA-CONICET, FFyB, UBA

En trabajos anteriores demostramos que el péptido natriurético tipo C (CNP) estimula la liberación de amilasa a través de la activación del receptor NPR-C en acinos pancreático aislados. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las vías de señalización acopladas a este receptor que median la respuesta del CNP. Se incubaron acinos pancreáticos aislados en distintas condiciones experimentales y se midió la liberación de amilasa. Los resultados se expresaron como liberación fraccional de amilasa (%) y corresponden a la media ± SEM; *; $p < 0.05$ vs. Control (C) La liberación de amilasa estimulada por CNP se anuló en presencia de U73122 (U) y GF109203X (GF), inhibidores de PLC y PKC, respectivamente (C: 4.5±0.2%; CNP 1pM: 10.3±0.5%; U: 4.9±0.5%; U + CNP: 5.6±0.6%; GF: 4.5±0.5%; GF + CNP: 5.9±0.7%) mientras que no se modificó en presencia de H-89 y KT5823 (KT), inhibidores de PKA y PKG, respectivamente (H-89: 4.1±0.4%; H-89 + CNP: 12.8±1.3%; KT: 4.8±0.6%; KT + CNP: 17.6±1.8%). El tratamiento de los acinos pancreáticos con EGTA, quelante de Ca²⁺, inhibió el efecto estimulatorio del CNP (EGTA:1.9±0.1%; EGTA + CNP: 2.4±0.3%). En presencia de tapsigargina (TG), bloqueante específico de la bomba ATPasa Ca²⁺-dependiente ubicada en el retículo endoplásmico, se observó un incremento de la liberación de amilasa, sin embargo no modificó la respuesta del CNP (TG: 7.7±0.3%; TG + CNP: 8.2±1.0%). Estos resultados indican que las vías PLC/DAG/PKC y PLC/IP3/Ca²⁺ acopladas al receptor NPR-C median la liberación de amilasa estimulada por CNP en acinos pancreáticos aislados.

573. (693) TNF-ALFA ACTIVA EL SISTEMA ENCANNABINOIDE EN LA GLÁNDULA SUBMAXILAR DE RATA. PRESTIFILIPPO JUAN PABLO, FERNADEZ-SOLARI JAVIER, RETTORI VALERIA, ELVERDIN JUAN CARLOS

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET); Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires

Los dos tipos de receptores específicos para cannabinoides (CB), CB 1 y 2, han sido descritos en la glándula submaxilar (GSM). Ambos se encuentran acoplados a una proteína Gi que inhibe la actividad de adenilato ciclasa. Por otra parte, es bien conocido que durante la endotoxemia inducida mediante la administración de lipopolisacárido (LPS), el TNF-alfa en plasma se ve incrementado y la secreción salival disminuida. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de TNF-alfa en la GSM y la interacción del mismo con los CB. Los resultados se expresan como la media y SEM, analizados por ANOVA, considerándose significativo * $p < 0.05$. Materiales y Métodos: se determinó; 1)TNF-alfa (Elisa) en GSM de ratas Wistar macho adultas (300gr, $n=6-8$), extraídas a tiempo 0, 30, 60, 180 min post-inyección de LPS (5mg/kg) intraperitoneal (ip) luego de la incubación en un medio Krebs-Ringer, 2) el contenido de AMPc (RIA) en GSM incubadas en Krebs Ringer, en los siguientes grupos experimentales: Forkolina (FRSK80uM); FRSK+TNF-alfa (3.10⁻⁹M); FRSK+TNF-alfa +AM251(10⁻⁵M) antagonista de CB1; AM251; FRSK+TNF-alfa+AM630(10⁻⁵M) antagonista de CB2; AM630; FRSK+TNF-alfa+AM251+AM630; AM251+AM630. Resultados: Los estudios demostraron que solo a partir de los 180 min los niveles de TNF-alfa se incrementan en la GSM (52.9±12.0** pg/mg prot). El TNF-alfa fue capaz de disminuir el contenido de AMPc estimulado por FRSK (FRSK 5.4±0.8vs FRSK+ TNF-alfa 2.9±0.4** pmol/mg prot); AM251 fue capaz de prevenir este efecto (TNF-alfa 2.9±0.4vs TNF-alfa+AM251 4.6±0.7* pmol/mg prot) pero no así el AM630. Conclusiones: Los presentes resultados demostraron que la producción de TNF-alfa en la GSM alcanzó niveles significativos a los 180 min y que el TNF-alfa activa el receptor CB1. Este sería el mecanismo responsable de la inhibición de las respuestas secretoras durante la endotoxemia inducida por LPS (BID 1728 OC-AR PICT 14264-03, UBA-OD25).

INMUNOLOGÍA X

- 574. (501) LA INFECCIÓN CON TOXOPLASMA GONDII BLOQUEA EL DESARROLLO DE INFLAMACIONES ALÉRGICAS PULMONARES INDUCIENDO UN DESVÍO HACIA UNA RESPUESTA DE TIPO TH1.** FENOY IGNACIO(1), BATALLA ESTELA(1), BARBIER DANIEL(1), MARTIN VALENTINA(1), PIAZZON ISABEL(2), GOLDMAN ALEJANDRA(1).

Escuela de Ciencia y Tecnología-Universidad Nacional de Gral. San Martín (1); ILEX-CONICET-IIHEMA-Academia Nac. de Medicina (2)

Datos epidemiológicos muestran que la incidencia de alergias respiratorias es menos frecuente en personas expuestas a *Toxoplasma gondii* y al virus de la hepatitis A. Habíamos demostrado que la sensibilización con ovalbúmina (OVA) de ratones BALB/c durante la etapa aguda de la infección con *T. gondii* y posterior desafío por vía aérea, a diferencia de ratones no infectados, no induce el desarrollo de una inflamación alérgica pulmonar (eosinófilos en lavado broncoalveolar, infiltración pulmonar perivascular y bronquiolar, IgE e IgG1 OVA específicas). Hipotetizamos que los resultados obtenidos son consecuencia de un desvío hacia una respuesta de tipo Th1. En el presente trabajo, extendimos nuestro estudio analizando los niveles séricos de anticuerpos IgG2a específicos para OVA y la producción de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) y Th1 (INFg) en el sobrenadante de cultivo de células de ganglios torácicos y pulmón estimuladas con OVA o ConA. Los cultivos se realizaron 48hs luego del desafío con OVA por vía aérea (26 días luego de la infección). La tabla muestra los resultados de la estimulación con OVA. X±ES (n>.5). *p<.0,05 vs. grupo sensibilizado con OVA. El aumento de los niveles de IgG2a y de INFγ en los ratones infectados con *T. gondii* y sensibilizados con OVA sugiere que la infección con el parásito bloquea el desarrollo de una inflamación alérgica pulmonar induciendo un desvío hacia una respuesta de tipo Th1.

Grupos	IL-4 (pg/ml) pulmón	IL-5 (pg/ml) pulmón	INFg (pg/ml) pulmón	IgG2a (título)
OVA	983 ± 271	2581 ± 848	34 ± 24	8000 ± 1600
Toxo/OVA	62 ± 40*	265 ± 164*	664 ± 149*	206100 ± 50251*
Toxo	<15	<15	<15	no detect
Sham	<15	<15	<15	no detect

- 575. (535) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD1, PD-L1 Y PD-L2 EN CÉLULAS PERITONEALES Y DE BAZO DURANTE LA INFECCIÓN CON T. CRUZI EN RATONES. IMPLICANCIAS EN EL CURSO DE LA INFECCIÓN.** DULGERIAN LAURA, STEMPIN CINTHIA, GARRIDO VANINA, CERBAN FABIO

CIBICI-CONICET-UNC

La activación de célula T puede ser regulada por distintas interacciones con la CPA. B7.1 y B7.2 pueden interaccionar con CTLA-4 que envía una señal inhibitoria de la activación de la célula T. Otros receptores con capacidad inhibitoria son PD-1 y sus ligandos PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC), aunque también se los ha mencionado como estimulantes. Durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, los ratones presentan respuestas proliferativas suprimidas hacia Ags parasitarios como a mitógenos. La participación de CTLA-4 en la infección con *T. cruzi* ya fue estudiada, pero no se conoce cuál es el rol de la vía PD-1. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar rol de la vía PD-1 en un modelo de infección con *T. cruzi*. Para ello, se infectaron i.p. ratones BALB/c con 500 parásitos y se estudió la expresión por citometría de flujo de PD-1, PD-L1 o PD-L2 en células CD3+, B220+, CD11c+ o F4/80+ peritoneales y de bazo a los 4, 6, 13 y 19 días post-infección. Se observó una disminución de las células F4/80+ y un aumento de las células CD3+ en el peritoneo con el curso de la infección. En las células peritoneales F4/80+ se

observó un aumento de la expresión de PD-L1 y PD-L2, en cambio en las células CD3+ se detectó una disminución de la expresión de PD-1. En las células CD11c+ se observó un aumento de PD-L2 con el curso de la infección. Además, cuando se trataron ex vivo las células de bazo con Acs bloqueantes contra PD-1, PD-L1 o PD-L2 se observó por inmunofluorescencia un aumento de amastigotes intracelulares en las células tratadas con Acs anti PD-L2. Estos resultados sugerirían que la interacción de PD-1 con sus ligandos PD-L1 y/o PD-L2 podría tener implicancias en el curso de la infección con *T. cruzi* en ratones.

- 576. (654) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE FOXP3 Y LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA DE CÉLULAS CD4+CD25+ EN LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO.** BURZYN DALIA, CABRERA GABRIEL, MUNDIÑANO JULIANA, LORENZO DANIELA, NEPOMNASCHY IRENE, PIAZZON ISABEL.

ILEX-CONICET. División Medicina Experimental-Instituto de Investigaciones Hematológicas-Academia Nacional de Medicina

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es transmitido durante la lactancia y utiliza al sistema inmune para establecer la infección. Previamente habíamos determinado que durante la primera semana de infección en ratones neonatos se produce un aumento de células CD4+CD25+ en el sitio de entrada del MMTV, las placas de Peyer (PPs). En este trabajo hemos investigado por citometría de flujo la expresión de Foxp3 en dichas células, y determinamos que existen 2 subpoblaciones. La población CD4+CD25+Foxp3+ (fenotipo regulatorio) aumenta progresivamente en porcentaje y número absoluto durante la primera semana de infección en las PPs de los animales infectados (A) con respecto a los no infectados (B). P.ej., día 2: A: 3,7±0,4; B: 0,76±0,05; p< 0,005. Día 6: A: 8,0±0,4; B: 1,3±0,6; p< 0,005 (media del número de células/PP x 10-3 ± DS, n=4). En cambio, el porcentaje y el número absoluto de las células CD4+CD25+Foxp3- (fenotipo activado) alcanzan un máximo al día 2 de infección y bajan a partir del día 3. P.ej.: día 2: A: 4,0±0,9; B: 0,34±0,03; p< 0,005. Día 6: A: 1,25±0,13; B: 0,40±0,05; p< 0,01. Considerando que al día 6 la mayoría (84%) de las células CD4+CD25+ son Foxp3+ analizamos en cultivos mixtos linfocitarios la capacidad supresora de las células CD4+CD25+ purificadas de las PPs al día 6 de infección. Determinamos que las células en estudio poseen capacidad inhibitoria de la proliferación y que esta capacidad es mayor a la observada en células CD4+CD25+ de animales no infectados (Porcentajes de inhibición de la proliferación: A: 31,2±2,3; B: 23,1±2,9; p< 0,05 (media ± DS, n=3). En conjunto, estos resultados sugieren que la infección con MMTV induce un aumento temprano de células CD4+ activadas y de células CD4+ con fenotipo regulatorio. Mientras que el número de células activadas desciende a partir del día 3, el número de células regulatorias aumenta progresivamente, sugiriendo que estas últimas podrían influenciar el desarrollo y el resultado de la infección.

- 577. (696) MECANISMOS PATOGENICOS EN CANDIDIASIS CEREBRAL. PARTICIPACIÓN DE LA ASTROGLÍA.** FIGUEREDO CARLOS MAURICIO, RENNA MARIA SOL, CEJAS HUGO, SOTOMAYOR CLAUDIA ELENA

Inmunología. Dto Bioquímica Clínica. CIBICI (CONICET). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba Catedra de Patología. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Misericordia. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

La candidiasis cerebral es frecuente y de elevada mortalidad en individuos con inmunodepresión severa. Nuestro objetivo fue evaluar los mecanismos patogénicos durante la infección cerebral provocada por la diseminación hematogena del hongo, con particular interés en células de la astrogliá. Luego de la inoculación i.v de ratas Wistar con *C. albicans* viables(2x10⁷), el deterioro en el peso corporal fue progresivo y las UFC aumentaron gradual-

mente en cerebro y riñón hacia el día 3 ($p < 0,05$). En cortes de cerebro (d3) se visualizaron ambos morfotipos fúngicos (Azul de Toluidina) asociados a un típico infiltrado inflamatorio y activación de células de la glia (HE y AT). La inmunotinción específica de astrocitos (As) (Anti-GFAP FITC) reveló intensa activación de los mismos en la proximidad de los focos inflamatorios. Se observó un complejo patrón de expresión de los transcritos de IL-6 e IL-10 (RT-PCR), citoquinas claves en la modulación de la astrogliosis y un desequilibrio en la expresión de la iNOS (WB). El rol de los As como célula inmunocompetente esta siendo evaluada en patologías del SNC, por ello se desarrolló un modelo in vitro para evaluar la interacción As/C. albicans. Células del astroglioma de rata C6 se co-cultivaron con C. albicans (relación E:B 5:1) o con LPS, TNF α INF γ o sus combinaciones. A fin de aportar evidencia sobre el controversial papel de los As como CPA (Cel. Pres. Ag) efectuamos estudios fenotípicos evaluando la expresión de MHC clase II y B7.1 (FACS); observando que mientras el estímulo INF γ +LPS fue el óptimo para elevar MHC clase II, TNF α +LPS lo fue para B7.1. El hongo perse fue incapaz de modular la expresión de ambas moléculas. Los niveles de nitrito fueron máximos luego del tratamiento con TNF α +LPS (índice $4,31 \pm 0,31$ $p < 0,01$), mientras que C. albicans indujo un moderado aumento ($p < 0,05$). Estos estudios evidencian la competencia inmunológica de los As y siguen un rol activo para esta células en la candidiasis cerebral.

578. (717) INMUNIDAD INNATA Y LESIONES HEPÁTICAS EN RATONES SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI. CARRERA SILVA EUGENIO ANTONIO, CANO ROXANA CAROLINA, GUIÑAZU NATALIA, PELLEGRINI ANDREA, AOKI MARIA PILAR, GEA SUSANA

CIBICI-CONICET

Los receptores tipo toll tienen un rol crítico en la defensa contra patógenos y posiblemente en el daño tisular. Previamente reportamos que si bien los ratones C57BL/6 (B6) controlan mejor la parasitemia respecto a los BALB/c, presentan mayor mortalidad y graves lesiones tisulares en la infección aguda. También observamos un aumento del mRNA para TLR2 en esplenocitos de B6 a los 24 días posinfección (dpi). En este trabajo analizamos comparativamente, en B6 y BALB/c infectados y sin infectar, la actividad de las transaminasas, las citoquinas, el fenotipo de esplenocitos y leucocitos hepáticos además de la expresión de mRNA para TLR2 y TLR4 en hígado. Encontramos que tanto GOT como GPT están aumentadas en ambas cepas de ratones, infectados vs sin infectar. Sin embargo, los niveles fueron significativamente mayores en B6 comparados con BALB/c, (185 ± 36 vs 98 ± 20 ; 74 ± 25 vs $31 \pm 12,8$; U/l) a los 14dpi. El perfil de citoquinas pro- y anti-inflamatorias evaluadas por ELISA fue mas balanceado en BALB/c que en B6. Esta última cepa produjo niveles mayores de IFN γ , TNF α , IL12, IL6 e IL10. En ambas cepas de ratones infectados se observó una disminución en el porcentaje de esplenocitos CD3+, CD4+ y F4/80+ a los 21dpi y un aumento de Gr1+ y CD11c+ a los 14 y 21dpi respecto a los no infectados. Sin embargo, en los leucocitos hepáticos de ambas cepas hubo un incremento marcado en el porcentaje de las poblaciones mencionadas a los 14 y 21 dpi, mientras que la población CD49b+ (NK) estuvo aumentada hasta los 21dpi sólo en B6. El mRNA para TLR2 (21dpi) y TLR4 (21/24dpi), de infectados vs sin infectar, estuvo francamente disminuido en el tejido hepático de B6, mientras que se observó un aumento en la cepa BALB/c. El daño hepático y la muerte de los animales B6 podrían estar vinculados con señales tempranas durante la infección donde las células del sistema inmune innato, el balance de citoquinas y los receptores TLR tendrían un rol crítico.

579. (288) FUNCIÓN DE LINFOCITOS T CD31+ Y CD31- DURANTE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL IFN-GAMMA EN LA TUBERCULOSIS HUMANA. JURADO JAVIER (1), QUIROGA MARIA FLORENCIA (1), PASQUINELLI VIRGINIA (1), ALVAREZ IVANA BELEN (1), GOMEZ SONIA (1),

ABBATE EDUARDO (2), CIALLELA LORENA (2), CHULUYAN EDUARDO (1), VERONICA GARCIA (1)

Departamento de Microbiología - Facultad de Medicina - UBA (1); Servicio de Tisiopneumología, Hospital F Muñiz (2)

CD31 se expresa en varias células incluyendo una subpoblación de linfocitos T (LT). Previamente describimos que CD31 se asociaba a la proteína de unión a SLAM (SAP, inhibidor del IFN- α en tuberculosis) en pacientes con tuberculosis a cortos tiempos de estimulación antígeno-específica y regulaba negativamente la producción de IFN- γ contra Mycobacterium tuberculosis. Investigamos las sub-poblaciones de LT CD31 durante la respuesta inmune contra el patógeno. Analizando por Western blot la expresión basal de SAP en células de dadores sanos observamos altos niveles de SAP en células CD31+ y una menor expresión en CD31-. M. tuberculosis indujo alta secreción de IFN- γ ($p < 0,001$) sólo por LT CD31-. En células de pacientes con tuberculosis altos respondedores (AR, alta inmunidad celular), M. tuberculosis indujo mayoría de células productoras de IFN- γ CD31- y los LT CD31+ totales disminuyeron un 50% (citometría de flujo). En bajos respondedores (BR, débil inmunidad al patógeno) el antígeno incrementó 100% los LT CD31+ y no se detectaron LT IFN- γ +. Previamente demostramos que la mayoría de las células productoras de IFN- γ expresaban SLAM en AR post-estimulación antigénica, pero los BR expresaban menos del 5%. Nuestros datos actuales indicaron que la mayoría de los LT productores de IFN- γ contra M. tuberculosis eran CD31- en AR y que tanto los LT IFN- γ +CD31- como los. Más aún, más del+IFN- γ +SLAM+ representaban el 80% del total de células IFN- α 80% del total de linfocitos CD31- expresaron SLAM en AR, pero menos del 20% de LT SLAM+ se detectaron en células CD31- de BR. Conjuntamente demostramos que en AR la población T CD31- con expresión disminuida de SAP son las células productoras de IFN- γ . Contrariamente, la exposición de LT de BR al antígeno incrementa la población CD31+, aumenta SAP y no se produce IFN- γ . Así, durante la respuesta inmune contra M. tuberculosis, los LT CD31-SLAM+ son los linfocitos que participan en la secreción de IFN- γ contra el patógeno.

580. (158) ACCIÓN DEL HAART SOBRE LAS SUBPOBLACIONES DE TCD4 EN NIÑOS HIV(+) VÍRGENES DE TRATAMIENTO. BALBARYSKI JEANETTE, BARBONI GRACIELA, CANTISANO CLAUDIO, CANDI MARCELA, QUIROZ HECTOR, GADDI EDUARDO, GIRAUDI VERA

Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

La marcada disminución de los TCD4 durante la infección por HIV es el resultado no sólo de la acción citopática del virus sino también del reemplazo deficiente por nuevas células naive o de memoria. Durante el tratamiento de alta eficacia (HAART) se observa la rápida disminución de la carga viral mientras que la recuperación cuantitativa en los TCD4 y subpoblaciones se alcanza en forma más tardía. Los TCD4 naive (N), memoria central (MC) y efectora (ME) fueron evaluados en 29 niños HIV(+) vírgenes de tratamiento y luego de 8 meses, en promedio, del inicio del HAART, 16 pertenecientes al estadio inmunológico (2) (CD4: 15-25%) y 13 al estadio (3) (CD4 < 15%). Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti CD45, CD45RA, CD14, CD62L y CD4. Los mismos marcadores se estudiaron en 20 niños sanos HIV(-) (Co). Previo al HAART se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en los porcentajes de CD4 N RA+62L+entre el grupo (3): $30,1 \pm 22,8$, el grupo (2): $52,2 \pm 18,2$ y el Co: $59,4 \pm 7,44$. Los CD4 MC RA-62L+ en el estadio (3) se encontraron aumentados significativamente ($P < 0,05$) con respecto al (2) y Co ((3): $57,2 \pm 20,8$; (2): $34,2 \pm 13,7$; Co: $25,2 \pm 7,8$). Luego del HAART, si bien los 13 pacientes del grupo (3) aumentaron sus CD4, las N aumentaron en 8 de ellos (Npre: $15,3 \pm 12,0$, Npost: $34,2 \pm 17,9$, $P < 0,05$) mientras que 5 las disminuyeron (Npre: $53,6 \pm 13,8$, Npost: $40,0 \pm 16,1$, P: NS). En ambos grupos de pacientes las células de MC tuvieron un comportamiento opuesto (MCpre: $69,3 \pm 13,7$, MCpost: $48,2 \pm 17,9$, $P < 0,05$, y MCpre: $37,8 \pm 14,0$, MCpost: $47,6 \pm 12,7$, P: NS, respectivamente). El aumento de células N y el descenso

de células de MC observado en el 60% de los pacientes en el estadio inmunológico más comprometido sería reflejo de la acción del HAART en el parcial reestablecimiento de la dinámica celular T normal.

581. (588) ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INNATA DESENCADENADA POR FLAGELINA EN LA MUCOSA INTESTINAL. HIRIART YANINA, RUMBO MARTIN

LISIN Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

La flagelina es el monómero constituyente del flagelo bacteriano y es reconocida por TLR5 desencadenando la expresión de genes proinflamatorios en células de epitelios mucosales y células mieloides. El objetivo del presente trabajo fue analizar la respuesta de la mucosa intestinal frente a flagelina administrada por distintas vías, dadas las controversias existentes sobre su capacidad activadora desde el compartimento luminal. Se purificó flagelina de *Salmonella enterica*. Se emplearon cepas de ratones BALB/c y C3H/HeJ a los que se les administró flagelina en forma intragástrica (IG, 100 µg/ratón), intrarectal (IR, 100 µg/ratón) o intraperitoneal (IP, 10 µg/ratón). A 2hs del tratamiento con flagelina se analizó la expresión de CCL20, CXCL2 y CXCL10 por RT-PCR en tiempo real en intestino o en fracciones enriquecidas por separación del epitelio. Se cuantificó la expresión de marcadores enterocitarios (LI-cadherina, villina y pIgR) como control del enriquecimiento. La administración IP de flagelina generó un aumento ($p < 0.001$) de la expresión de las quimoquinas analizadas de entre 60 y 300 veces, tanto en duodeno como en colon, dependiendo de la cepa de ratones y del gen analizado. La cepa C3H/HeJ presentó en todos los casos mayores aumentos que la cepa BALB/c ($p < 0.01$). Los tratamientos IG e IR tuvieron escaso impacto en la expresión de quimoquinas. Los niveles de expresión de CCL20 correlacionaron con los marcadores epiteliales pero su producción en colon no fue aumentada luego de la administración intraperitoneal con flagelina, en contraste con las otras quimoquinas analizadas. La mucosa intestinal resultó poco susceptible a la activación por flagelina intraluminal, presumiblemente debido a la polarización en la expresión de TLR5. Si bien se vio una correlación de la respuesta de quimoquinas con los marcadores epiteliales, no se puede descartar el aporte indirecto de otros tipos celulares no epiteliales a la activación observada.

NEUROCIENCIAS IV Y VISIÓN Y OFTALMOLOGÍA I

582 (248) EL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL REVIERTE LAS ANORMALIDADES DEL HIPOCAMPO EN DOS MODELOS DE HIPERTENSION ARTERIAL (HA). PIETRANERA LUCIANA, SARAVIA FLAVIA, ROIG PAULINA, LIMA ANALIA, ALEJANDRO F. DE NICOLA.

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

La HA se acompaña de alteraciones neuropatológicas que afectan al hipocampo, como describimos anteriormente en ratas DOCA-SAL y espontáneamente hipertensas (SHR). Estas anomalías consisten en: disminución de la proliferación celular en el giro dentado (GD), astrocitosis y disminución de la densidad neuronal en el hilio del GD. Nuestro objetivo en este trabajo fue investigar, en ambos modelos, si estas alteraciones pueden ser revertidas por un potente agente neuroprotector: el estradiol. Utilizamos ratas macho SHR de 16 semanas de vida (PA:190 mm Hg) y controles normotensos WKY; y ratas macho Spague-Dawley que reciben 10 mg DOCA día por medio durante 4 semanas y CINA 1% como bebida (DOCA-SAL, PA:160 mm Hg), y controles que reciben inyecciones de vehículo (CTL-SAL). La mitad de los animales en cada modelo recibieron un pellet de 14 mg de benzoato de estradiol. En los cerebros de estos animales se estudiaron: a) la proliferación celular en el GD medida por incorporación de BrdU o expresión de Ki67; b) la reactividad astrocitaria GFAP positiva; c) la densidad neuronal en el hilio del GD. En ambos modelos el estradiol fue capaz de: l) revertir la disminu-

ción en la proliferación celular en el GD (WKY:826.35±32.28, SHR:467.25±44.67, SHR+E2:801.5±77.76 células BrdU+, $p < 0.01$; CTL-SAL: 6155.8±842.6, DOCA-SAL: 3122±411.3; DOCA-SAL+E2: 5173±216.4 células Ki67+, $p < 0.05$), II) normalizar la astrocitosis (WKY: 62.1±9.1, SHR: 127.6±17.3, SHR+E2: 91.9±4.1, $p < 0.01$; CTL-SAL: 173±14.6, DOCA-SAL: 357.5±14.6, DOCA-SAL+E2: 259.1±29.9, $p < 0.01$; astrocitos GFAP+ en CA1), III) revertir la disminución en la densidad neuronal en el hilio del GD (WKY: 5313.8±252.5, SHR:3555.7±137.1, SHR+E2: 6126.3±223.5, $p < 0.001$; CTL-SAL: 5696.3±181.2, DOCA-SAL:4378±215.5, DOCA-SAL+E2: 6148.3±365.5, $p < 0.01$; neuronas/mm³). Estos resultados sugieren que las alteraciones gliales y neuronales observadas en la hipertensión serían eventos plásticos, susceptibles de normalización por tratamiento con un esteroide neuroprotector como el estradiol.

583. (284) EFECTOS NEUROPROTECTORES Y PROMIELINIZANTES DE LA PROGESTERONA (PROG) EN LA ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE). GARAY LAURA (1)(2), GONZALEZ DENISELLE M. CLAUDIA (1)(2), LIMA ANALÍA (1), ROIG PAULINA (1), DE NICOLA ALEJANDRO F.(1)(2)

Instituto de Biología y Medicina Experimental(1); Facultad de Medicina, UBA(2)

La EAE es un modelo experimental de Esclerosis Múltiple caracterizada por infiltración celular y desmielinización del Sistema Nervioso Central. La PROG es una hormona neuroprotectora y promielinizante en procesos de injuria y neurodegeneración por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar sus efectos en un modelo de desmielinización primaria. Una semana antes de la inducción de la enfermedad en ratones C57/BL6, los animales recibieron un pellet de 20 mg o 100mg de PROG mientras que otro grupo permaneció sin tratamiento. La EAE se indujo con el péptido de la glicoproteína oligodendroglia de la mielina (MOG)40-54. Se analizó el grado de infiltración celular, de mielinización y degeneración neuronal en médula espinal. Resultados: Se observó en los animales tratados vs no tratados: 1)-significativa disminución del área infiltrada (EAE+PROG20:3,5±0,7%; EAE+PROG100:3,2±0,8% y EAE: 7,8%±1,3; ambas dosis $p < 0.01$ vs. EAE). 2)- Reducción del 50% en el área de desmielinización, evaluada por Luxol Fast Blue (LFB) y por inmunohistoquímica para la proteína básica de la mielina y proteína proteolipídica (PLP) (ambas dosis $p < 0.05$ vs. EAE). 3)-Aumento del ARNm para PLP a valores similares al control (control: 591,7±87,4 granos/mm², EAE+PROG 20mg:478,3±19,9, EAE:350,2±31,7; $p < 0.05$ vs. EAE). 4)-A nivel neuronal, marcado reestablecimiento del ARNm para la subunidad $\alpha 3$ de la Na⁺,K⁺-ATPasa (control: 176,0±2,0 granos/1000µm²; EAE+PROG20:126,5±14,9; EAE+PROG100: 124,6± 8,3; EAE:70,9±5,9; ambas dosis $p < 0.01$ vs. EAE). Clínicamente, el grupo + PROG mostró retraso en el comienzo de la enfermedad y menor severidad de los signos clínicos. Conclusión: PROG atenuó las alteraciones neuropatológicas y clínicas observadas en la EAE. Se conoce la supresión de la respuesta inmune en la preñez por PROG, mientras que se demuestra por primera vez sus efectos neuroprotectores y mielinizantes en la médula espinal de EAE, hallazgos que serían de gran interés terapéutico en enfermedades desmielinizantes.

584. (127) LAS CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA INDUCEN CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE NEUROPEPTIDOS Y NEUROMODULADORES EN LAS NEURONAS AFERENTES PRIMARIAS EN UN MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO. CORONEL MARIA FLORENCIA, MUSOLINO PATRICIA LEONOR, PERRONE JUAN MARTIN, GERRI GUTTENBERG ROBERTO, VILLAR MARCELO JOSE

Universidad Austral

En animales con lesión del nervio ciático, las células estromales de médula ósea (CEMO) migran selectivamente a los sitios de injuria: nervio y ganglios raquídeos (GR) lumbares, favoreciendo la recuperación funcional de los animales al ser eva-

luada su conducta nociceptiva. En el presente trabajo hemos estudiado la expresión del neuropéptido Y (NPY), galanina, receptor Y1 de NPY y la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS) en los GR lumbares de animales sometidos a ligadura de su nervio ciático e inyección de CEMO en su GR lumbar 4. Como control se estudiaron animales con ligadura con/sin inyección intraganglionar de PBS. En condiciones normales, la expresión de NPY, galanina y nNOS en neuronas aferentes primarias es muy baja. En cambio, el Y1 se expresa en gran cantidad de neuronas de pequeño tamaño. La ligadura del nervio ciático indujo un importante aumento en el número de células inmunoreactivas (IR) para NPY (neuronas de gran tamaño), galanina (neuronas pequeñas, medianas y grandes) y nNOS (neuronas pequeñas y medianas), y una disminución en el número de células que expresan Y1. La administración intraganglionar de CEMO resultó en una atenuación de los cambios inducidos por la lesión, siendo el aumento en la expresión de NPY y galanina significativamente menor al detectado en animales controles. Por otra parte, la administración de CEMO previno la disminución en la expresión del receptor Y1 e indujo un aumento del 40% en el número de células nNOS-IR, en relación a los controles. Estos cambios podrían explicar la capacidad de las CEMO de modificar la conducta nociceptiva de los animales lesionados. El receptor Y1 se asocia a las propiedades analgésicas del NPY, y la capacidad de las CEMO de mantener elevado el número de neuronas que expresan este receptor, así como la producción aumentada de óxido nítrico, estarían contribuyendo a la disminución de las respuestas dolorosas en los animales tratados con CEMO.

585. (315) ALTERACIONES OCULARES Y BIOQUÍMICAS EN PACIENTES CON QUERATOPATÍA CLIMÁTICA EN LA PATAGONIA ARGENTINA. CAFARO THAMARA A (1), SERRA HORACIO M (1), MACCIO J. PABLO (2), KNOLL ERNA G. (2), URRETS-ZAVALIA ENRIQUE A. (2), URRETS-ZAVALIA JULIO A (2)

CIBICI CONICET Facultad de Ciencias Químicas UNC (1); Clínica Universitaria Reina Fabiola UCC (2)

Queratopatía climática (QC) es una enfermedad degenerativa de la cornea de etiología desconocida descrita por nosotros en zona semidesértica rural. Estudiamos ojo externo e iris en pobladores rurales (R) (23 pacientes y 13 controles), comparamos dieta y análisis séricos entre R y 22 controles urbanos (U). Se realizaron: Pruebas oftalmológicas (biomicroscopia, sensibilidad corneal, test de Schirmer II, tiempo ruptura precorneal (TRP) y tinción superficie ocular); cuestionario sobre hábitos alimentarios y cuantificación sérica de proteínas, colesterol, triglicéridos, ácido úrico (kit comerciales) y ascorbato (HPLC); bajo consentimiento informado Se utilizaron test no paramétricos y paramétricos con una $p < 0,05$ significativa. 19 de 23 pacientes R con QC, tienen enfermedad bilateral y solo en 2 de ellos es asimétrica; 16 ojos presentaron grado 1 (micro gotas translúcidas confluentes en la región límbica), 21 ojos grado 2 (turbidez subepitelial en forma de banda de limbo a limbo) y 5 ojos grado 3 (las lesiones previas y numerosas gotas ámbar aisladas o agrupadas). La estesiometría corneal mostró que al avanzar la enfermedad, mayor es la hipoestesia ($r = 0.5$; $p = 0.0008$). El TRP y la tinción de la superficie ocular fue significativamente diferente entre los ojos con grado 3 vs 1, 3 vs 2, y 3 vs controles. En 38.09% de los ojos con QC se observó una despigmentación sectorial o atrofia del estroma del iris inferior. La alimentación de R consistía en ingesta de carne bovina dos o tres diarias, esporádicamente pequeñas cantidades de leche y carencia de frutas y verduras. Los niveles séricos de ascorbato en R fueron significativamente inferiores a U, pero los niveles de lípidos y ácido úrico marcadamente superiores. La proteinemia fue similar en ambas poblaciones. Reportamos por primera vez alteraciones en iris en QC, además en estadios avanzados hay pérdida de sensibilidad y ojo seco. El bajo nivel de ascorbato facilitaría el estrés oxidativo en cornea de estos individuos.

586. (732) ROL DEL SISTEMA ENDOTELINÉRGICO EN LA DEGENERACIÓN DE LA RETINA POR ILUMINACIÓN

CONTINUA. TORBIDONI ANA VANESA, IRIBARNE MARÍA, SUBURO ANGELA MARÍA

Facultad de Ciencias Biomédicas

La muerte de los fotorreceptores es una característica común a varias enfermedades degenerativas de la retina y puede ser estudiada experimentalmente en animales sometidos a iluminación continua. En estudios previos determinamos la presencia de receptores endotelinérgicos ET-A y ET-B en la capa plexiforme externa de la retina murina. Nos preguntamos entonces, si estos receptores podrían controlar la transmisión de la señal visual y de ese modo reducir la injuria por luz. Métodos: Utilizamos retinas de ratones BALB-c machos mantenidos bajo un ciclo de 12hs luz (60 lux)/12hs oscuridad, o expuestos a 1500 lux durante 2 días. Mediante microscopía confocal se estudió la co-localización de ET-A y ET-B con moléculas marcadoras de los fotorreceptores (proteína SV2) y de las células horizontales (RT-97, neurofilamentos pesados fosforilados). Además, determinamos la cantidad de proteína caspasa-3 clivada (C3C) mediante Western blot y medimos su actividad en forma colorimétrica. Resultados: Se demostró inmunoreactividad para ET-A en estructuras varicosas de la plexiforme externa, que no co-localizaba con SV2 ni con RT-97. La inmunoreactividad ET-B co-localizaba totalmente con RT-97. Se detectaron incrementos en la proteína y la actividad de C3C a los 2 días de iluminación continua. El tratamiento con un bloqueante mixto de los receptores ET-A y ET-B (tezosentan, 30 mg/kg/día) redujo los niveles de C3C. Estos niveles también fueron disminuidos, aunque en menor proporción, por el tratamiento con un antagonista selectivo de los receptores ET-A (clazosentan, 30 mg/kg/día). Conclusiones: ET-A se encuentra probablemente en las dendritas de las bipolares, mientras que ET-B estaría localizado en las células horizontales. El efecto de los antagonistas ET-A y ET-B sobre los niveles y actividad de C3C sugiere que estos receptores podrían controlar la sobrevida de los fotorreceptores sometidos a estimulación excesiva.

587. (734) RECEPTORES DE CANNABINOIDES EN CÉLULAS DE LA SUPERFICIE OCULAR. IRIBARNE MARIA (1), TORBIDONI VANESA (1), PRESTIFILIPPO JUAN PABLO (2), RETTORI VALERIA (2), CASTAÑEDA MAURICIO (1), BERRA ALEJANDRO (3), SUBURO ANGELA M (1)

Facultad de Cs. Biomédicas, U. Austral (1), CEFYBO-CONICET, Buenos Aires, Argentina (2), Facultad de Medicina, U. de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (3)

El sistema endocannabinóide está envuelto en diversos mecanismos inmunomodulatorios, entre los que se destaca la inmunidad de la mucosa. Las células epiteliales de la superficie ocular juegan un importante rol en la defensa del ojo, no sólo como barrera mecánica sino también como participante activo en los procesos inmunológicos y alérgicos. Por lo tanto, estudiamos la presencia de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en tejidos de ratón y en una línea celular derivada de la conjuntiva humana. Se utilizaron ratones BALB-c machos. Una vez anestesiados fueron perfundidos con paraformaldehído al 4%. Alternativamente, los ojos fueron enucleados y congelados en fresco. Se obtuvieron criosecciones que fueron incubadas con anticuerpos contra CB1 y CB2 y reveladas con un procedimiento inmunoenzimático amplificado con níquel. También se utilizaron monocapas de la línea celular IOBA-NHC en confluencia que fueron estudiadas con los mismos procedimientos inmunohistoquímicos. Estas monocapas también fueron utilizadas para estudiar el efecto de agonistas cannabinoides sobre los niveles intracelulares de AMPc, utilizando radioinmunoensayo. Se observó una fuerte inmunoreactividad para CB1 y CB2 en la conjuntiva y en la córnea de ratón. También se detectó inmunoreactividad contra ambos receptores en células de la línea IOBA-NHC. En estas últimas, la inmunoreactividad mostró una distribución granular, sugiriendo la presencia de receptores en vesículas citoplasmáticas y en la membrana celular. Por otra parte, el agregado del endocannabinóide anandamida (AEA) a estos cultivos (0.5 μ M) redujo los niveles intracelulares de AMPc. Fue posible detectar inmunoreactividad para los recep-

tores de cannabinoides, CB1 y CB2, en el epitelio corneal y conjuntivo, y también en la línea celular derivada de la conjuntiva humana. La reducción de los niveles de AMPc intracelular en las células conjuntivas por efecto de la AEA indica que dichos receptores son funcionales.

- 588. (249) AUMENTO EN LA EXPRESION DE ADRENOMEDULINA EN LA RETINA DE RATAS SOMETIDAS A ASFIXIA PERINATAL.** REY FUNES MANUEL, SARACENO EZEQUIEL, IBARRA MARIANO, RODRIGO JOSÉ, MARTINEZ ALFREDO, CAPANI FRANCISCO, LOIDL C. FABIÁN, COIRINI HÉCTOR

IByME; Facultad de Medicina – UBA; Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. Dr. Eduardo de Robertis”; Instituto Cajal, Madrid, España; Depto Bioquímica Humana Fac Medicina – UBA

La adrenomedulina (AM) es una hormona peptídica que se expresa en numerosos órganos y tejidos entre los que se incluye el sistema nervioso central. Entre otras funciones esta hormona presenta una acción vasodilatadora y participa en la regulación de la proliferación celular. Los efectos vasodilatadores de AM se producen a través de dos mecanismos principales: endotelio-dependiente vía óxido nítrico (NO)/GMPc, o endotelio-independiente vía AMPc. Otros autores han demostrado que AM protege las células endoteliales cerebrales del estrés oxidativo (Chen et al, Regul Pept, 130:27, 2005). Nuestro grupo ha descrito alteraciones en la expresión de las isoenzimas productoras de NO en la retina de animales asfícticos. En el presente trabajo evaluamos la expresión de AM mediante técnicas de inmunocitoquímica y western-blot, en retinas de ratas machos controles sometidas a AP en normotermia (37 °C) o en hipotermia (15 °C) sacrificadas a 21, 30 y 60 días de edad. Secciones de retina y las bandas de proteínas inmunorreactivas fueron evaluadas por densitometría mediante un equipo para análisis de imágenes computarizado. En todos los grupos se observó inmunorreactividad positiva para AM en la epirretina. Los animales AP presentaron un incremento significativo ($p < 0.01$) de 80 a 120% sobre la densidad óptica determinada en animales controles. El análisis por western-blot mostró resultados similares con un aumento de 20% en AP en la banda de 6kDa. Los aumentos observados en retinas AP, fueron significativamente menores o iguales a controles, en aquellos animales sometidos al tratamiento hipotérmico. Estos resultados sugieren que la AP desencadenada una respuesta de secreción de AM a fin de proteger el endotelio retiniano. Agentes físicos capaces de reducir el estrés oxidativo producido por la reoxigenación como la hipotermia reduce la expresión de AM en la epirretina. (UBACYT- M020).

- 589. (276) CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA OXIDO NITRICO SINTASA EN LA RETINA DE RATAS ASFICTICAS.** REY FUNES MANUEL, AON-BERTOLINO MARÍA LAURA, FERNANDEZ JUAN CARLOS, BOTI VALERIA ROMINA, SARACENO EZEQUIEL, RODRIGO JOSÉ, LOIDL C. FABIÁN, CAPANI FRANCISCO, COIRINI HÉCTOR

IByME - Facultad de Medicina - UBA; Instituto Cajal, Madrid, España; Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. Dr. Eduardo de Robertis”; Depto. Bioquímica Humana - Fac Medicina - UBA

Previamente hemos descrito alteraciones en la retina de ratas machos sometidas a una asfixia perinatal (AP). Estas alteraciones son evidentes en animales adultos (60 días post-AP) y jóvenes (21 días post-AP). Además presentamos evidencias de un aumento significativo en la expresión de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y en proteínas nitradas a ambas edades. En el presente trabajo evaluamos cambios en la expresión de la isoenzima inducible (iNOS) por inmunocitoquímica a 21 y 30 días post-AP y en la actividad enzimática de la NOS determinando la conversión de L-arginina en L-citrulina en homogenatos de retina obtenidas de animales sacrificados a 7, 15, 21, 30 y 60 días de edad, controles (C) o asfícticos. La asfixia fue realizada en dos

condiciones: normotermia (37 °C, AP) o hipotermia (15 °C, HIP). En todos los grupos se observó inmunorreactividad positiva para iNOS sobre la epirretina, con un marcado aumento en las retinas provenientes de animales AP (80-110%; $p < 0.05$). La actividad enzimática constitutiva (nNOS), expresada en pmoles/min x mg proteínas, presentó un aumento con la edad en ratas C con valores máximos a 30 días de edad ($C = 9,3 \pm 0,3$). Los animales AP presentaron un cambio una actividad mayor que los C a los 21 días de edad ($C = 2,1 \pm 0,3$ vs. $AP = 12,3 \pm 3,2$; $P < 0,01$), significancia que se mantuvo a las otras edades. Las retinas HIP no mostraron cambios significativos en la actividad nNOS respecto C. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que la AP desencadenada cambios neurotóxicos en la retina mediados por el óxido nítrico (NO), los cuales se manifiestan a 21 días de edad y se mantienen durante por lo menos otros 40 días. La hipotermia durante la asfixia evita un aumento en la actividad de la nNOS, previniendo el desarrollo de oftalmopatías. El desarrollo de metodologías con hipotermia, podría ser utilizado como una terapéutica eficaz para evitar daños en la retina. (UBACYT- M020 y PID 5782).

ONCOLOGÍA VII

- 590. (272) LA SOBREEXPRESIÓN DE PKC DELTA EN LA LÍNEA DE CARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO HUMANA (PANC-1) INDUCE UN COMPORTAMIENTO TUMORAL MAS AGRESIVO.** MAURO LAURA VALERIA (1), GROSSONI VALERIA (1), URTREGER ALEJANDRO (1), COZAMBO LUCAS (1), CHENGFENG YANG (2), MARCELO KAZANIEZ (2), BAL DE KIER JOFFÉ ELISA (1), PURICELLI LYDIA (1)

(1) Instituto de Oncología Angel H Roffo; (2) Center for Experimental Therapeutics. University of Pennsylvannia.

La desregulación de las quinasas PKC, receptores de los esteres de forbol, se asocia a progresión tumoral. Su rol en la patogénesis del carcinoma pancreático, de pobre pronóstico y resistente a la terapia convencional, es poco conocido. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la sobreexpresión de la isoforma novel PKC delta (PKCd) en algunas propiedades in vitro e in vivo de la línea de carcinoma ductal pancreático humano (PANC-1). Células transfectadas con el vector vacío pMTH se utilizaron como control. Por Western blot se determinó que las células PANC-1 expresan constitutivamente bajos niveles de PKCd. Los clones transfectados en forma estable mostraron altos niveles de la quinasa, obteniéndose la línea PANC-PKCd. Se comprobó que la PKCd transfectada es funcionalmente activa ya que su estimulación con PMA, provocó el aumento de la fosforilación de la molécula ERK, regulada por PKC. Mediante experimentos in vivo en ratones nude ($n=10$) se vió que los tumores originados de PANC-PKCd tienen un tiempo de latencia menor ($Md = 36,5$ d, rango: 31-53) vs pMTH ($Md = 66$ d, 66-73, $p < 0,05$) y un aumento significativo de su tasa de crecimiento. Por inmunohistoquímica contra Ki67 se vió que los tumores de PANC-PKCd fueron más proliferativos que los originados de células control. In vitro, la sobreexpresión de PKCd provocó un aumento en el n° de colonias en agar blando (PANC-PKCd = $11,7 \pm 1,2$ vs pMTH = $8,0 \pm 1,0$ colonias/placa 24). Sin embargo, las PANC-PKCd no mostraron diferencias en la tasa de crecimiento en monocapa con respecto al control. Además, las PANC-PKCd mostraron ser 4,3 veces más resistentes que las control al tratamiento con doxorubicina ($6\mu M$) y a la muerte por privación de suero. Los resultados demuestran que la sobreexpresión de PKCd en las células tumorales pancreáticas humanas induce tumores más agresivos, comportamiento que podría asociarse a su mayor capacidad de proliferación en forma independiente del anclaje y a la mayor resistencia a condiciones de stress.

- 591. (275) EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS ALFA Y BETA Y DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN CÁNCER DE PULMÓN.** MAURO LAURA VALERIA,

SIMIAN MARINA (1), DALLURZO LILIANA (2), AGÜERO GABRIEL (2), LASTIRI JOSÉ MARÍA (2), PALLOTA MARÍA GUADALUPE (2), SMITH DAVID (2), VASSALLO BARTOLOMÉ (2), BAL DE KIER JOFFÉ ELISA (1), PURICELLI LYDIA (1)

Instituto de Oncología Angel H Roffo (1); Hospital Italiano de Buenos Aires (2)

El cáncer de pulmón es una de las causas líderes de mortalidad por cáncer. Si bien se ha visto que el carcinoma de pulmón a células no pequeñas (NSCLC) es capaz de expresar receptores esteroideos, su significado biológico y su potencialidad como factor pronóstico son poco conocidas. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión de los receptores estrogénicos beta (RE β) y alfa (RE α) y del receptor de progesterona (RP) mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de tumores NSCLC de pacientes de bajo estadio (EI y EII). El 31,67% (19/60) de las muestras expresó RP, mientras que el 27,1% (16/59) expresó RE β a nivel nuclear. No se encontró correlación entre la expresión de estos dos receptores. Por otro lado, ningún tumor mostró tinción para RE α . No observamos asociación significativa entre la expresión del RP y sexo, edad, tipo histológico, estadio (T, N) o supervivencia. En el caso de RE β se encontró asociación entre la expresión nuclear y el estadio tumoral, ya que mientras que el 34,0% de los tumores EI (16/47) expresó el antígeno, ninguno EII (0/12) lo hizo (Chi cuadrado, $p < 0,05$). Además, aunque no significativo, se observó que los tumores provenientes de mujeres tienen mayor positividad para RE β que los provenientes de hombres (36,8 vs 22,5%). La curva de Kaplan-Meier mostró que la expresión de RE β se asoció con mejor supervivencia global (LR test: 6,05, $p < 0,05$). Así, mientras que ninguno de los 16 pacientes RE β positivos murió, 12/42 RE β negativo murieron. Sin embargo, el estudio multivariado demostró que no es una variable independiente, aunque el aporte de cada variable en el modelo final no pudo determinarse con certeza por el bajo número de pacientes RE positivos. Si bien la expresión de RP ni RE β no parecen tener un claro valor pronóstico en NSCLC, el hecho de que un subgrupo de pacientes presente receptores esteroideos en el tejido tumoral abriría la posibilidad de incluir hormoterapia como tratamiento adyuvante.

592. (327) BRCA1 FORMA UN COMPLEJO PROTEICO Y REPRIME SU PROPIO PROMOTOR. RUIZ GRECCO MARINA, CHAMORRO JULIAN, ARANDA FEDERICO, FERRANDO MERCEDES, VAZQUEZ ELBA, DE SIERVI ADRIANA

Depto Química Biológica - FCEN - UBA - CONICET

Mutaciones germinales de BRCA1, gen supresor tumoral, confiere un riesgo alto para el desarrollo de cáncer de mama, ovario, próstata y otros tipos de tumores humanos. BRCA1 está involucrado en la regulación de la respuesta al daño en el ADN, el control del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta a las hormonas esteroides y en el mantenimiento de la integridad del genoma. La regulación de la expresión de BRCA1 se cree que es uno de los factores claves que controlan la mayoría de estos procesos. Sin embargo, el mecanismo por el cual BRCA1 es regulado a nivel transcripcional se conoce poco. En este estudio mostramos que BRCA1 es el componente central de la regulación de su propio promotor. Utilizando inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) encontramos que BRCA1 se une a su propio promotor in vivo, reprimiéndolo. Sin embargo, luego del tratamiento con agentes genotóxicos (UV), BRCA1 es liberado y su transcripción es activada. La eliminación de los niveles endógenos de BRCA1 por ARNi causó marcada inducción de la actividad transcripcional de los genes reporteros que contienen al promotor de BRCA1. Además, la sobre-expresión de BRCA1 reprimió la actividad lucifera del promotor de BRCA1. También observamos que la proteína BRCA1 está hiperfosforilada en células tratadas con agentes genotóxicos. Estos hallazgos podrían explicar el mecanismo de auto-regulación de este gen, ya que la proteína BRCA1 se une a su propio promotor reprimiéndolo y luego

de hiperfosforilarse como consecuencia del daño en el ADN, es liberada para activar su propia transcripción.

593. (374) ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE ERK SOBRE LA SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS DERIVADAS DE UN LINFOMA MURINO. PAPADEMETRIO DANIELA LAURA, GRECZANIK SOFIA, CAVALIERE VICTORIA, HAJOS SILVIA, ALVAREZ ELIDA

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, IDEHU-CONICET, UBA

Un 30% de los tumores humanos presentan activación constitutiva de la vía Raf/MEK/ERK, conduciendo a un aumento de la proliferación y suprimiendo la diferenciación celular. Estudios previos demostraron que el modelo LB, un linfoma T murino, presenta activación constitutiva de NF κ B. El objetivo del trabajo fue evaluar en el modelo LB la sobreexpresión de la vía de las MAPK como evento asociado a la proliferación celular y analizar la existencia de un cross-talk con la vía NF κ B. Para ello se emplearon inhibidores específicos de MEK1/2, UO126 y PD98059, y Bay11-7082 como inhibidor de la vía NF κ B. Se comprobó, por western blot, una activación constitutiva de ERK1/2 que fue modulada por los inhibidores de MEK. El tratamiento de las células LB con UO (2.5-40 μ M) o PD (10-40 μ M) produce una inhibición del crecimiento dosis dependiente en los tiempos evaluados, alcanzándose un valor máximo a las 48hs (99 \pm 0)% para UO y (62 \pm 2)% para PD, por incorporación de 3 H-T ($p < 0.001$). Los valores de apoptosis neta a las 48hs, evaluados por coloración con naranja de acridina y bromuro de etidio, fueron de (18 \pm 4)% y (41 \pm 3)% para UO 5 y 10 μ M respectivamente ($p < 0.001$) y de (11 \pm 1)% ($p < 0.001$) y (9 \pm 2)% ($p < 0.01$) para PD 10 y 20 μ M. El co-tratamiento con UO+Bay 2.5 μ M a 48hs mostró un aumento del 62.5% (39 \pm 4)% para UO 58M y del 225% (78 \pm 2)% para UO 10 μ M ($p < 0.001$) respecto al valor de Bay (24 \pm 2)%. PD+Bay no produjo efectos significativamente diferentes. El efecto proapoptótico se analizó sobre la expresión de Bcl-2 y survivina. UO produjo un aumento de 1.7 veces de survivina y un leve aumento de Bcl-2 a las 24hs. En cambio, PD disminuyó un 40% la expresión de Survivina a las 24hs y un 40% de Bcl-2 a las 72hs. Concluimos que el modelo LB presenta una activación constitutiva de ERK siendo sensible a los inhibidores de la vía de las MAPK. Sin embargo, las evidencias experimentales obtenidas hasta el presente no permiten suponer la existencia de un cross-talk con la vía NF κ B.

594. (411) ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO Y DE PROGESTERONA POR MAPK Y AKT EN CARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES DE CRECIMIENTO HORMONO-INDEPENDIENTE. ARNONI MARÍA VICTORIA, LANARI CLAUDIA, NOVARO VIRGINIA

IByME

Los mecanismos que llevan a la hormono-independencia (crecimiento del tumor sin administración de hormonas) y a la resistencia al tratamiento hormonal en cáncer de mama no han sido aún bien dilucidados. La adquisición de resistencia hormonal del tumor conlleva una transformación a formas tumorales más agresivas que no responden al tratamiento hormonal clásico con antagonistas de esteroides. En nuestro laboratorio trabajamos en un modelo de carcinomas mamarios inducidos por medroxiprogesterona (MPA) en hembras BALB/c, sobre la hipótesis de que en tumores hormono-independientes los receptores de progesterona (RP) siguen siendo funcionales y se encuentran activados en forma ligando independiente. En este trabajo proponemos que la activación constitutiva de receptores de estrógenos (RE) podría estar también involucrada en la activación de RP no mediada por ligando. Un mecanismo posible de activación constitutiva de RE y RP sería a través de vías de señalización como la de factores de crecimiento que convergen a nivel de la transactivación de quinasas tipo p44/42 MAPK y PI3K/Akt. Inhibidores selectivos de MAPK (PD98059) y de PI3K/Akt (LY294002) en dosis 10 μ M producen una disminución significativa ($p < 0.01$) en la expresión de

RE α y RP en cultivos primarios derivados de un tumor que crece en forma progestágeno dependiente (PD) y su variante progestágeno independiente (PI). Sin embargo, el porcentaje de inhibición de la expresión de RE α fue mayor para los tumores PI que para los tumores PD. En ensayos preliminares, esta sensibilidad diferencial parece correlacionarse con los efectos inhibitorios de la proliferación celular de PD98059 y LY294002. Estos resultados son muy prometedores, dado que el haber encontrado una posible vía de regulación de la expresión de receptores esteroides independientemente de hormona en tumores PI nos abre un camino para el estudio de la adquisición de independencia hormonal en los tumores mamarios.

595. (436) MODULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE ADENOCARCINOMAS DE PULMÓN Y MAMA MURINOS POR ANTI-ESTRÓGENOS Y ANTI-INFLAMATORIOS. HAEDO MARIANA, PONTIGGIA OSVALDO, SIMIAN MARINA, KLEIN SLOBODANKA

Área Investigación. Instituto de Oncología AH Roffo

Los tumores de pulmón y de mama son los de mayor índice de mortalidad por cáncer. La terapia más utilizada en tumores de mama hormono-dependientes es el tamoxifeno (TAM). Los adenocarcinomas de pulmón son más frecuentes en mujeres, en fumadoras y en las que reciben tratamiento de reemplazo hormonal. La actividad de aromatasas precursoras de la síntesis de estrógenos (E) es favorecida por PGE2. Se describió la presencia de receptores de progesterona (PR) y de ER en tumores de pulmón, por lo que un tratamiento anti-hormonal podría ser útil. Objetivo: En los tumores murinos de mama M05 hormono-dependiente, y la línea de tumor de pulmón LP07 con componentes inflamatorios determinar: a. la influencia hormonal sobre el desarrollo de LP07 por estradiol (Es); b. efecto de la terapia con TAM sobre el desarrollo LP07; c. efecto del anti-inflamatorio indometacina (INDO), sobre M05 solo y combinado con TAM. Se transplantaron hembras BALB/c de 2 meses de edad con M05 o LP07, sc. Se suministró INDO (0,04 mg/día) desde el 1er día de trasplante y/o TAM (5mg/ratón) desde el día 5 a los ratones con LP07 y del día 21 en los ratones con M05. Los tumores fueron medidos hasta el día 30 post-inóculo para el LP07, y el 58 para el M05. Resultados: a la administración de Es estimuló el crecimiento de LP07; b INDO o TAM inhibieron el crecimiento de LP07 c-la combinación de ambos resultó en una disminución mas significativa ($p < 0.01$); d. INDO disminuyó el desarrollo del tumor M05 ($p < 0.05$) igual que TAM ($P < 0.05$), la combinación de ambos inhibió de manera similar al con TAM solo e- se determinó la presencia de PR y ER en LP07. Conclusión: El tumor LP07 respondería al tratamiento anti-estrogénico in vivo; esta terapia constituye un tratamiento no convencional para el tumor de pulmón. En el tumor M05, la combinación de los tratamientos no disminuyó la inhibición obtenida con TAM, el agregado de anti-inflamatorios en terapias de cáncer de mama podría disminuir las dosis de TAM utilizadas.

596. (445) EFECTO DEL ESTRÉS POR HIPOXIA EN LA RESPUESTA DE CÉLULAS TUMORALES MURINAS A LA ROSIGLITAZONA. JASNIS MARIA ADELA, BORENSTEIN XIMENA, MAGENTA GABRIELA, ROLANDO ROMINA

Instituto de Oncología AH Roffo

La hipoxia está relacionada con la progresión tumoral y la respuesta a la quimio y radioterapia. Los PPAR γ (Rc nucleares activadores de la proliferación de peroxisomas) regulan la expresión génica luego de la unión de ligandos. Participan en diferenciación celular, homeostasis de glucosa, respuesta inflamatoria y apoptosis. La PGJ2 es un ligando natural y las tiazolidinedionas (drogas hipoglucemiantes) son ligandos sintéticos usadas en el tratamiento de la diabetes tipo 2, aterosclerosis y cáncer. Objetivo: estudiar el efecto del estrés por hipoxia sobre la actividad de la rosiglitazona (Ro) sobre las células tumorales murinas LMM3. Materiales y Métodos: Se cultivan células LMM3 (1×10^4 células/hoyo, placas de 96 hoyos) mimetizando condiciones de hipoxia

con Cl₂Co (150uM) y se tratan con Ro1uM. A las 24h se determina viabilidad celular por MTS y niveles de óxido nítrico (NO) por Griess. Los ensayos se realizaron con y sin 10% SFB. Se determina también el efecto de hipoxia sobre la adhesión celular a plástico. Resultados: Con SFB, Ro sólo inhibe 9% viabilidad celular ($p < 0.006$), efecto revertido con Cl₂Co, que por se aumenta 20% la viabilidad ($p < 0.0000$). En ausencia de SFB (mayor estrés) Ro inhibe 28% viabilidad celular ($p < 0.001$) siendo mayor la inhibición en hipoxia (45%, $p < 0.000$ vs Ro). El Cl₂Co por se no modifica viabilidad celular. Producción basal de NO fue 3 veces menor con SFB que en ausencia; no asociado a cambios en viabilidad. Ro y Cl₂Co, solos o combinados, disminuyen aprox. 45% la producción de NO ($p < 0.000$) con/sin SFB. Células LMM3 adheridas y tratadas con Ro+Cl₂Co son resistentes menos a la aspiración (despegue) que las tratadas sólo con Ro ($p < 0.0002$). Conclusión: en LMM3 hipoxia induce resistencia a la citotoxicidad de Ro, pero en presencia de mayor estrés (ausencia SFB) las células perderían dicha resistencia siendo mayor el efecto de la Ro. La hipoxia participaría también en el proceso de diseminación tumoral ya que disminuye la adhesión celular.

597. (475) INTERFERÓN ALFA-2B Y TGF-BETA 1: MECANISMO DE ACCIÓN EN HEPATOCITOS DE HÍGADOS PRENEOPLÁSICOS DE RATA. ALVAREZ MARÍA DE LUJÁN, QUIROGA ARIEL, PARODY JUAN PABLO, RONCO MARÍA TERESA, FRANCÉS DANIEL, OCHOA ELENA, MONTI JUAN, CARNOVALE CRISTINA, CARRILLO MARÍA CRISTINA

Instituto de Fisiología Experimental (CONICET)

La vía de activación del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) involucra la fosforilación y translocación nuclear de las proteínas Smad-2/3. Por otra parte, se ha demostrado que el interferón gamma inhibe dicha vía en células neoplásicas a través de la inducción de Smad-7. En estudios previos observamos que el interferón alfa-2b (IFN- α 2b) induce secreción de TGF- β 1 en hepatocitos de hígados preneoplásicos. En el presente trabajo evaluamos los efectos del IFN- α 2b sobre la producción del TGF- β 1 y su vía de señalización en hepatocitos de hígados preneoplásicos de rata. Las ratas fueron sometidas a un modelo de preneoplasia experimental y los hepatocitos aislados fueron cultivados sin y con IFN- α 2b a distintos tiempos (1, 4, 7, 20 y 24 horas). Se determinó: secreción de TGF- β 1 (por ELISA), niveles del mensajero de TGF- β 1 (por RT-PCR) y niveles de las proteínas TGF- β 1, receptor para TGF- β 1, Smad-2/3 fosforiladas y Smad-7 (por inmunoblotting). El IFN- α 2b indujo la secreción de TGF- β 1 al medio de cultivo a partir de las 7 horas (+130%), mientras que los niveles de TGF- β 1 y de la proteína aumentaron en los hepatocitos a partir de las 4 horas de cultivo (+75%* y +150%*, respectivamente). Por otra parte, la presencia de IFN- α 2b aumentó los niveles del receptor para TGF- β 1 desde las 4 horas de cultivo (+200%*). Smad-2/3 fosforiladas se mostraron aumentadas en los extractos nucleares de hepatocitos tratados con IFN- α 2b (+60%* a las 24 horas de cultivo), mientras que Smad-7 inhibitoria no se mostró modificada ante el tratamiento con IFN- α 2b a los tiempos estudiados (* $p < 0,05$). En conclusión los resultados obtenidos demuestran la existencia de una estimulación del IFN- α 2b sobre la producción y secreción del TGF- β 1, aumentado los niveles de su receptor, y la consecuente activación de la vía de señalización de la citoquina.

598. (351) TRANSPORTE IÓNICO EN TUMORES SUJETOS A TRATAMIENTO ELECTROQUÍMICO: MODELADO IN VIVO, IN VITRO E IN SILICO. SUAREZ CECILIA, PABLO TURJANSKI, LUCAS COLOMBO, ALEJANDRO SOBA, NAHUEL OLAIZ, ESTEBAN MOCSKOS, GRACIELA GONZÁLEZ, GUILLERMO MARSHALL

Fac de Cs Exactas y Naturales – UBA; Inst ROFFO

El TEQ de tumores consiste en el pasaje de una corriente eléctrica continua a través de electrodos insertos en el tumor. Esta

terapia ha sido ampliamente utilizada en China desde hace más de diez años, con éxito en más de 10000 pacientes oncológicos. Se propone que los extremos cambios de pH inducidos alrededor de los electrodos son el principal mecanismo de destrucción por necrosis tisular. Con el objeto de estudiar dichos cambios, aquí se estudia el transporte iónico producido durante la TEQ in vivo, in vitro e in silico (modelado matemático y simulación numérica). In vivo se determina el perfil de valores de pH y los diámetros de necrosis resultantes de la aplicación de diferentes dosis de TEQ (10, 30 y 50C) en tumores M2 desarrollados sc en ratones BALB/c. In vitro se determina el perfil de pH resultante de la TEQ aplicada a geles de colágeno I, modelo simplificado de intersticio tumoral. Finalmente, el modelado in silico, describe el transporte iónico producido en un electrolito compuesto por cuatro iones y sujeto a una corriente eléctrica continua, mediante las ecuaciones unidimensionales de Nernst-Planck y Poisson. Los resultados experimentales in vivo no muestran diferencias significativas de pH entre dosis pero sí entre distancias al electrodo. El diámetro de necrosis depende significativamente de la dosis (11.5 ± 3 y 17.5 ± 4 mm para 10 y 50C resp, $p=0.0002$). Además se observó deshidratación en el ánodo y edema en el cátodo. In vitro, los patrones de pH varían significativamente entre dosis y entre distancias al electrodo. Los perfiles espaciales de los valores de pH tanto del modelado in vivo como del modelado in vitro presentan buena correspondencia con las predicciones del modelado in silico. Esta estrategia combinada de triple modelado podría tener importantes implicancias en el diseño de condiciones operativas óptimas y en el planeamiento de dosis de una TEQ aplicada específicamente a un tumor en particular.

599. (521) EFECTO DE LA FORMA TRANS DEL ACIDO RETINOICO (ATRA) EN EL CRECIMIENTO IN VITRO E IN VIVO DE LA LINEA TUMORAL PULMONAR MURINA LP07. VELOSO MARIA JOSE, TODARO LAURA, ELISA BAL DE KIER JOFFE, LYDIA PURICELLI

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo

El ácido retinoico, un derivado fisiológico de la vitamina A (retinol) es un modulador de la proliferación y diferenciación en distintos tipos celulares. Previamente demostramos que las células LP07 expresan los receptores de ácido retinoico RARa y RARb así como la proteína de unión al retinol CRBP. También demostramos que el ATRA inhibe su crecimiento, aumenta la expresión de cadherina-E y disminuye la actividad de uPA. EL objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del retinol sobre el crecimiento in vitro, en comparación con el ATRA, y estudiar el efecto del ATRA sobre el crecimiento in vivo y la diseminación metastásica de LP07 así como su capacidad invasiva in vitro. El retinol 1uM disminuyó significativamente el crecimiento in vitro de LP07 a partir del cuarto día de tratamiento ($p < 0,05$), siendo más sensible que el ATRA a igual dosis. Esto sugiere que estas células son capaces de metabolizar el retinol a ATRA. Por otro lado, el tratamiento durante 5 d con ATRA 1uM disminuyó un 49% ($p < 0,05$) la invasión a matrigel (cámaras transwell). In vivo el tratamiento oral con ATRA (2 mg/animal, 2 veces por semana durante 15 d) de ratones Balb/c portadores de tumores LP07 palpables disminuyó el crecimiento tumoral (30 d post inoculación: Tratado: $2,47 \pm 1,5$ vs Control $3,67 \pm 1,5$ cm³, $p < 0,05$). Por otro lado, ratones inoculados i.v. con células pretratadas durante 5 d con ATRA 1uM mostraron una marcada disminución del número y tamaño de los nódulos pulmonares a los 21 d post inoculación ($p < 0,05$). Estos resultados, junto con los datos previos, sugieren que el ATRA modula mecanismos involucrados en la progresión tumoral, como el crecimiento, la invasión y la diseminación metastásica. Asimismo indican que la Vitamina A podría ser también efectiva en este modelo de cáncer de pulmón murino.

600. (525) C-SRC EN CÁNCER DE MAMA: PESTICIDAS ORGANOCORADOS AUMENTAN SU EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN. GARCÍA MARÍA ALEJANDRA, PEÑA DELFINA, COCCA CLAUDIA, FRAHM ISABEL, ALVAREZ LAURA, BERGOC ROSA, KLEIMAN DIANA, RANDI ANDREA

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Departamento de Patología, Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado, consumido con los alimentos y acumulado en tejido adiposo. Demostramos que en glándula mamaria de ratas intoxicadas con HCB, aumentó la expresión de RI, RIGF-I y de IRS-1 y su fosforilación. En tumores de mama inducidos con NMU, aumentó el número de tumores por rata y el volumen tumoral, y el RIGF-I y la fosforilación del IRS-1 disminuyeron. La c-Src es una proteína no receptora, cuya actividad quinasa de tirosina tiene función en la morfología, motilidad, proliferación y sobrevivencia celulares, y su expresión y/o actividad se encontraron elevadas en cáncer de mama. Nuestro objetivo fue estudiar el mecanismo de acción del HCB sobre la expresión y activación de la c-Src en: 1) glándula mamaria y tumores inducidos con NMU en ratas y 2) líneas celulares neoplásicas de mama MCF-7(+RE) y MDA-MB231(-RE). Se usaron ratas: Control, HCB(100 mg/kg pc) durante 60 días, NMU(50 mg/kg pc) 3 dosis y NMU-HCB. Las células mantenidas en RPMI con 1% antibiótico-antimicótico, glutamina y 10%SFB se expusieron al HCB por 24 horas (Control, EtOH, 0.005, 0.05, 0.5 y 5 μ M). La expresión y activación de la c-Src se estudiaron en microsomas y lisados totales, por inmunoblot con anticuerpos específicos contra las formas total y fosforilada en Tyr416. El HCB: 1. aumentó la expresión de c-Src en glándula mamaria 140% ($p < 0.05$) y en tumor 42% ($p < 0.05$); 2. en la línea celular MCF-7, aumentó la expresión en 46%(HCB 0.005 μ M; $p < 0.01$), mientras que la activación incrementó 140%(HCB 0.05iM; $p < 0.01$) y en la línea celular MDA-MB231, aumentó los niveles en 36% (HCB 0.5 μ M; $p < 0.05$), mientras que la activación incrementó 168%(HCB 0.05 μ M; $p < 0.05$). El HCB aumenta la expresión de la c-Src en glándula mamaria y tumores de rata y la expresión y activación en líneas neoplásicas de mama humanas, sugiriendo que el tóxico afecta señales intracelulares que podrían contribuir al desarrollo del cáncer.

601. (530) EFECTO DE LOS RETINOIDES (RETINOL Y ATRA) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO E IN VIVO DE LA LINEA TUMORAL MAMARIA MURINA LM38-LP. VELOSO MARIA JOSE, TODARO LAURA, PURICELLI LYDIA, FARIAS EDUARDO, MIRA Y LOPEZ RAFAEL, BAL DE KIER JOFFE ELISA

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo; The Mount Sinai School Of Medicine

El ácido retinoico (ATRA), derivado fisiológico de la vitamina A (retinol) ejerce sus efectos sobre el crecimiento y la diferenciación celular a través de la unión a heterodímeros RAR/RXR regulando la expresión génica. Previamente demostramos que el ATRA inhibe el crecimiento, la capacidad proteolítica, migratoria y metastásica de la línea tumoral mamaria LM38-LP, constituida por células luminales y mioepiteliales. Nuestro objetivo fue analizar en esta línea el perfil de receptores de ATRA y evaluar el efecto de los retinoides (retinol y ATRA) sobre el crecimiento in vitro e in vivo, dilucidando algunos de los mecanismos involucrados. Determinamos por RT-PCR que la línea LM38-LP expresa RARa1/a2, RARb1/b2/b3, RAR g1/g2 y RXRa. El tratamiento de 5 días con retinol 1 uM tuvo el mismo efecto que el ATRA sobre la inhibición del crecimiento in vitro (control: $1,24 \pm 0,13$; ATRA: $0,91 \pm 0,10$; retinol: $1,06 \pm 0,10$, $p < 0,05$), sugiriendo que estas células son capaces de metabolizar retinol a ATRA. Además la inhibición ejercida por ATRA fue revertida totalmente por el antagonista de RARa RO415253 ($p < 0,05$), demostrando que RARa está involucrado en este proceso. ATRA 1uM indujo un aumento del porcentaje de apoptosis ($2,7 \pm 0,9$ vs $0,7 \pm 0,3$) y una disminución del de mitosis ($2,9 \pm 1,01$ vs $3,6 \pm 1,1$) a partir de las 72 hs. Por otro lado, en un ensayo de reversibilidad, las células tratadas 4 días con ATRA recuperaron los niveles del control al 3er día de retirado el mismo ($p < 0,05$). In vivo el tratamiento oral con ATRA (2 mg/animal, 2 v/semana por 15 d) de ratas

tones Balb/c portadores de tumores LM38-LP palpables disminuyeron el crecimiento tumoral a partir de los 21 d post inoculación ($p < 0,05$). Nuestros resultados demuestran que ATRA es efectivo para inhibir el crecimiento de la línea mixta LM38-LP tanto in vitro como in vivo. Este efecto sería resultante de la sumatoria de eventos de apoptosis y arresto celular, con participación de la vía RAR α , en una o en ambas subpoblaciones celulares. (FIRCA RO3TW007207).

602. (543) MENOR RESPUESTA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN CÉLULAS DE MAMA TRANSFORMADAS CON EL ONCOGEN H-RAS RESPECTO A LAS CÉLULAS NORMALES. RODRIGUEZ LORENA, DI VENOSA GABRIELA, BATLLE ALCIRA, CASAS ADRIANA

CIPYP, CONICET-UBA

La Terapia Fotodinámica a partir de ácido 5-aminolevulínico (ALA) ha sido empleada exitosamente en el tratamiento de ciertos tumores superficiales. Las porfirinas generadas endógenamente a partir de ALA resultan en la fotosensibilización del tejido luego de la iluminación con una luz adecuada. El objetivo del presente trabajo es comparar la eficiencia de producción de porfirinas a partir de ALA y la susceptibilidad al tratamiento fotodinámico en células tumorales y normales. Para ello se emplearon células HB4a de epitelio luminal mamario normal y su derivada transfectada con el oncogen H-Ras (VAL/12 Ras). Luego de 3 hs de exposición al ALA, las células HB4a producen la máxima cantidad de porfirinas sintetizadas de $3,76 \pm 0,07 \mu\text{g}/105 \text{ cél}$, mientras que el máximo para las HB4a-Ras fue de $2,44 \pm 0,0507 \mu\text{g}/105 \text{ cél}$, indicando que las HB4a forman significativamente más porfirinas ($p < 0,05$) que las HB4a-Ras. Además se observó una mayor capacidad de síntesis de porfirinas a bajas concentraciones en las HB4a, evidenciada por la llegada al plateau de porfirinas con una concentración más baja de ALA (1 mM), mientras que para HB4a-Ras el plateau se encuentra en 4 mM de ALA. Esta menor eficiencia en la síntesis de porfirinas se traduce en una menor respuesta a la ALA-TFD empleando como fuente de luz un banco de tubos fluorescentes (Dosis letal 50: $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ J}/\text{cm}^2$ para HB4a versus $3,4 \cdot 10^{-4} \text{ J}/\text{cm}^2$ para HB4a-Ras luego de 3 hs ALA 2 mM). Se concluye que la línea tumoral transfectada con Ras responde menos a la ALA-TFD que la línea normal. Esto contradice la hipótesis general de selectividad del ALA por las células tumorales y fenómeno que se estudiará exhaustivamente.

603. (595) EFECTO ANTITUMORAL DE LA TRANSFERENCIA DEL GEN DEL INTERFERON BETA. VILLAVERDE MARCELA SOLANGE, KARARA ARMANDO LUIS, GLIKIN GERARDO C., FINOCCHIARO LILIANA M. E

Unidad de Transferencia Genética. Instituto de Oncología "Dr. Angel H. Roffo"

Mediante la transferencia del gen de interferón tipo 1 (IFN) se pretende lograr una mayor efectividad antitumoral que la demostrada por su proteína. En este trabajo evaluamos el efecto de la transfección del plásmido portador del gen de IFNB solo o combinado con otras citocinas, sobre monocapas o esferoides multicelulares de: a) sarcoma de Ewing (EW7 y COH), b) adenocarcinoma de mama (MCF-7) y c) adenocarcinoma de colon (HT-29). La respuesta se correlacionó con la producción de IFNB por las células tratadas, y se comparó con el efecto del agregado exógeno de la proteína IFNB ($1 \cdot 10000 \text{ UI/ml}$). Los resultados obtenidos mostraron que todas las líneas evaluadas fueron sensibles a la terapia genética con IFNB ($p < 0,01$), efecto no potenciado por la combinación con otras citocinas. Ninguna de las líneas respondió al tratamiento con TK/GCV. Se encontró que las líneas después de muchos repiques pierden sensibilidad al IFNB y adquieren sensibilidad al sistema TK/GCV. Los esferoides multicelulares mostraron un efecto significativamente menor ($p < 0,01$) que sus respectivas monocapas. Las células transfectadas liberaron al medio de cultivo entre 1200 y 2600 UI/ml de IFNB. El agregado exógeno de la proteína IFNB en ninguna de las concentraciones estudiadas fue mayor que el obtenido con el gen IFNB. Por último, la citometría de flujo reflejó el efecto necrótico/

apoptótico del gen IFNB obteniéndose hasta un 80% de la población en esta ventana. Concluimos que: a) la terapia génica con IFNB tiene significativos efectos citotóxicos en todas las líneas evaluadas, b) la terapia génica con IFNB podría ser una buena opción de tratamiento en tumores que no responden al sistema TK/GCV, c) el aumento en el número de pasajes y la conformación tridimensional del cultivo disminuye la sensibilidad al gen IFNB y d) en este último caso, la terapia génica con TK/GCV podría ser una buena opción para tratamiento de tumores que no responden al IFNB dado que se sensibilizan a TK/GCV.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES III

604. (485) HEREGULINA ACTIVA A STAT3 POR UN MECANISMO DEPENDIENTE DE ERBB-2, SRC Y LAS QUINASAS JANUS 1 Y 2 (JAK1 Y JAK2) EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA. ROSEMBLIT CINTHIA, PROIETTI CECILIA, BÉGUELIN WENDY, MONDILLO CAROLINA, CARNEVALE ROMINA, RIVAS MARTÍN, CHARREAU EDUARDO H., SCHILLACI ROXANA, ELIZALDE PATRICIA V.

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Previamente demostramos que la HRG promueve la activación de Stat3 (transductor de la señal y activador de la transcripción 3) en células C4HD provenientes de un adenocarcinoma mamario murino progénesico-dependiente y en la línea celular de cáncer de mama humano T47D. En el presente trabajo demostramos, mediante ensayos de Western blot, que la fosforilación de Stat3 en el residuo tirosina 705 fue inhibida por el bloqueo de la expresión de ErbB-2, usando oligodeoxinucleótidos antisentido a su ARNm (ASERbB-2), por el pretratamiento con el inhibidor selectivo de ErbB-2 (AG825) y con el inhibidor de Src (PP2). La expresión de las formas inactivas de las Jaks (dominantes negativos: Jak1DN y Jak2DN) también inhibió la fosforilación de Stat3. Mediante ensayos de transfección transiente con un plásmido conteniendo 4 copias de la secuencia de alta afinidad de Stat3, m67, clonada río arriba de un gen reportero LUC, demostramos que la presencia de los mencionados inhibidores y de los JakDNs bloqueó la capacidad de la HRG de aumentar la actividad transcripcional de Stat3 en ambos tipos celulares. Además, pudimos demostrar la formación de un complejo entre Stat3, Src y ErbB-2 inducido por HRG, mediante inmunoprecipitación. A través de estudios de inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal, determinamos que el mencionado complejo se localiza en el núcleo a los 30 minutos de tratamiento con HRG. El tratamiento con ASERbB-2, AG825 y PP2 inhibió la formación del complejo. Estos resultados demuestran que HRG induce activación transcripcional de Stat3 actuando a través de ErbB-2 por un mecanismo que requiere la activación de Jak1 y 2, Src y ErbB-2 y que HRG es capaz de inducir la formación del complejo ternario entre Stat3, Src y ErbB-2 en células de cáncer de mama humano y murino.

605. (568) PARTICIPACIÓN DE STAT3 (TRANSDUCTOR DE LA SEÑAL Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 3) EN LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR) POR PROGESTÁGENOS. PROIETTI CECILIA JAZMIN, BÉGUELIN WENDY, ROSEMBLIT CINTHIA, CARNEVALE ROMINA, RIVAS MARTÍN, CHARREAU EDUARDO, SCHILLACI ROXANA, ELIZALDE PATRICIA

Instituto de Biología y Medicina Experimental

En los últimos años, se han identificado un gran número de coactivadores que modulan la función de los receptores nucleares. Demostramos previamente que los progénesicos son capaces de inducir la activación transcripcional de Stat3 en células tumorales mamarias humanas y murinas mediante un mecanismo que requiere las actividades de las quinasas Jaks y c-Src. También encontramos que la presencia de Stat3 activa es un requisito para la estimulación del crecimiento de células de cáncer

de mama por progestágenos, tanto in vivo como in vitro. El presente trabajo estudia la capacidad de Stat3 de modular la función del PR unido a su ligando, en las células C4HD progestágeno-dependientes, provenientes de un adenocarcinoma mamario murino inducido por MPA, y en las células T47D. Células C4HD y T47D fueron cotransfectadas de manera transiente con un vector de expresión para una forma mutante constitutivamente activa de Stat3, Stat3-C, junto con un vector reportero conteniendo cinco copias del elemento respondedor a progesterona (PRE) clonadas río arriba del gen de la luciferasa. La transfección con cantidades crecientes de Stat3-C estimuló, de manera dosis-dependiente, la transcripción del PRE por MPA. Mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal se demostró que Stat3 y PR se asocian en el núcleo luego del tratamiento de las células C4HD con MPA por 15 minutos. Se estudió el reclutamiento del PR y de Stat3 a la región promotora del gen bcl-X que contiene un PRE, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. El tratamiento de las células C4HD con MPA, indujo la asociación específica de Stat3 y PR al PRE en el promotor de bcl-X, en el contexto de células vivas. Estos resultados demuestran que el PR activado por su ligando interacciona con Stat3 aumentando la activación transcripcional del PR. De esta forma describimos, por primera vez a Stat3 como coactivador del PR.

606. (250) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES STAT5 Y STAT3 EN CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO MURINO, HC11. RODRIGUEZ GRANILLO AGUSTINA (1), BOFFI JUAN CARLOS (1), BARAÑO LINO (1), KORDON EDITH (2), PECCI ADALI (1) (2), GUBERMAN ALEJANDRA (1)

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (1); IFIBYNE, CONICET (2)

Los factores de transcripción STAT regulan diversas funciones celulares. Particularmente, STAT5 y STAT3 son de gran relevancia durante el desarrollo, diferenciación, proliferación y muerte del epitelio mamario. En este tejido, la activación de STAT5 está asociada a la proliferación y diferenciación en respuesta a prolactina, durante la preñez y lactancia. Contrariamente, la actividad de STAT3 se vincula a la muerte celular y remodelación durante la involución post-lactancia, en respuesta a la citoquina LIF. Al comienzo de la involución, la actividad de STAT5 declina al mismo tiempo que aumenta la actividad de STAT3. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción entre los factores STAT5 y STAT3, debido a su particular cinética de activación, en una línea celular de epitelio mamario murino, HC11, con el fin de dilucidar si existe regulación cruzada entre ellos. Mediante ensayos de Western blot, demostramos que el tratamiento de las células con LIF reduce los niveles de STAT5 fosforilado. Consistentemente, mediante análisis de RNA por RT-PCR, observamos que el tratamiento con LIF reduce además la capacidad de STAT5 de activar la transcripción de uno de sus genes blanco, β -caseína y de reprimir la expresión del promotor 1 del gen bcl-x. Esta actividad represora fue demostrada por ensayos de transfección transiente. Confirmamos el efecto represor de LIF sobre la actividad de STAT5, por la disminución de los niveles de β -caseína y WAP, en ensayos de Western blot. Mediante análisis de los niveles de RNA, por STAT3, c-fos y C/EBP- δ comprobamos que el efecto RT-PCR de dos genes blanco de LIF sobre la capacidad reguladora de la transcripción de este factor aumenta en un contexto lactogénico. Estos resultados sugieren fuertemente que la actividad de STAT5 está modulada negativamente por STAT3 y abren la posibilidad que la declinación de la actividad de STAT5 al comienzo de la involución mamaria sea consecuencia de la actividad de STAT3 en respuesta a LIF.

607. (528) ACIDO HIALURONICO (AH) INDUCE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉCICAS RESISTENTES A MUTLIDORGAS MEDIANTE LA ACTIVACION DE TIAM1. ALANIZ LAURA DANIELA, GARCÍA MARIANA G., CORDO

RUSO ROSALÍA, SACCODOSSI NATALIA, ALAVAREZ ELIDA, HAJOS SILVIA E.

IDEHU

La invasión y migración de células tumorales están reguladas por mecanismos de adhesión e interacción proteolítica con componentes de la matriz extracelular entre ellos AH. En tumores linfoides la actividad proteolítica durante la invasión celular sería menos relevante que los mecanismos de migración relacionados con cambios en el citoesqueleto. Una proteína involucrada en re-arreglos del citoesqueleto relacionada con la invasión tumoral es el intercambiador de nucleótidos de GTP específico para RAC1: TIAM1. Con el objeto de establecer cómo AH induce la migración celular estudiamos su capacidad para activar TIAM1. Se utilizaron líneas celulares derivadas de un linfoma T murino resistentes a doxorubicina (LBR-D160) y vincristina (LBR-V160) con diferente capacidad invasiva in vivo. Estas células presentaron distinta capacidad migratoria hacia gradientes de AH in vitro, siendo LBR-D160 la línea que migró eficientemente. La actividad proteolítica de metaloproteasas evaluada por zimografía no reveló diferencias entre ambas líneas. Cuando analizamos la expresión de TIAM1 por western blot sobre extractos de membranas celulares se observó mayor expresión en LBR-D160 que aumentó cuando las células fueron tratadas con AH, indicando que AH induce la activación de TIAM1. Esto se corroboró por microscopía de fluorescencia utilizando células transfectadas con TIAM1 asociada a la expresión de la proteína verde de fluorescencia. También fue analizada la vía de señalización PI3K/Akt (Akt 1 y 2) involucrada en la activación de TIAM1. Se observó por western blot que el tratamiento con AH indujo un aumento significativo en la traslocación de PI3K a la membrana y aumento de la fosforilación de Akt, eventos que indican activación. Los resultados permiten concluir que AH induce migración de las células leucémicas a través de la activación de TIAM1, mediado además por PI3K/Akt2, y que las diferencias en la capacidad migratoria de estas células no se basan en su capacidad proteolítica

608. (468) ANÁLISIS DEL PATRÓN GÉNICO REGULADO POR PROGESTINA EN CÉLULAS ESTROMALES. VALLEJO GRISELDA, BEATO MIGUEL, SARAGUETA PATRICIA

Centro de Regulación Genómica, IBYME-CONICET

Demostramos previamente que la progestina R5020 (10-10M) induce la proliferación de células estromales de endometrio a través de las vías de MAPK y PI3K-Akt; y que la vía de PI3K media la inducción de ciclina D1 producida a los 45 min de tratamiento con R5020. Tanto la respuesta proliferativa como la activación de las vías citoplasmáticas y la inducción de ciclina D1 involucran al receptor de progesterona (RP) y al receptor de estradiol (RE) beta. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el patrón de expresión génica involucrado en la proliferación dependiente de progestinas. Se hibridaron microarreglos de oligos de rata con cDNA de células UIII-línea estromal endometrial de rata- tratadas durante 45min con R5020 10-10M. Se obtuvieron 56 genes inducidos y 146 genes reprimidos. Mediante herramientas bioinformáticas identificamos los términos ontológicos sobre-representados ($P < 0.01$): a) Proceso Biológico: Regulación de la transcripción, b) Función Molecular: Unión a ácidos nucleicos y Actividad de Factor de Transcripción, c) Compartimento Celular: Núcleo. La regulación de 2 genes de inducción temprana, JunD y Cyr61 (1.7 y 1.5 veces de cambio respectivamente) se validó mediante PCR en tiempo real (JunD=1.7 \pm 0.2, Cyr61=1.4 \pm 0.1 veces mRNA/control). El pretratamiento con antagonistas del RP o del RE, o con inhibidores de la vía de MAPK o PI3K, muestra que: a) la inducción de JunD y Cyr61 por progestina está mediada por el RP clásico, pero solo la regulación de Cyr61 requiere RE, b) la regulación de JunD y Cyr61 requiere de la vía de MAPK, y c) inducción de JunD involucra la vía PI3K/Akt. Estos resultados muestran que tiempos cortos de estimulación con progestina inducen la expresión de distintos genes a través del RP mediante al menos dos cascadas citoplasmáticas distintas, y que el RE participa en la inducción de algunos de ellos.

- 609. (458) ESTUDIO DE LA TRASLOCACIÓN DE INOS A LA MITOCONDRIA EN MODELOS DE TRANSCRIPCIÓN IN VITRO Y EN CULTIVOS CELULARES.** FRANCO MARÍA CLARA (1), ANTICO ARCIUCH VALERIA G. (1), MOLINAS FLORENCIA (1), SASSONE ALINA (1), PODEROSO JUAN JOSÉ (1), CARRERAS MARÍA CECILIA (1, 2)

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas (1); Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (2), Universidad de Buenos Aires

En la endotoxemia, el óxido nítrico (NO) aumenta la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno y la formación de peroxinitrito que resulta en un deterioro severo de la función mitocondrial y la consiguiente falla orgánica. La administración de 10 mg LPS/kg a ratas Wistar machos estimula la expresión de NO sintasa inducible (iNOS) en el hígado a partir de las 2 hs post tratamiento, con un pico a las 6 hs. El aumento citosólico es seguido de la aparición de iNOS en la mitocondria, resistente al tratamiento con proteinasa K (PK). Con el objeto de estudiar la traslocación de iNOS a mitocondria realizamos ensayos in vitro con sistemas de transcripción-traducción (STT) TnTQuick y transfectamos células HEK293, que no expresan ninguna isoforma de NOS, utilizando el vector piNOSL8 que presenta un promotor T7 y otro de citomegalovirus. En los ensayos in vitro, las mitocondrias (80 ug) de ratas control (C) o 4h post-LPS fueron incubadas con la enzima sintetizada por el STT, con o sin fracción citosólica y posteriormente una alícuota fue tratada con PK para eliminar las proteínas asociadas a la membrana externa mitocondrial. iNOS se encontró en mitocondrias tanto de ratas C como de ratas tratadas con LPS pero únicamente al coincubarlas con citosol de ratas 4h-post LPS. El tratamiento con PK removió totalmente la iNOS en mitocondrias C, mientras que en las mitocondrias post LPS la proteína fue parcialmente resistente al tratamiento. En células HEK 293 transfectadas 24 hs con piNOSL8 se observó la expresión de iNOS en citosol y la entrada de la proteína a mitocondria, lo que le confirió resistencia al tratamiento con PK. Conclusiones: a) la entrada post-traduccional de iNOS a la mitocondria in vitro requiere factores del huésped o bacterianos presentes tanto en la mitocondria como en el citosol de la rata tratada con LPS; b) el importe mitocondrial de iNOS in vivo no dependería de estímulos bacterianos y podría ocurrir por mecanismos cotraduccionales.

- 610. (676) EL HEXACLOROBENCENO ESTIMULA EL CAMINO DE C-SRC / ERK 1/2 EN LA LINEA CELULAR DE HIGADO WBF-344.** SÁNCHEZ MARCELA SUSANA, RANDI ANDREA SILVANA, KLEIMAN DE PISAREV DIANA LEONOR

Ciclo Básico Común; Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ampliamente distribuido en el medio ambiente, que produce porfiria, alteraciones reproductivas y tiroideas y cáncer hepático y tiroideo. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que en hígado de ratas intoxicadas con HCB, aumentaban los niveles y actividad del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y la expresión de los protooncogenes c-Myc, c-Jun y c-Fos. El HCB se une al Receptor de Hidrocarburos Aromáticos y la c-Src se activa en hígado de rata (SAIC 2004), activando al EGFR y de este modo podría estimularse el camino regulado por las señales extracelulares ERK 1/2. Nuestro objetivo fue estudiar el mecanismo de acción del pesticida en la línea celular normal de hígado de rata, WBF-344 sobre: 1. la proliferación celular y 2. los niveles de expresión y actividad de c-Src y ERK 1/2. Las células cultivadas en IMEMZO con 10% SFB, Hepes 20mM; insulina, 4ig/ml; glutamina 2mM; antibiótico/antimicótico 100 µg/U/ml, se expusieron al HCB disuelto en etanol durante 24 horas (10, 50, 500 nM). Se evaluó proliferación por incorporación de ³H-Timidina. La expresión y activación de la c-Src y del ERK 1/2 se estudiaron en lisados celulares totales por inmunoblot con anticuerpos específicos contra las formas totales y fosforiladas de las mismas proteínas. El HCB: 1. disminuyó la proliferación celular a las dos

sis de 50 (P< 0.01); 100 (P< 0.001); y 500 nM (P< 0.001); 2. aumentó la expresión de c-Src en 85%(500nM; p< 0.01) y la activación en 161%(500nM; p< 0.05), así como la expresión de ERK 1/2 a todas las dosis estudiadas (183% a 10nM; p< 0.05) y su activación en 84% (10 nM; p< 0.05). Estos resultados demuestran por primera vez, que la vía de transducción de señales mediada por c-Src y ERK 1/2 estaría involucrada en el mecanismo de acción del HCB en la línea celular de hígado normal WBF-344.

- 611. (476) EL ESTADO REDOX CELULAR REGULA LA FOSFORILACIÓN DE AKT EN THR308 Y SU TRASLOCACIÓN A MITOCONDRIA.** ANTICO ARCIUCH, VALERIA GABRIELA, FRANCO MARÍA CLARA, SASSONE ALINA, CARRERAS MARÍA CECILIA, PODEROSO JUAN JOSÉ

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires; Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Akt es una serina/treonina proteína quinasa activada por varios estímulos como factores de crecimiento, citoquinas y estrés, que regula la supervivencia celular. Para su completa activación Akt1 debe ser fosforilada secuencialmente en ser473 y thr308. En trabajos anteriores demostramos que la exposición de las células NIH/3T3 a 50 µM H₂O₂ provoca un aumento en el índice de proliferación mientras que 250 µM H₂O₂ induce la entrada de las células en apoptosis a través de la activación y tráfico diferencial de Akt1. El objetivo de este trabajo fue analizar la traslocación y posterior activación de Akt1 en mitocondria por H₂O₂ y la conexión con la inducción de apoptosis en la línea celular NIH/3T3. El índice de apoptosis fue evaluado por citometría de flujo con iodo de propidio y anexina V. La distribución subcelular de P-Akt (núcleo, mitocondria y citosol) se analizó mediante transfección transiente con pcDNA3-Akt1 wt y dominante negativo (dn) y western blot anti HA-tag. La activación de Akt1 por fosforilación en thr308 y la liberación de citocromo c fueron analizadas por western blot. El tratamiento de las células con 250 µM H₂O₂ causó un 53% de apoptosis evidenciada por tinción con anexina V, aparición de un pico hipodiploide en la citometría de flujo y liberación de citocromo c al citosol. Por otra parte, diferencias en el estado redox celular provocaron una activación diferencial de Akt1: a 50 µM H₂O₂ la activación de Akt1 y su translocación al núcleo fueron rápidas y persistentes mientras que a 250 µM H₂O₂ la quinasa no translocó al núcleo. 50 µM H₂O₂ provocó la segunda fosforilación de Akt1 en thr308 en mitocondria, efecto que no ocurrió a 250 µM. Estos resultados sugieren que H₂O₂ provoca la activación selectiva y tráfico diferencial de Akt1 regulando la progresión del ciclo celular. De esta forma, la retención mitocondrial de Akt1 podría restringir los efectos nucleares proliferativos favoreciendo la activación de la apoptosis.

PREMIO COSSIO

- 612. (401) PARTICIPACION DE LA SEROTONINA Y DE LA VARIANTE FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN DEL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA EN INDIVIDUOS CON DESINCRONIZACION DEL RITMO CIRCADIANO: IMPACTO EN SALUD.** FERNANDEZ GIANOTTI TOMAS (1), SOOKOIAN SILVIA (1), GEMMA CAROLINA (1), BURGUENO ADRIANA (1), ALVAREZ AZUCENA (1), GONZALEZ CLAUDIO DANIEL (2), PIROLA CARLOS JOSE (1)

Cardiología Molecular. Instituto de Investigaciones Médicas. A. Lanari. UBA. CONICET (1); Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (2)

El ritmo circadiano y las condiciones ambientales se encuentran desincronizados en varias situaciones, entre ellas en el esquema laboral de trabajadores sometidos a ritmo rotativo (periodos día/noche alternados). Nuestro objetivo fue investigar el papel de la serotonina (5HT), su metabolito (ácido 5hidroxi-indo-

lacetico 5HIAA) y la variante de inserción: L/delección: S del gen SLC6A4 del transportador de 5HT (5HTT) en el esquema laboral antedicho. Se reclutaron 683 hombres de una fábrica (437 diurnos y 246 turno rotativo). Se realizó historia clínica, examen físico y de laboratorio; se midió el contenido plaquetario de 5HT y 5HIAA mediante HPLC-RP-EQ. Los contenidos (media±ES) de 5-HT y HIAA difirieron significativamente ($p < 0.001$) entre los dos grupos: diurno (41.3±5.9 y 11.4±3.8 pg/mg) vs. rotativo (37.9±7.8 y 9.3±3.8 pg/mg); siendo mayor en el diurno. Por regresión múltiple, los valores logarítmicos tanto la 5HT como el 5HIAA se asociaron al turno rotativo (5HT, $\beta \pm SE$: 0.17±0.05, $p < 0.002$; 5HIAA, $\beta \pm SE$: 0.19±0.05, $p < 0.0003$). Además observamos una diferencia significativa en la distribución de los genotipos de los trabajadores diurnos (numero de sujetos, LL: 126, LS: 202, y SS: 109) y los del turno rotativo (LL: 47, LS: 124 y SS: 75) ($p < 0.008$). En conclusión, los contenidos de 5HT y del 5HIAA se encontraron significativamente disminuidos en los sujetos del turno rotativo en comparación a los trabajadores diurnos. Además observamos una asociación entre variante S del SLC6A4 y el turno rotativo, asociado con un menor contenido de 5HIAA. Los trabajadores con turno rotativo mostraron mayor frecuencia de componentes del síndrome metabólico. Estas observaciones aportarían al conocimiento de los mecanismos relacionados con la desincronización del ritmo circadiano con la perspectiva de lograr una efectiva estrategia terapéutica para los trastornos metabólicos y/o del humor con drogas que modulen la respuesta serotoninérgica.

- 613. (316) EL SPLICING ALTERNATIVO (SA) DEL EXÓN 5 DE LA CITOCROMO P450 AROMATASA PODRÍA SER UN MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTRÓGENOS EN EL HUMANO.** PEPE CAROLINA, SARACO NORA, BAQUEDANO MARÍA SONIA, GUERCIO GABRIELA, VAIANI ELISA, BERENSZTEIN ESPERANZA, RIVAROLA MARCO AURELIO, BELGOROSKY ALICIA

Laboratorio de Investigación, Hospital de Pediatría Garrahan

Aro, codificada por el gen CYP19, participa en la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos. Eventos de SA en la zona codificante de la Aro han sido descriptos en varias especies, incluyendo primates superiores, aunque en humanos se han descripto sólo asociados a la expresión de los diferentes E1 no codificantes. Se han descripto 12 casos de déficit de Aro por mutaciones en el gen CYP19. La mutación (mut) c655G> A fue descripta en una niña heterocigota compuesto para la mut (JCEM, 2004), que ocurre en el último nucleótido del E5 y podría asociarse a la disrupción del sitio dador de splicing E5-intrón5. A fin de evaluar la consecuencia in vivo de la mut se aisló ARN total de linfocitos de la paciente, sus padres y controles normales y por RT-PCR se amplificó el fragmento E4-E7 del cDNA de la Aro humana. En la paciente y su padre (portador de la mut) se amplificó un fragmento de menor tamaño cuya secuencia reveló la falta del E5. La asociación entre la pérdida del E5 y la presencia de la mut fue confirmada por ensayos de splicing en células Y1 donde observamos que mientras el minigen salvaje de la Aro se procesa normalmente, el portador de la mut excluye el E5. Para evaluar si la falta del E5 se asocia a la pérdida de actividad aromatasa (AA), se clonó en el vector pCDNA3 el cDNA completo de la Aro(p-Aro) y por mutagénesis dirigida se eliminó el E5(p-AroΔE5). Se detectó AA en células transfectadas con p-Aro mientras la expresión de p-AroΔE5 se asoció a una AA nula. Observamos la expresión del ARNm-E5 junto con el transcripto normal como una variante de splicing en testículo humano prepuberal, adrenal prepuberal y placenta a término, siendo la primera evidencia de la ocurrencia de splicing alternativo en la zona codificante de la Aro humana. Debido a que el ARNm-E5 se asocia a una AA nula, su presencia podría constituir un nuevo mecanismo involucrado en la compleja regulación de la AA en tejidos esteroideogénicos.

- 614. (118) MODULACIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULATORIAS DURANTE EL CICLO MENSTRUAL: SU IMPLICAN-**

CIA EN REPRODUCCIÓN HUMANA. ARRUVITO LOURDES, SANZ MARIANELA, FLORES ANA, PALADINO NATALIA, FAINBOIM LEONARDO

Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. UBA. CONICET

Las Treg cumplen un papel central en la homeostasis del sistema inmune. Ante la mayor prevalencia de autoinmunidad en mujeres, se propuso a las hormonas sexuales como moduladores de la respuesta inmune. En el presente trabajo investigamos el rol de las hormonas sexuales sobre las Treg durante el ciclo menstrual. Muestras de sangre periférica de mujeres fértiles analizadas por citometría de flujo mostraron que los niveles de estrógenos están asociados con el nivel de expresión de las Treg, evidenciándose una expansión a lo largo de la fase folicular, seguida de una dramática caída en la fase lutea. Mujeres que padecen abortos recurrentes espontáneos mostraron similar número de Treg en ambas fases del ciclo menstrual y una capacidad supresora disminuida en comparación con los controles. Concluimos que la falta de expansión y el déficit funcional aquí descrito, probablemente contribuyan al fracaso reproductivo. Finalmente, nuestros resultados deberán ser valorados en los trabajos clínicos que estudien Treg en mujeres, debido a su variabilidad durante el ciclo menstrual.

- 615. (220) EVOLUCIÓN DE LA PANCREATITIS EXPERIMENTAL EN RATAS CON MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTEINASA DEL SUERO.** DI LORETO VERÓNICA, ROMA STELLA MARIS, MORENO HILDA, NIPOTI JÉSICA, PRETINI JULIA, HOLOTTE DIEGO, RIGALLI ALFREDO

Facultad de Ciencias Médicas, UNR

La pancreatitis aguda es una enfermedad inflamatoria cuya evolución depende del equilibrio entre la acción de proteinasas y sus inhibidores. La α -2-macroglobulina (α 2M) es una antiproteasa normal del plasma cuya función es ligar e inactivar proteinasas. El monofluorofosfato (MFP) es una droga utilizada para el tratamiento de la osteoporosis que se une a la α 2M plasmática perturbando su homeostasis con potenciales efectos sobre la evolución de la pancreatitis. El objetivo de este trabajo fue estudiar la evolución de la pancreatitis experimental en ratas con la homeostasis de la α 2M modificada por el tratamiento con MFP. Se utilizaron ratas línea IIM/FCm sublínea m de 50 días de edad. La pancreatitis se indujo por cierre incompleto del asa duodenal. Previo a la cirugía y durante 30 días, doce ratas recibieron por sonda gástrica 80 micromol MFP/día y otras doce recibieron agua (controles). Se determinó amilaseemia y α 2M plasmática por dot-blot, se tabuló el día de muerte de las ratas y se realizó histopatología del páncreas. Se observó una mayor sobrevida de los animales tratados previamente con MFP (controles: el 50% de las ratas murió antes de las 96 hs, tratados: no llegó a morir el 50% de las ratas en 336 hs). Las amilasemias en los animales de ambos grupos aumentaron a las 24 y 48 hs. (ANOVA) siendo mayor en los controles aunque no en forma significativa (T Student, datos indep). La concentración de α 2M fue mayor en el grupo pretratado con MFP en las primeras 48 hs. y decreció en forma significativa en el grupo control (ANOVA, $p < 0.05$). Los animales pretratados mostraron un menor daño del tejido pancreático. Se concluye que el MFP administrado previamente al desarrollo de la pancreatitis mejora su evolución. La mayor sobrevida, los menores niveles de amilasa y el menor daño pancreático de los animales tratados respecto de los controles sugieren un efecto protector del MFP en la evolución de la pancreatitis aguda.

	[amilasa]		[a2M]	
grupo	0 hs	48 hs	0 hs	48 hs
controles	29.4±3.6	60.4±22.7	13.1±1.3	9.8±0.6*
tratadas	22.5±3.2	51.3±14.2	14.4±1.5	12.0±1.5